

人乳头瘤病毒实验室检测方法的研究进展*

吕攀攀¹, 邢志芳²综述, 曹国君^{3△}审校

(1. 复旦大学附属闵行医院检验科, 上海 201199; 2. 复旦大学附属闵行医院输血科, 上海 201199;
3. 复旦大学附属华山医院检验医学科, 上海 200040)

关键词: 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; 检测方法; 预防与筛查

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)05-0660-05

人乳头瘤病毒(HPV)与宫颈疾病的关系最初于 1983 年由德国病毒学家 Harald zur Hausen 提出, 现今无数研究已证实 HPV 感染与宫颈癌及癌前病变密切相关, 是全球范围内最常见的一种性传播病毒感染^[1]。至今已鉴定出 200 多种 HPV 型别, 不同的型别存在致病差异性, 根据 HPV 与宫颈癌的关系将其分为高危型 HPV(hrHPV)和低危型(lrHPV)^[2]。其中 lrHPV 主要导致湿疣类病变, 而 hrHPV 的持续感染是引起宫颈癌及癌前病变的必要条件, 将宫颈癌风险提高 250 倍, 其检测率在宫颈癌中达到 99.7%。HPV 感染的型别及流行性因年龄、种族、社会经济地位和地理位置的差异而不尽相同^[3-4]。约 70% 的浸润性宫颈癌与 HPV16、HPV18 型感染密切相关^[5]。我国每年新发宫颈癌约占全球的 1/3, 为 75 500 例, 死亡病例约 34 000 例^[6]。由于宫颈癌癌前病变期长且可逆, 是目前唯一病因明确的癌症, 故早预防、早发现、早诊治能够有效降低宫颈癌病变程度并减少病死率。近年来, 先进技术的发展, 如 HPV 的检测及 HPV 疫苗的研发在很大程度上减少了宫颈癌的发病率^[7-10]。本文就 HPV 常用检测方法进展进行综述并对其筛查和预防等进行探讨。

1 HPV 致病机制

HPV 是小型无包膜长约 8 kb 双链环状 DNA 病毒。有 3 个基因功能区: 早期区(E1、E2、E4、E5、E6 和 E7)、晚期区(L1、L2)和长控制区(LCR, 又称上游调控区 URR)。HPV 存在高度的种属性, 感染宿主后, HPV 往往会与宿主细胞基因组发生整合, 干扰宿主细胞相关基因的正常调控, 可以使正常细胞永生。其中 E6、E7 编码的蛋白共同调节细胞的无限增殖和转化, 是致癌的关键。人端粒酶逆转录酶(hTERT)的催化亚基 E6 增加了端粒酶的活性, 而在正常体细胞中 hTERT 一般为阴性。E6 与抑癌基因 P53 结合后能够促进 P53 降解, 从而促使细胞的无限增殖, 进一步诱导宫颈癌的发生^[11]。E7 蛋白主要通过与其视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)的结合位点结合, 影响到细胞周期的调控。同时 E7 蛋白也可增加其他细胞调节因子的活性, 诱导细胞过度增殖。由此, Muñoz 等^[12]得出结论, 宫颈癌组织中 E6 和 E7 蛋白的高表达, P53 蛋白及 pRb 的降解或失活, 增加了基因组的不稳定性, 使得细胞增殖失去控制, 最终发展为宫颈癌。然而并非所有的 HPV 感染都将发展成宫颈癌, 大多为“一过性”, 约 90% 的 HPV 感染会被机体清除, 只有另约 10% 的持续性感染会经历长期的宫颈癌演变进程。宫

颈癌演变的协同因素主要包括病毒本身的因素(HPV 的型别是最主要的, 40% 的高级别病变是由 HPV16 导致的, 其次是 HPV18)、行为因素(包括感染 HPV 的初始年龄、多个性伴侣、多产、长期使用避孕药、吸烟、慢性宫颈炎及免疫低下等)和遗传因素(与 HLA 相关)^[13]。

2 HPV 检测方法

2.1 传统的细胞学方法 巴氏涂片法, 巴氏染色可发现由 HPV 导致的特征性的“挖空细胞”。优点: 诊断特异性高, 便宜, 便于普查; 缺点: 低准确率, 低灵敏度和低重复性, 主观性强, 高假阴性率, 不能分型, 存在一定的误诊、漏诊率。为确定是否有 HPV 感染还需用特异性抗 HPV 抗体, 作组织化学染色或采用原位杂交技术。

随着人们对 HPV 和宫颈病变关系的深入了解, HPV-DNA/RNA 检测在宫颈病变预防、筛查、诊治及随访中的作用日益显现, 优于传统的细胞学检查。

2.2 HPV DNA 检测 直接针对病因的检查, 能够提高宫颈癌及宫颈上皮内瘤变(CIN)检测的灵敏度, 是筛查宫颈疾病的重要技术之一。

2.2.1 杂交捕获 2 代技术(HC2) 1999 年也是最早获得美国食品及药物管理局(FDA)批准用于 HPV 检测, 高灵敏度和高特异性, 成为其他 HPV 检测的参照比较方法。其原理是利用对抗体捕获信号的放大和化学发光信号的检测, 不需进行基因扩增, 采用 96 孔平板法, 同时检测 13 种 hrHPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68)及对应的病毒载量。半定量检测、简便易行, 检测结果客观性较强, 有较高的可重复性, 有效地补偿了细胞学的假阴性结果, 避免一定程度的漏诊。但存在对 hrHPV 不能进行分型检测, 费用成本高, 无内质控监控整个测试过程等缺陷。Cui 等^[14]研究发现, HC2 检测时可发生 hrHPV 与 lrHPV 的交叉反应, 对于随访可能会产生过度诊断和过度治疗, 出现一定程度上的 hrHPV 漏检, 不能区分一过性 HPV 感染与 CIN 及多重感染。

2.2.2 Linear Array[®] 基因分型检测(LA 检测) 使用 PG-MY09/11 引物, PCR 扩增 37 种 HPV 长度为 450 bp 的 L1 区, 并同时用 β-球蛋白引物扩增 268 bp 的 β-球蛋白序列, 随后扩增产物单链与 HPV 型别探针和 β-球蛋白探针进行杂交反应, 最后通过比色反应鉴定型别。β-球蛋白作为内质控监控了整个测试过程。高特异性、高灵敏度、提供强大的分型检测能力,

* 基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会青年项目(20154Y0141); 上海市闵行区科委自然科学基金(2015MHZ003, 2016MHZ01); 上海市闵行区卫生和计划生育委员会基金(2014MW13)。

△ 通信作者, E-mail: gjcao@foxmail.com。

同时定性检测包括高危低危在内的 37 种型别[HPV6、11、16、18、26、31、33、35、39、40、42、45、51~56、58、59、61、62、64、66、67~73 (MM9)、81、82 (MM4)、83 (MM7)、84 (MM8)、89 (CP6108)和 IS39]。然而当样本合并感染 HPV33、35 或 58 时,不能鉴别出 HPV52 型,而且当 HPV 核酸发生突变时,会产生假阴性结果。

2.2.3 Cobas 4800 HPV 2011 年获得美国(FDA)批准,并于 2014 年获得美国 FDA 批准用于女性宫颈癌的一线初筛。于体外定性检测 14 种 hrHPV,灵敏度高,重复性高,准确度高,通过 3 个独立通道同时对 HPV16、18 进行基因分型的全自动检测,避免了扩增产物的污染和交叉污染,有助于宫颈癌的风险分层。原理:基于 2 个主要的过程,(1)自动化样本的制备,同时提取 HPV 和细胞的 DNA;(2)运用 HPV 和 β -球蛋白特异性探针 PCR 扩增靶点 DNA 序列。4 种不同荧光染料标记的探针分别与 HPV16、HPV18、其他 12 种 hrHPV(31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68)和 β -球蛋白引物配对。通过实时荧光信号确定 HPV 的型别,其中 β -球蛋白监控了整个过程中,使得 HPV 阴性的样本和由于样本细胞数不够而不表现扩增信号的部分区别开来。因此,所有的阴性结果需结合一个有效的 β -球蛋白信号,才能判断为有效的阴性。Cui 等^[14]比较分析了 Cobas 4800 与 HC2 的临床价值,发现 Cobas 4800 相对于 HC2 来说具有较低的交叉反应率,却有更高灵敏度、准确度、重复性与特异性。Castle 等^[15]对纳入符合标准的 41 955 例女性进行的细胞学和 Cobas 4800 检测分析表明:阴道镜检查女性中,Cobas HPV 对于 CIN3 或更严重细胞学病变检测灵敏度更高(Cobas HPV:92.0%,95%CI 为 88.1%~94.6%;细胞学:53.3%,95%CI 为 47.4%~59.1%);与仅基于细胞学的检查方法相比,Cobas HPV 检测联合 HPV16 与 HPV18 检测灵敏度更高,进行宫颈癌筛查更加有效,也减少了人力需求,可作为替代方法。Cobas HPV 检测作为初筛实验以排除疾病,再以特异性方法如液基细胞学作阴道镜分流,似乎是比较合理的方案。HPV16 与 HPV18 检测或检测二者联合或不联合液基细胞学能够提供潜在的成本效益和安全的宫颈癌筛查。并建议将 HPV16、HPV18 型检测,或检测二者作为一种分流策略,因为大约 70%的浸润性宫颈癌与 HPV16、18 型密切相关^[5],揭示 HPV 分型检测对宫颈癌的早期诊断意义重大。据 Khan 等^[16]报道,相比于非 HPV16、18 型 hrHPV 感染或 hrHPV 感染阴性的女性,持续性 HPV16 或 18 感染致使高级别宫颈病变和宫颈癌的具有最高 10 年的累积发病率。另有研究发现,HPV16 与 HPV18 检测或者二者联合检测可用于对于需要立即阴道镜检查的有较高风险 CIN3+或更严重的 HPV 阳性的患者^[17-18]。因此,Cobas 4800 检测 hrHPV 不失为一种有效的宫颈癌筛查技术。不足的是特异性相对于液基细胞学检测出 CIN3+或者更严重的结果稍低^[15,19-21]。

2.2.4 GenoArray(GA)检测 基于聚合酶链反应(PCR)扩增,应用常规引物扩增 21 种 HPV 的 L1 区(15 种 hrHPV:16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68;6 种 lrHPV:6、11、42、43、44 和 CP8304),使用流式杂交技术,积极引导目标分子靶向定位于固定在膜上的 HPV 型特异分子探针上,形成杂交产物,最后通过比色反应判定结果。简便易操作,准确分类不明意义非典型鳞状细胞和低度病变,将潜在风险病例从低风险病例中筛出,避免漏诊,明确感染型别,一次性检测

21 种 HPV 型别,特别有助于检出高级别宫颈病变,快速识别单一或多种感染。Liu 等^[22]对比分析了 GA 检测和 LA 检测的分型能力,并同时评估了 GA 检测的临床表现,发现 GA 检测具有高灵敏度和高重复性,与 LA 检测具有较高的一致性,分型准确,结果客观可靠,并能检测单一和多重感染。当样本合并感染 HPV33、35 或 58 时,LA 检测不能鉴别出 HPV52 型感染,而 GA 检测检测结果却不受干扰,且价格成本约为 LA 检测的 1/4,因此在发展中国家的 HPV 筛查中具有优势。

2.2.5 Xpert HPV 检测 基于实时荧光定量 PCR 扩增分析,不仅能定量而且可以检测病毒载量。测定 14 种 hrHPV,并且对 16 和 18/45 分型。灵敏度高、简便易操作、通用可扩展、可靠性和重复性良好,单筒内集成提取和检测,只需 1 mL 的宫颈保存液标本,约 1 h 便可出结果。可用于不同通量级别的程序(从单模块系统到 80-模块系统),适用于即时检测也可以被设置为高通量集中实验室。Einstein 等^[23]从美国 7 个地点,通过阴道镜检查筛选出 697 例样本用来评估 Xpert HPV 的临床表现,并且与 Cobas 4800 和 HC2 进行比较。三者诊断出 CIN2+灵敏度相当,HC2 的特异性最高,其次是 Xpert HPV,最后是 Cobas 4800。由于 Cobas 4800 和 HC2 是美国 FDA 批准的临床确认实验,因此作者论断 Xpert HPV 的性能与 Cobas 4800 和 HC2 相当。Cuschieri 等^[24]的研究显示 Xpert HPV 的临床性能和重复性与基于 GP5+6 液相芯片技术的一个临床确认实验 SCT 具有可比性,同时符合梅耶尔标准,所以建议 Xpert HPV 或许可以作为宫颈癌的一个首选筛查确认实验。缺陷:只能分型 16,18/45,不能对 18,45 型别进行分别分型。

2.2.6 Cervista HPV HR 和 Cervista HPV 16/18 2009 年获得美国 FDA 批准,Cervista HPV HR 检测 14 种 hrHPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68),Cervista HPV16/18 对 HPV16 和 18 分型检测。基于酶切信号放大法,采用恒温酶切扩增技术,Cleavase 酶特异性识别并切割分离分子,通过与 3 组探针 A7、A9 和 A5/A6 杂交反应并放大化学信号,直接检测特定的 DNA 序列。Cervista HPV 检测 HPV 病毒的 L1、E6/E7 区,避免了仅检测 L1 区所造成的假阴性,与大多 lrHPV 无交叉反应,降低假阳性结果。且 Cervista HPV 仅扩增信号,不扩增目标序列,抗干扰能力强,避免实验操作污染导致的假阳性和假阴性,进一步减少假阴性率。人组基因 2 作为内质控,监控整个测试过程。美国 FDA 临床实验证明,对 CIN2+的检出率达 93.0%,阴性预测值达 99.1%;对 CIN3+的检出率及阴性预测值均高达 100.0%。缺陷:不能区别多重感染,只检测 HPV16/18 型,不能区别其他型别,与 lrHPV67 和 70 型存在交叉反应。

2.2.7 HPV DNA 芯片技术(HPV DNA Chip/MyHPV chip)

检测 15 种 hrHPV (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68)和 9 种 lrHPV(HPV6、11、34、40、42、43、44、54 和 70)。原理:基于 PCR 扩增反应,运用常规引物 GP5+/GP6+扩增特定的 HPV 片段,并同时扩增 β -球蛋白作为内质控,产物用 Cy5-dUTP 标记,再通过变性与探针杂交,芯片上孵育反应后由扫描仪判定结果。Yeo 等^[25]通过对 867 例患者的筛查,对比分析了 HPV DNA chip 和 HC2 的临床价值,一致率达到了 79.4%。在鉴别 HSIL 或更严重细胞学病变上具有相似的灵敏度和特异性。与细胞学检查相比,具有高灵敏度但低特异性,并推断根据 MyHPV chip 的分型结果,

HPV16/18 阳性的女性相对于阴性的来说存在高风险 HSDL 或更严重细胞学病变。HPV16/18 检测将有助于高级别宫颈病变风险评估,建议 HPV16/18 阳性的女性,无论其病理学检查是阴性还是不确定性需行即时阴道镜检查。缺陷是可能存在交叉反应。

2.2.8 454 Next-Generation sequencing (NGS) 基于 HPV 多个片段的大规模测序,相对较低的成本进行大规模高速度并行高通量测序,有着高度的灵敏度和特异性,最大的优点是能够从单个 DNA 片段确定序列信息,不需要事先将 DNA 片段克隆到载体上,对较大扩增子也可进行深度测序。Flores-Miramontes 等^[26]发现 NGS 对 HPV 的基因分型准确而灵敏,能够鉴别出 LA 检测不能鉴别的更多的型别,并且可以发现和鉴别突变的病毒株,具备更强大的分型能力,有利于指导疫苗的使用和研发。但相对于常规 PCR 和循环测序,灵敏度较低,而且全病毒基因组测序时存在宿主基因组污染问题^[27]。

2.2.9 27 HPV Genotyping Panel kit 同时测定 17 种 hrHPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、26、53、82)和 10 种 lrHPV(6、11、40、42、43、44、55、61、81、83)。共有 2 类探针,28 颗分类微球,其中与 HPV DNA 杂交的探针包被在 27 个分类微球上,与人 β -球蛋白基因杂交的探针在质控微球上。采用通用引物多重 PCR 扩增,流式荧光杂交分型检测,PCR 扩增产物与探针杂交,加入荧光标记反应,最后在流式荧光检测仪上检测荧光信号。质控微球的结果提示取样、抽提、PCR 和杂交整个过程是否符合要求。优点:采用液相杂交,同时检测 27 种亚型,过程无须洗涤,减少污染,重复性好,灵敏度高,特异性好,各型别间无交叉反应,抗血样标本干扰,杂交快速,全程仅需 4 h。

2.3 HPV RNA 检测 Aptima HPV(AHPV)和 Aptima HPV16/18/45(AHPV GT)2012 年获得美国 FDA 批准的第一个 HPV mRNA 检测技术。运用转录介导扩增技术(TMA 技术)的首款基于 HPV 的 2 个致癌基因 E6、E7 mRNA 的,新一代宫颈癌相关 HPV 检测试剂。AHPV 检测 14 种 hrHPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68),AHPV GT 则是针对 3 种 HPV 高危亚型 16、18、45 的分型试剂。Castle 等^[28]研究表明 AHPV 和 Cobas 在诊断 CIN2+ 和 CIN3+ 灵敏度上相似,而 AHPV 的特异性更高。对于宫颈癌的风险分层管理上两者也相当。Felix 等^[29]发现,基于 HPV16/18 分型的 mRNA 检测和液基细胞学联合筛查要优于基于 HPV16/18 分型的 DNA 的 HPV 一线初筛:(1)减少一生筛查次数,(2)降低检测成本,(3)减少阴道镜检查,有创危害少,(4)降低宫颈浸润癌发生率,(5)减少病死率。因此联合筛查相对于 HPV 初筛能够提供一个潜在的改善临床和经济成本的效益。hrHPV 已被确认为宫颈癌的主要诱发因素,E6、E7 是致癌的关键基因,持续性感染 HPV 病毒后,特别是 HPV 的 DNA 和宿主细胞的 DNA 发生整合后,E6、E7 基因大量表达 mRNA,调节宿主细胞的无限增殖和转化。相比 DNA,E6/E7 mRNA 的检测,能显著减少对一过性 HPV 病毒感染的检出,有效避免不必要的阴道镜转诊。HPV DNA 检测敏感性高,但特异性低;细胞学检测特异性高,而敏感性低。从 FASE 研究数据来看,Aptima HPV 既保留了 HPV DNA 的敏感性,又具有接近细胞学检测的特异性。实现了灵敏度和特异性的良好平衡。但是 AHPV GT 分型检测只有在 AHPV 检测出阳性结

果前提下才能进行试验,其检测费用也较高。

3 HPV 筛查应用现状与预防

宫颈癌的早期筛查和 HPV 疫苗的研发应用在很大程度上减少了发达国家的宫颈癌病死率。2012 年,美国癌症学会、美国阴道镜检查与宫颈病理学会和美国临床病理学会(ASCP)联合发布了新版宫颈癌筛查指南,指出:最优筛选策略应该是甄别出可能发展为宫颈癌的癌前病变(筛查好处的最大化)以及避免一过性 HPV 感染及相关良性病变的检测和不必要的治疗(筛查潜在危害的最小化)^[30]。2013 年,世界卫生组织推荐 hrHPV 检测作为难以实施巴氏/细胞学筛查的地方的替代方法^[31]。2014 年,美国 FDA 批准 Cobas HPV 检测用于 25 岁及以上女性宫颈癌筛查的一线初筛。2015 年美国过渡期临床指南中表明:hrHPV 初筛可作为美国目前基于细胞学筛查宫颈癌方法(包括单独细胞学和联合筛查)的替代方案。相应的,中国也启动了相关的 HPV 评估,用于制定适合中国人群的筛查策略。

HPV 疫苗是人类首次尝试通过疫苗消除一种癌症,具有划时代意义。接种疫苗可能是消除发展中国家宫颈癌一个长期的解决方案。目前 HPV 疫苗分为预防性疫苗和治疗性疫苗。治疗性疫苗尚处于临床试验当中,而市场上有两种可用的预防性疫苗:Cervarix(针对 HPV16、18)和 Gardasil(针对 HPV6、11、16 和 18),经过多次临床试验证明健康人群接种这两种疫苗对于预防疫苗覆盖的 HPV 型别具有显著效果。尽管疫苗效果突出,但其昂贵的价格、必须低温运输的条件等也是在发展中国家难以推广的主要问题之一。由于现在基因组数据的可用性,病毒对免疫反应和免疫遗传的变化信息,新的生物信息学和计算机应用的发展和系统生物学方法等在疫苗研发方面提供了新方向,可以不同于传统的 DNA 病毒疫苗研发方向如减毒活疫苗或灭活病毒或类病毒重组疫苗^[32-33]。新方向可以理想化并保持一定的成本控制。因此,基于基因组学、免疫基因组学信息和反向疫苗学的疫苗设计研发,是一个不断发展的技术,也可能是一个指向未来的指针。

4 展望

考虑到宫颈癌的高发病率、症状的隐匿性及病死率,宫颈癌亟需一个标准的筛查方案和有效的预防措施。既要追求筛查好处的最大化,又要减少潜在危害的最小化^[30]。而从细胞学检测向 HPV 检测或两者联合检测的转变可能提供一个更加安全更加有效地筛查方案。由于 HPV 感染的型别及流行性因年龄、种族、社会经济地位和地理位置的差异而不尽相同^[3-4],而不同 HPV 亚型存在致病差异,故 HPV 分型检测意义重大,对 hrHPV 的分流管理、疾病风险评估并指导 HPV 疫苗的研发及使用大有益处,由此检测方法的发展方向也上升了一个高度。目前市场上的疫苗只针对了 hrHPV 的某些高危型,尚未覆盖所有,并且对于已感染的 HPV 并无治疗效应^[34]。因此单纯应用目前的疫苗不能解决已感染或疫苗未覆盖的 HPV 亚型,最好是被设计成安全有效又能起治疗性作用的针对地域性差异的广泛适用的类型。随着 HPV 与宫颈病变关系的深入研究及 HPV 检测方法的不断推陈出新,建立一个包括 HPV 疫苗注射、筛查、诊治及随访等措施在内的考虑到所花费的成本效益和治疗疗效的宫颈癌综合防治体系,有望极大地降低社会承担宫颈癌的负担。凭借科研者的不懈努力及近年来取得的非凡成效,相信在不久的将来,世界范围内

的宫颈癌将大幅减少。

参考文献

- [1] Bosch FN. The causal relationship between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4):244-265.
- [2] 郭洁. 人乳头瘤病毒基因分型芯片的研究[D]. 海口: 华南热带农业大学, 2007.
- [3] Li J, Kang LN, Qiao YL. Review of the cervical cancer disease burden in mainland China[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(5):1149-1153.
- [4] Nakagawa M, Spencer J, Coleman N, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) types and anti-HPV T-cell immune responses among different racial/ethnic groups in Central Arkansas[J]. *J Ark Med Soc*, 2013, 109(8):160-163.
- [5] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11):1048-1056.
- [6] Zhao FH, Lewkowitz AK, Hu SY, et al. Prevalence of human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia in China: a pooled analysis of 17 population-based studies [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(12):2929-2938.
- [7] Riethmuller D, Jacquard C, Guily JL, et al. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France[J]. *BMC Public Health*, 2015, 15(5):453.
- [8] Dunne F, Naleway A, Smith N, et al. Reduction in human papillomavirus vaccine type prevalence among young women screened for cervical cancer in an integrated US healthcare delivery system in 2007 and 2012-2013 [J]. *J Infect Dis*, 2015, 212(12):1970-1975.
- [9] Gage C, Schiffman M, Katki A, et al. Reassurance against future risk of precancer and cancer conferred by a negative human papillomavirus test [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(8):153.
- [10] Blatt J, Kennedy R, Luff D, et al. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices [J]. *Cancer Cytopathol*, 2015, 123(5):282-288.
- [11] Hyland L, Mcdade S, McCloskey R, et al. Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes [J]. *J Virol*, 2011, 85(21):10999-11006.
- [12] Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer [J]. *Vaccine*, 2006, 24(Suppl 3):S1-10.
- [13] Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22(4):553-560.
- [14] Cui M, Chan N, Liu M, et al. Clinical performance of Roche Cobas 4800 HPV Test [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(6):2210-2211.
- [15] Castle E, Stoler H, Wright C, et al. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the Athena study [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(9):880-890.
- [16] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14):1072-1079.
- [17] American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. HPV genotyping clinical update 2009 [EB/OL]. (2011-08-04) [2016-08-01]. <http://www.asccp.org/ConsensusGuidelines/HPVGenotypingClinicalUpdate/tabid/5963/Default.aspx>.
- [18] Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197(4):346-355.
- [19] Anttila A, Kotaniemi-Talonen L, Leinonen M, et al. Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomised study within organised screening programme [J]. *BMJ*, 2010, 340(20):1804.
- [20] Naucler P, Ryd W, Tornberg S, et al. Human papillomavirus and papanicolaou tests to screen for cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(16):1589-1597.
- [21] Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(16):1579-1588.
- [22] Liu S, Leung C, Chan K, et al. Evaluation of a newly developed GenoArray human papillomavirus (HPV) genotyping assay and comparison with the Roche Linear Array HPV genotyping assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3):758-764.
- [23] Einstein H, Smith M, Davis E, et al. Clinical evaluation of the cartridge-based GeneXpert human papillomavirus assay in women referred for colposcopy [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(6):2089-2095.
- [24] Cuschieri K, Geraets D, Cuzick J, et al. Performance of a cartridge based assay for the detection of clinically significant HPV infection-lessons from VALGENT (Validation of HPV Genotyping Tests) [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(9):2337-2342.
- [25] Yeo MK, Lee A, Hur SY, et al. Clinical significance of an HPV DNA chip test with emphasis on HPV-16 and/or HPV-18 detection in Korean gynecological patients [J]. *J*

- Pathol Transl Med, 2016, 50(4):294-299.
- [26] Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Alvarado-Ruiz L, et al. Human papillomavirus genotyping by Linear Array and Next-Generation Sequencing in cervical samples from Western Mexico[J]. Virol J, 2015, 12(1):161.
- [27] Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, et al. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology[J]. J Clin Virol, 2013, 58(2):346-350.
- [28] Castle PE, Eaton B, Reid J, et al. Comparison of human papillomavirus detection by Aptima HPV and Cobas HPV tests in a population of women referred for colposcopy following detection of atypical squamous cells of undetermined significance by Pap cytology[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4):1277-1281.
- [29] Felix C, Lacey J, Miller D, et al. The clinical and economic benefits of Co-Testing versus primary HPV testing for cervical cancer screening: a modeling analysis [J]. J Womens Health (Larchmt), 2016, 25(6):606-616.
- [30] Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American cancer society, American society for colposcopy and cervical pathology, and American society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer[J]. J Low Genit Tract Dis, 2012, 16(3):175-204.
- [31] World Health Organization. Guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention[M/OL]. Geneva, Switzerland: WHO, 2013[2016-08-15]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94830/1/9789241548694_eng.pdf.
- [32] Poland A, Whitaker A, Poland M, et al. Vaccinology in the third millennium: scientific and social challenges[J]. Curr Opin Virol, 2016, 17(1):116-125.
- [33] Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG. Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12):e1002344.
- [34] 刘昱, 祁文娟, 魏丽惠. HPV 预防性疫苗在预防子宫颈癌中的应用进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013, 14(4):378-381.

(收稿日期:2016-10-18 修回日期:2016-12-20)

• 综 述 •

MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌研究进展*

武 静 综述, 胡成进, 刘晓斐, 公衍文[△] 审核
(济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031)

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 丝状真菌; 快速鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)05-0664-03

近年来,丝状真菌感染的发病率和病死率逐渐增高,研究表明抗真菌治疗延迟与病死率升高密切相关,因此,快速、准确鉴定至种水平越来越必要^[1]。目前形态学鉴定是丝状真菌鉴定最广泛的方法。该方法鉴定率低,鉴定时间长,需 4~5 d 时间,易延误临床的诊断和治疗;由于菌株表型特征多变,易受到实验室人员个人经验的影响;裂褶菌、尖端赛多孢子菌组织形态学与曲霉属、镰刀菌非常相似,仅靠组织形态学很难区别开^[2]。用真菌通用引物 Its1 和 Its4 进行聚合酶链反应扩增结合 DNA 测序对丝状真菌进行鉴定,是目前公认的金标准,但操作繁琐,前处理需 1 h,鉴定需 24~48 h,对操作人员要求高,易受到污染导致失败;米曲霉与黄曲霉,阿姆斯特丹散囊菌与冠突散囊菌等基因序列高度同源,用该方法很难区分^[3]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)为一种快速、准确鉴定细菌和酵母菌的方法,并广泛应用于临床,而对丝状真菌的鉴定还处于科研阶段。

1 质谱鉴定丝状真菌概述

MALDI-TOF-MS 是近年发展起来的一种新型软电离质谱技术,通过检测未知微生物的蛋白质指纹图谱并与质谱图数

据库中特征性谱图进行比对,从而对待测微生物进行快速鉴定^[4]。近年来, MALDI-TOF-MS 广泛应用于临床微生物的快速鉴定,尤其在细菌鉴定方面被证实为一种准确、快速、经济的方法,随着该技术的不断发展和完善,其在临床真菌快速鉴定研究中的作用也日益显著。

Ling 等^[5]对 33 篇 MALDI-TOF-MS 鉴定真菌的文献共涉及 9 977 株真菌做了 Meta 分析,分析证实利用 MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌虽没有像鉴定酵母菌那样取得满意的成果,相比其他方法鉴定率仍然较高。有文献统计质谱仪对临床常见丝状真菌鉴定效果均较好,包括曲霉属、青霉属、镰刀菌属、木霉属、皮肤癣菌、毛霉目真菌等,特别是临床常见的曲霉属^[6]。质谱仪单菌株鉴定仅需 20 min,可同时检测多种菌株,是目前用时较短操作也较简便的方法。因此, MALDI-TOF-MS 将会成为丝状真菌诊断领域不可或缺的工具。然而与细菌不同,质谱数据库中丝状真菌数量有限且细胞壁难以破裂需要特殊的前处理,此外图谱易受到不同阶段的产物如孢子、子实体、表面菌丝和基内菌丝体等的影响^[7]。因此,为促进 MALDI-TOF-MS 鉴定丝状真菌在临床实验室的推广实施,仍

* 基金项目:全军医学科技“十二五”重点项目(BWS12J014)。

△ 通信作者, E-mail:18660179631@126.com。