

规范化HPV分型检测 及质量控制



亞能生物技术有限公司(深圳)有限公司
Yaneng BIOScience (Shenzhen) Co.,Ltd.

主要内容

- 1、宫颈癌与HPV概述
- 2、规范化宫颈癌筛查
- 3、HPV分型及质控
- 4、亚能分子诊断产品

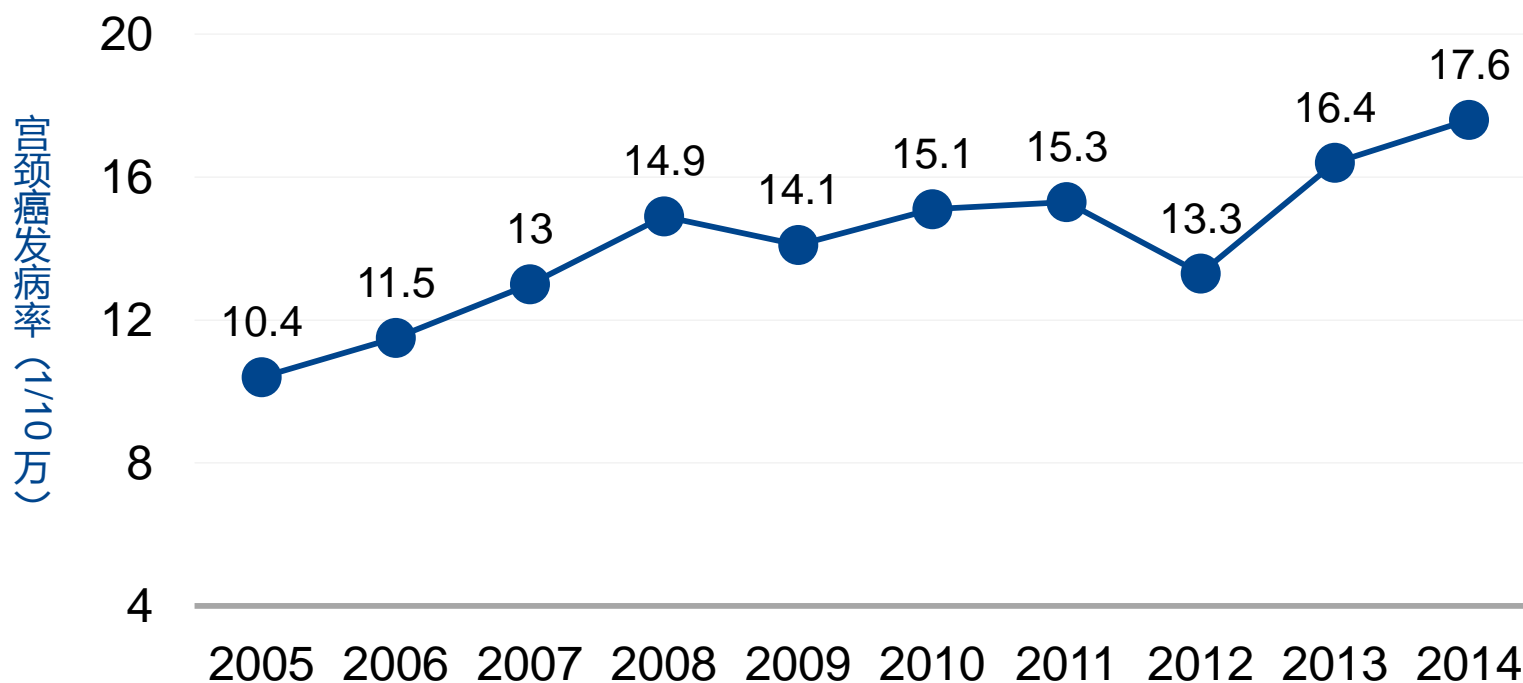
全球子宫颈癌发病状况

全球范围的子宫颈癌病例数 = 527,624

发达国家^a ≈ 14.5% 发展中国家 ≈ 85.5%



中国宫颈癌发病趋势



数据来源：《2015中国卫生和计划生育统计年鉴》

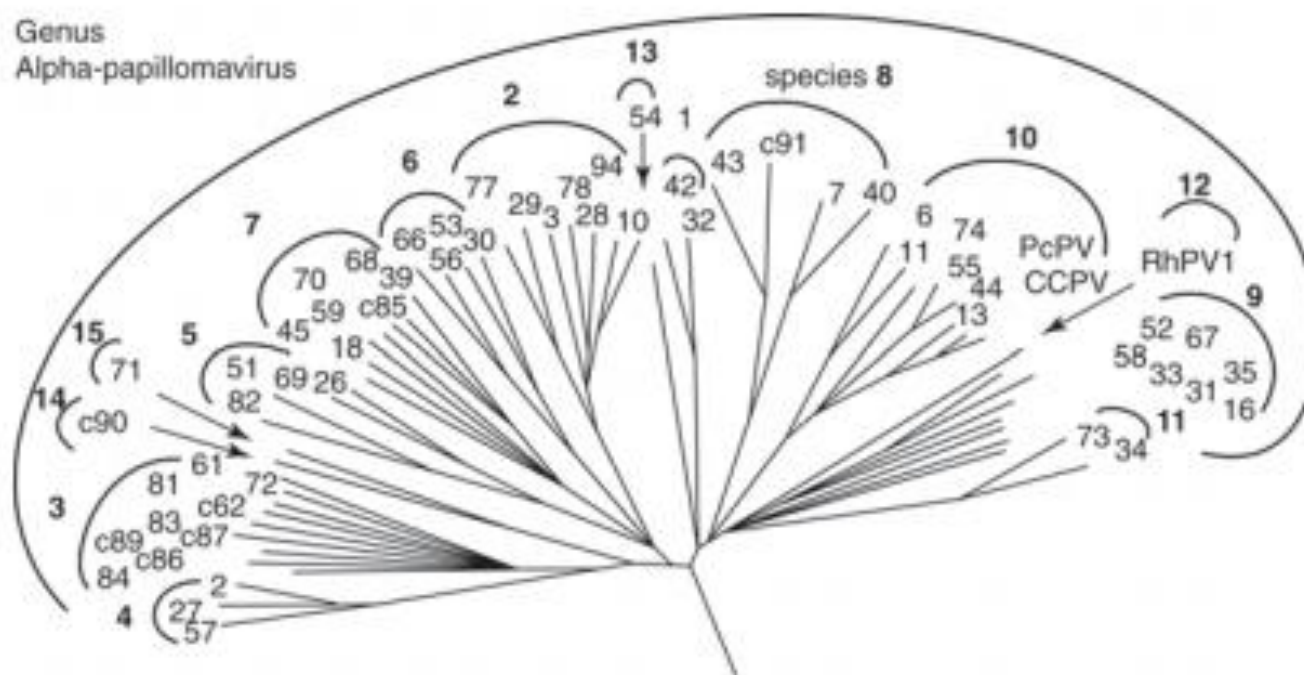
HPV与宫颈癌

- 宫颈癌是**唯一**诱因明确的癌症
 - 1995年，IARC
 - **HPV感染是宫颈癌发生的必要条件**
- HPV检测被推荐用于宫颈癌筛查
 - 2005年，IARC/WHO
- HPV检测做初筛
 - 2015年，ASCCP/SGO



**The Nobel Prize in
Physiology or
Medicine 2008**
Harald zur Hausen

致病HPV种类

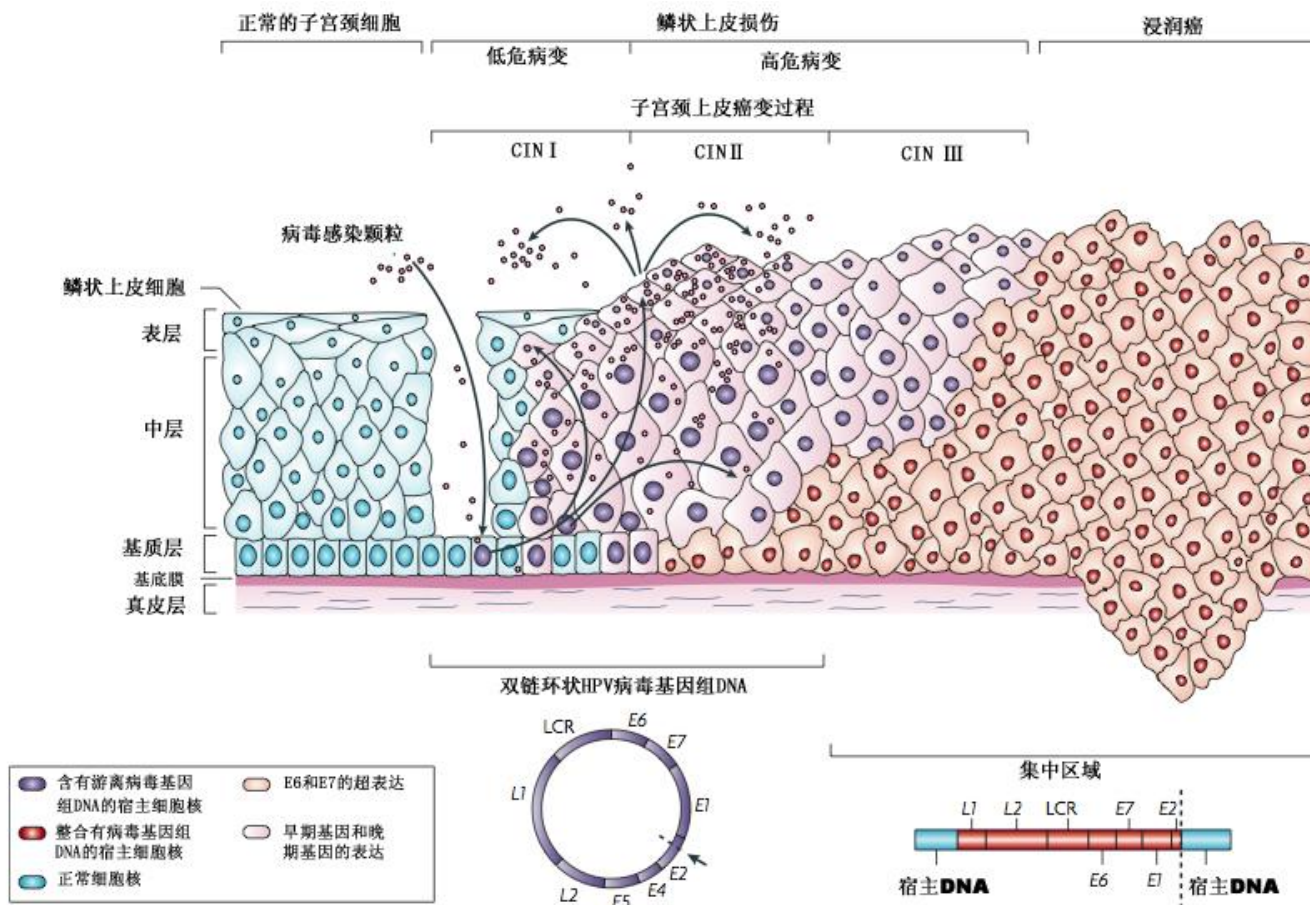


粘膜HPV分为高危型和低危型

高危型13种：HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68

中高危5种：HPV26、53、66、73、82

从HPV感染到宫颈癌



疫苗目前无法替代筛查

覆盖率

- 对有效人群接种覆盖率达到50%，才能控制发病率下降
- 我国可能需要20年时间实现覆盖率目标

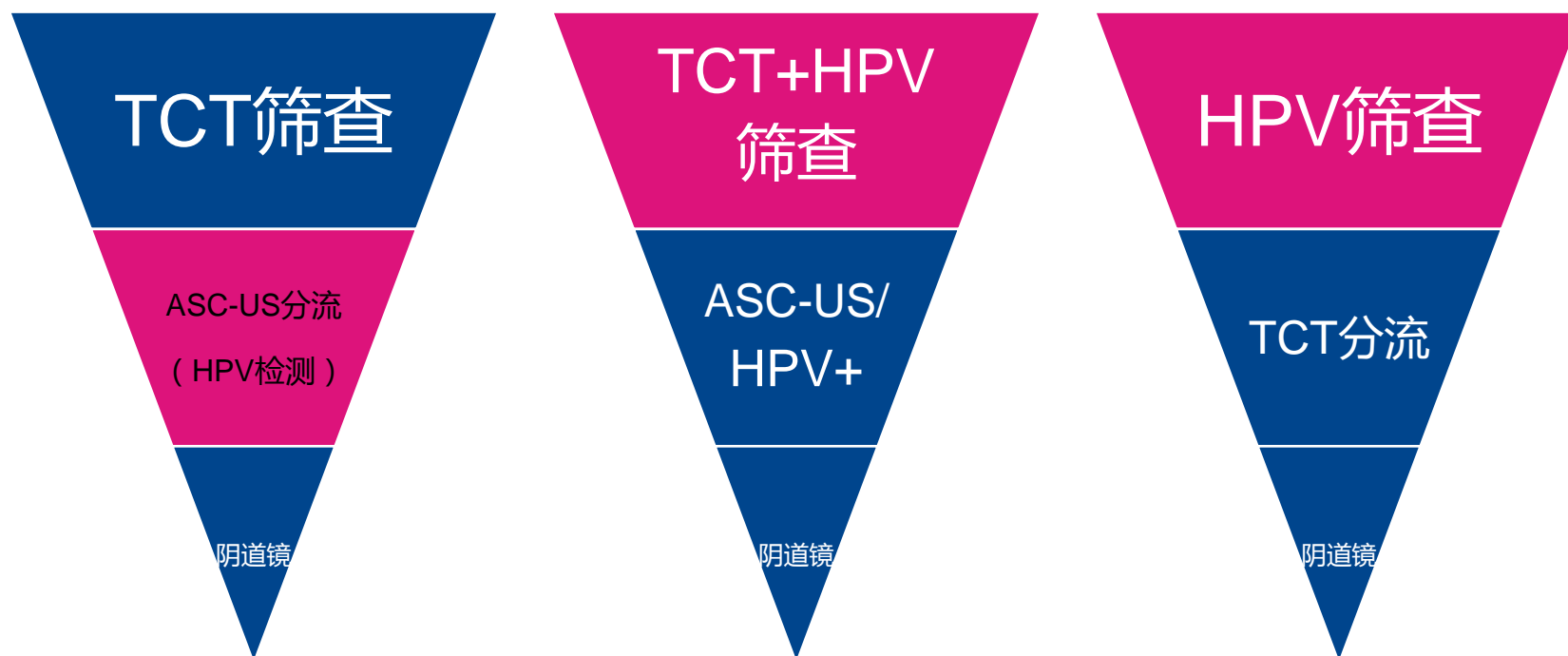
型别

- 我国目前批准的疫苗仅包括HPV16、18两种高危型
- 覆盖的宫颈癌风险只为70%

免疫失败

- 在包含HPV感染人群接种的临床随访中发现疫苗的臨床保护力仅为45%，未感染人群接种随访后对HPV16、18引起的CIN3保护力接近100%

规范的宫颈癌筛查策略



根据筛查结果规范处理

HPV联合细胞学筛查		5年CIN3+的绝对风险	风险阈值 管理方式
HPV+	HSIL	50%	> 5% 立即转诊阴道镜
HPV-	HSIL	29%	
HPV+	ASC-US	6.8%	
HPV+	LSIL	6.2%	
HPV+	Pap-	4.5%	2-5% 1年回访
HPV-	LSIL	2.1%	
HPV-	ASC-US	0.45%	0.1-2% 3年回访
HPV-	Pap-	0.08%	< 0.1% 5年回访

Katki, H. A. ;. *Journal of lower genital tract disease*
 2013, S28-35.

规范的实验流程



四分区 (最优)



三分区

选用合规的试剂

人乳头瘤病毒（HPV）核酸检测及基因分型、
试剂技术审查指导原则

检测范围
宫颈癌筛查
18种HPV型别

第二，HPV 核酸检测试剂用于 ASC-US 人群分流或宫颈癌筛查时，其可覆盖的 HPV 基因型别应至少包含 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型（共 13 种），亦可同时包含 26、53、66、73、82 型中的一个或数个型别；根据现有的研

细解释其临床意义和适应症，并提供充分的证据。第四，鉴于此类试剂的样本采集方法不利于量值溯源，无法保证定量检测结果的准确性，因此建议检测试剂定位为定性检测，本指导原则不适

检测性质
HPV检测是
定性检测

质控品

01

组成

- HPV全基因组质粒
- 人细胞系提取的人基因组DNA

02

范围

- 18种高危型：HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
- 5种低危型：HPV 6, 11, 42, 43, 81

03

浓度

- 质粒浓度： $10^5 \sim 10^7$ copies/mL
- 人基因组DNA：0.5~2ng/ μ L



质控品的应用



室内质控

评估单次实验结果的准确性

标准对照



室间质控

评估不同实验室检测水准

已经在江苏省开展了4次室间质评活动（约80家/次）

参考标准

准确、高通量、自动化的HPV分型检测

宫颈癌筛查

17种高危型



31 33 35

39 45 51

52 56 58

59 66 68

16

18

53 73 82

女性下生殖道感染
多种良性病变

6 11 42

43 81 83

6种低危型

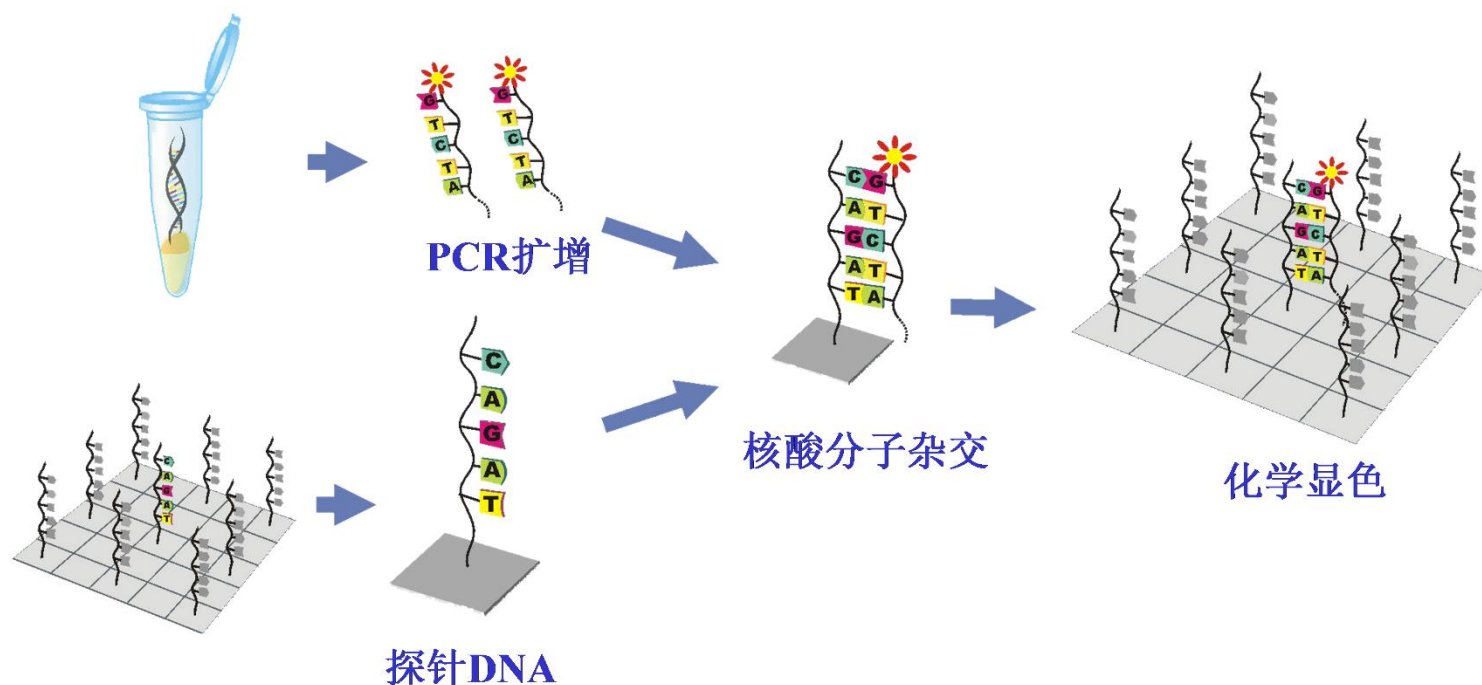


CFDA注册证号：
国食药监械(准)字2014第3401228号
CE认证

实验流程和质控关键点

采样	DNA提取	PCR扩增	杂交显色
注意事项 检查前24小时不能有性生活 检查前3天内不能使用阴道用药 或冲洗阴道 避开月经期	注意事项 充分洗脱宫颈刷，并在管壁上挤干 煮沸裂解时避免爆盖	注意事项 扩增完成后需使PCR产物解链成为单链	注意事项 显色液需新鲜配置 TMB避光保存
少血少粘液	防止交叉污染	防止产物蒸发	IC为准

基因芯片技术保证检测结果准确



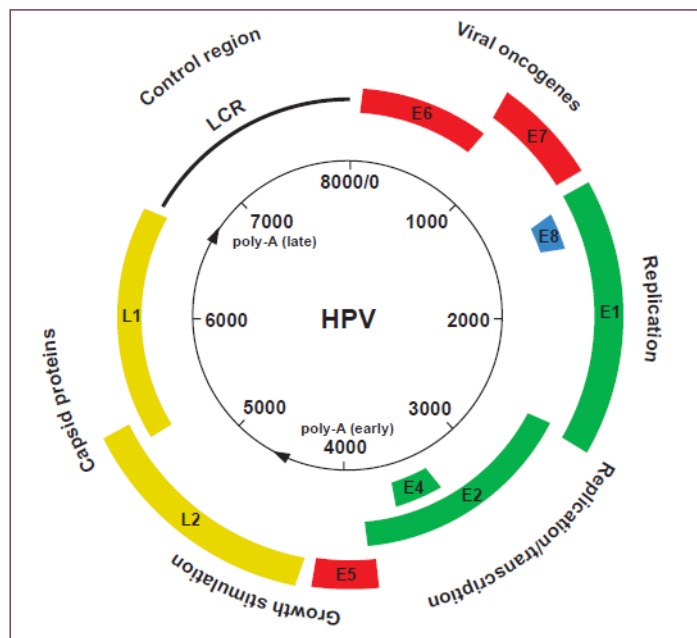
适宜多靶标同时检测的PCR-反向点杂交法

2PP 引物池 + 探针池 → 最大限度保证特异性检测

Primer pool + Prober pool

HPV基因检测和分型检测的目标

- HPV基因结构和分型原则



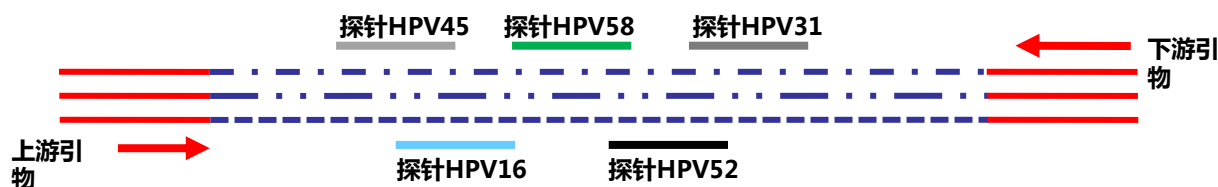
Modern HPV classification

- Based on DNA sequence differences within the coding regions of the early proteins E6, E7 and the late protein L1
- Genotypes have < 90% DNA sequence homology in these regions; over 130 have been described, to date
 - Subtypes have 90–98% homology within a genotype
 - Variants have $\geq 98\%$ homology within a subtype

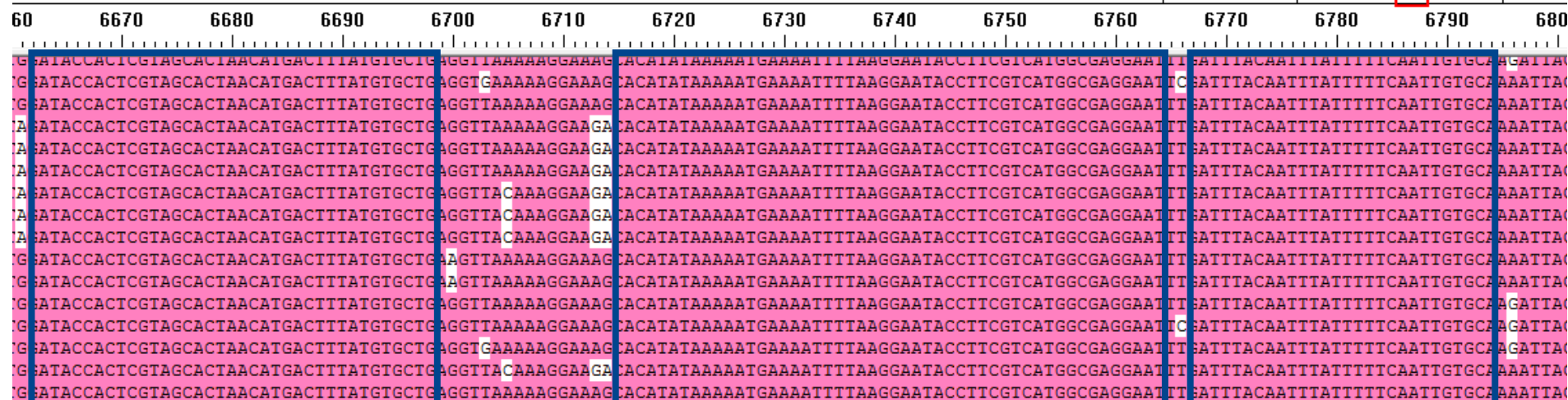
E1	68–85 kD	Helicase function; essential for viral replication and control of gene transcription; similar among types
E6	16–18 kD	Interaction with several cellular proteins; degradation of p53 and activation of telomerase
E7	~ 10 kD	Interaction with several cellular proteins; interaction with pRB and transactivation of E2F-dependent promoters

—Taylor & Francis, “HPV HANDBOOK”, 2004

2PP法的引物探针设计



HPV52 亚型及变体比对



与竞品质量比较

品牌	实验室数	100分实验室数	80-99分实验室数	60-79分实验室数	60分以下实验室数
竞品1	93	83	8	1	1
竞品2	28	3	25	0	0
竞品3	24	20	3	0	0
亚能	78	78	0	0	0

2015年卫生部临检中心第二次室间质评结果

点杂交与实时荧光在HPV分型的区别

荧光基团	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	检测通道
FAM	494	518	1
JOE	520	548	2
HEX	533	559	2
ROX	587	607	3
Cy5	643	667	4

点杂交在检测靶标的数量上优于实时荧光PCR
荧光PCR在同时检测的靶标超过4个时，必须分管，降低了检测样本通量
现有荧光PCR分型产品的IC不规范

6	11	16 ●	18	31	33 ●	35	39	编号
42	43	45	51	52	53	56	58 ●	HPV
59	66	68	73	81	82	83	IC ●	

不同技术平台应用于HPV基因分型的比较

	检测特异性	检测灵敏度	是否分型	全分型的检测 通量	检测时间
PCR-反向点杂交	高	高	全分型	单次最大 96人份	单次实验慢， 样本越多越快
导流杂交	较高	较高	全分型	单次最大 30人份	较快
荧光PCR	高	高	不适合全分型， 需分管	单次最大 24人份	单次实验快， 样本越多越慢
恒温扩增	较高	高	不适合分型	单次最大6人份	单次实验快， 样本越多越慢
杂交捕获	有交叉反应	较高	不适合分型		较慢

运用PCR-反向点杂交技术进行HPV基因分型非常适宜

自动化HPV检测系统



恒温杂交仪

通量大，96个样本
精确温控



全自动一代

杂交自动化
通量为45个样本



全自动二代

快速
自动配液
通量为48个样本
可进行其他项目检测

亚能产品的临床性能验证

Clinical validation of the PCR-reverse Dot Blot human papillomavirus genotyping test in cervical lesions from Chinese women in the Fujian province: a hospitals-based population study. J Gynecol Oncol. 2017 Sep;28(5):e50

HPV基因分型（PCR-反向点杂交法）用于宫颈病变筛查的临床验证 ——基于福建单医学中心的人群研究

入组人群：2008-2014年18-82岁妇科门诊患者，共10442人

- 1.验证方法的可靠性（测序比对）
- 2.验证方法的临床应用价值（临床敏感性）

结果

HPV总阳性率20.57%（2148/10442）

HR-HPV总阳性率18.68%（1951/10442）

HPV单一感染占总感染的67.46%（1449/2148）

用于筛查的临床性能验证结果

应用测序验证方法的特异性，结果符合率99.2% (119/120)

CIN II+	敏感性	特异性	PPV (阳性预测值)	NPV (阴性预测值)
亚能HPV分型检测	90.43	84.83	31.02	99.06
TCT	76.96	92.73	44.65	98.14
CIN III+	敏感性	特异性	PPV	NPV
亚能HPV分型检测	90.61	83.20	21.76	99.42
TCT	80.63	91.32	99.42	98.92

福建省10442人临床筛查数据结果表明亚能HPV基因分型检测可以为临床提供可靠的结果，其具有良好的临床敏感性

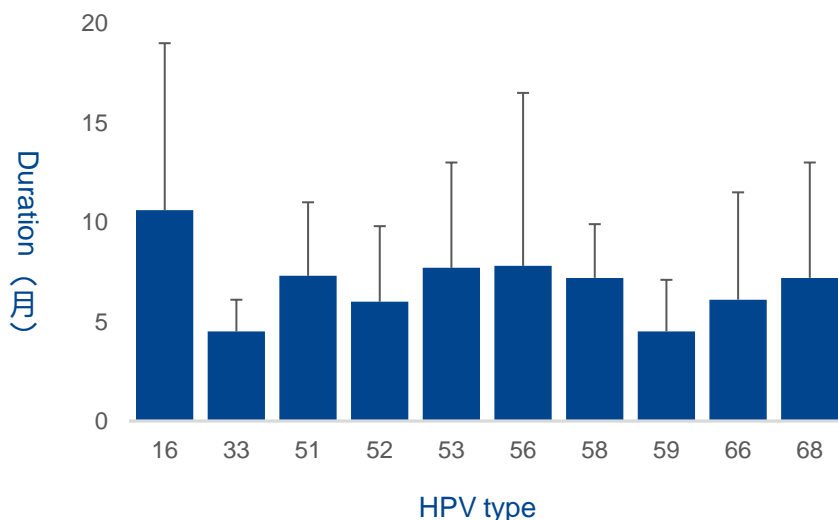
HPV分型用于临床精细管理

	HPV基因型	检出频率	3年CIN3+的绝对风险
高风险 立即转诊 阴道镜	HPV16	26%	16.0%
	HPV18	5.1%	7.4%
	HPV31	9.8%	7.0%
	HPV33 or HPV58	7.7%	7.1%
中风险 uncertain	HPV52	10.9%	4.3%
	HPV45	2.6%	3.9%
低风险 可1年回访	HPV51	5.5%	2.7%
	HPV39, 68 or 35	13.0%	1.6%
	HPV59, 56 or 66	10.3%	1.3%

针对HPV阳性&ASC-US患者，利用HPV分型可减少约**32%**的阴道镜转诊

Schiffman, M. ;. *Gynecologic oncology* 2015, 138 (3), 573-8.

HPV基因分型帮助临床随访判断持续感染



不同高危型HPV自然消退时间不一致，因此以1年间隔作为观察HPV持续感染的标准

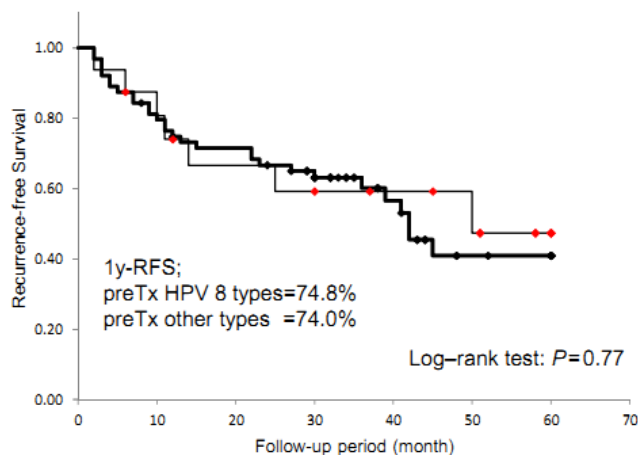
宫颈病变	风险比值（95%置信区间）	
	持续感染	反复感染
LSIL	117.9	73.2
HSIL	813.0	192.7

同一基因型持续感染致HSIL风险为反复感染的4倍

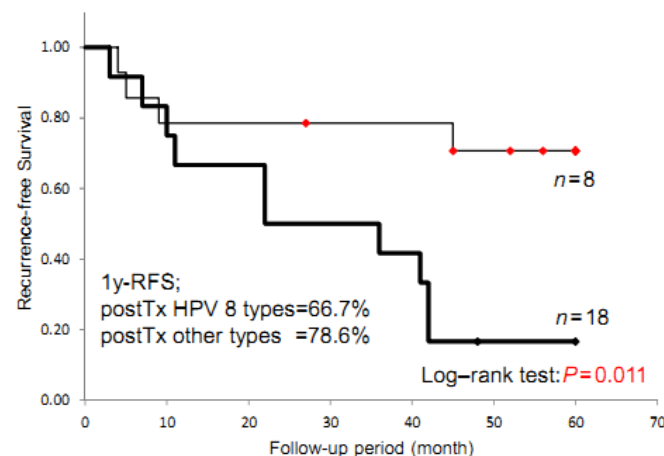
Kjaer, S. K.; *BMJ* 2002, 325, 572.

Cho, H. W.; *Obstetrics & gynecology science* 2015, 58 (1), 40-5.

HPV基因分型在宫颈术后随访的作用



LEEP治疗前不同高危型HPV第1年
整体累积复发风险，无显著差异



LEEP治疗后不同高危型HPV第1年整体累积
复发风险：HPV16/18/31/33/35/45/52/58阳
性人群1年复发率显著高于其它型别感染人
群

Inaba, K. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2014, 40 (2), 554-60.

提高筛查质量

- 欧洲宫颈癌筛查质控指南
 - 有组织的以人群为基础的筛查项目
 - 组织者、详尽计划、检测方法、监察、评价等
- 不论何种筛查策略，质控是关键
 - 对筛查全过程进行质控
 - 取样、组织学诊断、宫颈病变的处理等
- 实验室要求
 - 内质控、外质控、SOP
 - 试剂、标本、实验每一步都要质控
- 妇女覆盖率最好 > 85%

THANKS!



亞能生物技術(深圳)有限公司
Yaneng BIOscience (Shenzhen) Co., Ltd.