

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.05.022

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.05.022>

· 综述 ·

病毒宏基因组学在 HPV 感染相关性疾病中的研究进展

胡慧敏, 马红 综述 李遇梅, 顾文涛, 许辉 审校

(江苏大学附属医院皮肤科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] 人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是乳多空病毒科的一种具有圆形二十面体结构的双链DNA病毒。近年来,基于第二代测序技术的病毒宏基因组学逐渐兴起,它可以直接获得特定环境中的全部病毒核酸信息,并对其进行序列进化分析。可用于研究环境中病毒的多样性、未知病毒的鉴定、实时监测病毒的变异情况以及发现可能存在的新病毒。本文主要就近年来病毒宏基因组学及其相关检测方法在HPV感染相关性疾病的研究进行综述,以期对HPV相关疾病的检测提供新的思路。

[关键词] 病毒宏基因组学; 第二代测序技术; 人乳头瘤病毒; 生殖器疣; 头颈部肿瘤

Research advances of viral metagenomics in HPV infection related diseases

HU Huimin, MA Hong, LI Yumei, GU Wentao, XU Hui

(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

Abstract Human papillomavirus (HPV) is a circular icosahedral double-stranded DNA virus, belonging to Papovaviridae. In recent years, viral metagenomics based on the second generation sequencing technology is gradually emerging, which can obtain all the viral nucleic acid information directly in a specific environment and carry out sequential evolution analysis. It can be used to study the diversity of virus in the environment, identify unknown virus, monitor the variation of virus in real time and find new virus that may exist. In this paper, we review the recent studies of viral metagenomics and related detection methods in HPV infection related diseases, in order to provide new ideas for the detection of HPV related diseases.

Keywords viral metagenomics; the second generation sequencing technology; human papillomavirus; genital warts; head and neck neoplasms

收稿日期 (Date of reception): 2020-05-08

通信作者 (Corresponding author): 许辉, Email: xuhuiran@sina.com.cn

基金项目 (Foundation item): 江苏省妇幼健康科研项目 (F201717); 镇江市社会发展项目 (SH2018032); 江苏省预防医学课题 (Y2018107)。

This work was supported by Maternal and Child Health Project of Jiangsu Province (F201717), Zhenjiang Social Project (No. SH2018032), and the Phylaxiology Project of Jiangsu Province (No. Y2018107), China.

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是乳多空病毒科(Papovaviridae)乳头瘤病毒属中的一种具有圆形二十面体结构的无包膜dsDNA病毒^[1]。迄今,已鉴定出的220多种不同HPV类型^[2],可分为 α 、 β 、 γ 、 μ 和 ν 5个属。目前对于HPV类型的检测主要集中于病毒核酸序列,常用的HPV检测方法有聚合酶链反应类检测方法、核酸杂交法及杂交捕获法等,但这类方法均只针对于已知的HPV序列^[3]。基于第二代测序(next generation sequencing, NGS)技术的病毒宏基因组学(viral metagenomics, VM)方法以特定环境中全部病毒的核酸信息为研究对象,利用边合成边测序或连接法测序原理^[4],主要用于病毒生态学的研究以及对未知病毒的鉴定,弥补了传统检测方法的不足,该方法有望成为人类病毒研究的一种强有力武器。

1 病毒宏基因组学技术

宏基因组学(metagenomics)早在1998年由Handelsman^[5]首次提出,VM则是宏基因组学在病毒学领域的应用。VM技术是通过离心、过滤和核酸酶消化处理,降低样品中宿主源性和细菌、真核生物核酸的浓度,同时保护衣壳内的病毒核酸,再对病毒粒子进行纯化和富集,提取病毒核酸并扩增后选取随机引物进行反转录,利用Klenow酶反应将cDNA合成双链DNA,随后对测序生成的宏基因组序列信息进行生物信息学数据处理和分析^[6],生信分析流程基本相似,包括原始测序数据预处理、数据拼接组装、功能分类注释及基因预测等^[7]。

VM结合测序技术和PCR法极大提高了所获取的病毒信息的丰度和研究效率,其中测序技术的更替起到了决定性作用。相较于以Sanger测序为基础的第一代测序技术,NGS成本更低,通量更高,因此NGS也被称为高通量测序技术(high-throughput sequencing),可同时对数百万DNA分子的测序,一次即可输出大量数据^[8]。主要包括Solexa测序技术、454测序技术、SOLiD测序技术、Complete Genomics测序方法和半导体(Ion Torrent)测序技术^[4]。

VM应用范围广,包括海洋环境、土壤、植物和农业生物技术、人类遗传学和人类疾病诊断等方面均可涉及^[9]。由于VM可以从环境中直接获得病毒核酸信息,而不需要进行病毒分离培养,可以对病毒的起源及遗传进化情况进行快速分

析,其应用范围从环境微生物研究逐渐扩大到公共卫生及常规临床诊断等方面,尤其对于一些病因不明的感染性疾病^[10]和突发的病毒性传染病导致的严重公共卫生事件^[11]中致病性病原体的鉴定和监测。

但VM的临床应用仍存在相当大的困难,包括:缺乏可供横向比较的参考序列数据库、海量数据处理所需的时间和成本高以及对于检测出的病原体治疗方案少等问题都使得VM不会很快成为“统领一切的检测方法”^[12],但随着高通量测序技术的飞速发展,VM的广泛应用将指日可待。

2 常见病毒检测方法在HPV感染相关性疾病中的应用

常见的HPV检测方法包括:实时荧光定量PCR法、第二代杂交捕获法、酶切信号放大法、转录介导扩增技术、DNA微阵列、恒温扩增法、熔解曲线法、表面等离子谐振法、毛细血管电泳法和PCR-荧光偏振法等^[13]。在临床应用中又衍生出许多类似检测方法。如Harlé等^[14]采用基于TaqMan探针技术和Cobas z480的CobasHPV检测法,能准确、快速地检测福尔马林固定石蜡包埋(formalin fixed paraffin embedded, FFPE)和口腔细胞刷所得标本中高危型HPV DNA,证实了CobasHPV检测法适用于临床常规HPV亚型分析和检测。Ma等^[15]提出了等温重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)结合侧流试纸(lateral flow dipstick, LFD)和反向斑点杂交(reverse dot blot, RDB)的HPV快速检测方法,认为该方法是一种灵敏、可靠、经济有效的病毒基因型诊断方法,对发展中国家乃至世界范围内的癌症防治具有重要意义。而各种方法的优化组合、优势互补推动了HPV病毒学研究的快速发展。

2.1 p16免疫组织化学联合HPVRNA原位杂交

Wong等^[16]对2013年至2019年间布莱根妇女医院确诊的97例转移性HPV相关的头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)患者淋巴结的细针穿刺标本进行p16免疫组织化学染色(p16 immunohistochemistry, p16 IHC)及HPV RNA原位杂交(RNA in situ hybridization, RNAISH)。结果表明, p16 IHC检测HPV-HNSCC阳性标本的敏感性为93%, RNAISH与p16IHC的一致率达92%。HPVISH

优势在于可以直接显示肿瘤细胞内整合的病毒DNA或者具有转录活性的信使RNA^[17]。过去,因HPVDNA-ISH对HPV具有高度的特异性且较为经济,它的应用范围比PCR或RNAISH更为广泛。但最近,一项基于北爱尔兰口咽鳞状细胞癌(oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC)患者HPV检测方法的比较研究^[18]表明:在确定回顾性样本中的HPV状态时,与HPV DNA-ISH的90%检测率相比,HPV RNA-ISH能够在95%的p16阳性病例中检测HPV RNA,说明HPV RNA-ISH是确定HPV状态的最有效方法。美国病理学家协会^[19]在评估HPV ISH对HR-HPV检测能力时也发现:对于HR-HPV拷贝数不高(≤ 100)的样品, RNA ISH比DNA ISH具有更好的总体敏感性,可作为p16 IHC检测的补充方法。其较高敏感性的原因可能在于:RNA ISH靶向的是E6和E7 RNA转录本,这些核酸通常比较丰富,因而可以产生更强的信号,也更容易被识别。

2.2 实时定量PCR联合Sanger测序

Trzcinska等^[20]采用实时PCR技术对西奈山医院2012年至2018年期间所有接受HPV检测的129例头颈部鳞状上皮乳头状瘤(squamous papillomas, SPs)患者病理组织石蜡块进行HPV二次筛查。研究人员通过p16免疫组织化学再次确定石蜡块中是否存在活跃的HPV,利用试剂盒提取福尔马林固定石蜡包埋组织切片中的DNA,针对低危型和高危型HPV的L1区域设计引物进行扩增,并对HPV阳性者用HPV16和18特异性PCR进行HPV16/18基因分型。采用LightCycler 480实时PCR技术,对HPV16和18的E6区进行检测。在HPV16/18特异性PCR为阴性的情况下,用GP51和GP61引物对扩增后进行Sanger测序以检测其他HPV基因型。HPV16/18以外的HPV亚型由GenBank中的序列比对确定。Omland等^[21]通过PCR发现221例复发性呼吸道乳头状瘤病患者中有207例HPVDNA阳性,基因型均为HPV6或HPV11。Orita等^[22]利用非定量PCR研究发现,喉鳞状细胞乳头状瘤中高危型HPV阳性率为41.2%,低危型HPV阳性率可达52.9%,认为喉鳞状细胞乳头状瘤的发生与HPV感染相关。但Trzcinska对过去被诊断为高危型HPV阳性的3个病例进行严格的重新评估甚至重复检测发现,这些结果实际上是假阳性,很可能是由于病毒污染所致,且129个SP样品中均未发现高危型HPV。认为以往非定量PCR检测高估了头颈部SPs患者HPV感染的发生率,同时也高估了高危型HPV在头颈部SPs中的重

要性,应阻止常规筛查SPs中的高危型HPV的临床实践。

3 病毒宏基因组学技术在HPV感染相关性疾病中的应用

临床上 α 属HPV感染最为常见,其中低危型HPV常导致良性疣,如与HPV6、11相关的尖锐湿疣^[23]和呼吸道乳头状瘤病^[24]等。而高危型HPV,如HPV16/18在宫颈癌^[25]、肛周癌、阴道癌、阴茎癌、口咽癌及外阴癌^[26]等恶性肿瘤的发生和发展过程中起重要作用。基于第二代测序技术的VM弥补了传统检测方法的不足,在对感染性疾病中病毒的鉴定及分布情况、毒株的变异情况和新型病毒的发现等方面发挥着独特的优势。

3.1 生殖器肛周HPV感染

Xu等^[27]将110例(包括76例男性和34例女性)确诊为肛周生殖器疣(anogenital wart, AGW)患者的疣组织标本通过VM分析样品中所有可能存在的病毒序列,发现HPV是最主要病毒类型。检测到的HPV分别属于11个不同种,其中10个属于 α 属,一个属于 γ 属,还有一种未分类的HPV株。11个种包括29种不同的HPV类型。不仅HPV6和11这两种常见亚型仍占有很高比例,而且HPV7序列在其中2个文库中也处于优势地位。对HPV7完整基因组序列进行系统发育分析,获得4个HPV7全基因组序列,而GenBank中唯一一条HPV7全基因组序列是在1994年由Delius等^[28]提交。Xu等^[27]对进一步收集的190份AGW标本进行流行病学调查,筛选出25份HPV7阳性样品,其阳性率为13.16%(25/190),说明HPV7在AGW中普遍存在,并具有较高的感染率。Poljak等^[29]发现临床上低危型HPV检测试剂盒几乎只针对 α 属,其中包括HPV6和HPV11。2017年世界卫生组织关于HPV疫苗的立场文件^[30]中也提到了9价HPV疫苗的全球范围使用问题,其中也包含HPV6和11,但无论是HPV检测试剂盒,还是HPV疫苗,均未涉及HPV7这一亚型。因此,该研究者认为需进一步扩大研究范围,对来自中国其他地区的更大AGW样本量进行调查,利用VM深入研究HPV7在中国AGW中的流行状况,以便更好地评估将其纳入未来HPV疫苗的必要性的。

3.2 阴道HPV感染

Liu等^[31]收集了88份孕期妇女的阴道分泌物拭子标本,通过文库构建和深度测序,并对原始高

通量测序数据进行生物信息学分析后发现: 孕妇阴道微环境内病毒群落呈多样性分布, 但以HPV为主。研究者对所获得的HPV序列进行BLASTx搜索比对后按种和型对其分类, 发现一个HPV的新基因型, 进化分析显示新HPV株与HPV162在L1基因水平上有71.1%的核苷酸同源性, 与HPV161, HPV162和HPV166聚类在一起, 同属于近年来新HPV病毒发现率最高的 γ -乳头瘤病毒(*gammapapillomavirus*, γ -PV)属。同样运用VM方法, Ling等^[32]也在健康孕妇阴道拭子中分离出一株属于 γ -6 HPV214的新变异体。研究人员证实该HPV株没有与p53相结合E6基因, 在对其全基因组序列进行了进一步测定和分析后推测, 其E7蛋白可能通过包含一个锌指结构域和一段LXCXE序列来弥补E6功能的缺失。关于 γ -PV, Mühr等^[33]学者均认为它是最具分化和生长特性的一个属, 也是乳头瘤病毒家族中最大的一个分支, 可分为27个种和98个基因型。Ure等^[34]对 γ -PV中的HPV154研究时发现, γ 属具有广泛的上皮组织嗜性。但也有学者^[35]研究发现, 一些 γ -PV, 尤其是属于 γ -6的乳头瘤病毒, 还具有黏膜组织嗜性, 在 α -PV阴性的AGW和宫颈癌前病变中均有检出。而Ling等^[32]研究人员仅在100例健康孕妇阴道拭子标本中进行后续的流行病学调查, 该HPV株的致病性仍需更大的样本量及更多的样本类型来进一步阐明。

3.3 皮肤HPV感染

Pastrana等^[36]致力于对免疫缺陷患者皮肤乳头状瘤病毒和多瘤病毒多样性的探索性研究。采集48例WHIM综合征(*patients with warts, hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis Syndrome, WHIM Syndrome*)及疣状表皮发育不良(*epidermodysplasia verruciformis, EV*)等罕见遗传性免疫缺陷患者皮肤样本(活检组织及皮肤拭子), 利用VM分析样本中的病毒序列, 发现HPV序列占主导地位, 可达90%以上。而且单个免疫缺陷患者常感染多种HPV, 甚至从一名患者皮肤样本中分离出多达26种不同HPV类型。Pastrana对这些reads进行比对分析, 鉴定出83个新型HPV完整基因组和35个可疑的新型HPV不完整基因组。发现在WHIM综合征患者中 γ -PV属感染最为常见。以往认为, 健康人皮肤及黏膜表面可脱落少量 γ -PV, γ 属中某些HPV类型可暂时导致皮肤疣的发生, 而其他HPV类型仅与亚临床感染有关。但Bzhalava等^[37]研究表明: 一些高度分化的新 γ -HPV类型, 似乎与鳞状细胞癌(*squamous cell*

carcinoma, SCC)相关。Sias等^[38]也提出 γ -HPV与口咽癌的关系仍需进一步验证。Pastrana的研究还发现EV患者所感染的HPV主要来自于 β 属的HPV5和HPV8, 临床仅表现为扁平疣, 而发育不良的疣状病变亦可发展为SCC, 但健康人感染这两种亚型却不会导致疣的发生。因此, γ 和 β 属的感染机制还有待深入探寻。

3 结语

基于第二代测序技术的病毒宏基因组学, 突破传统病毒检测方法的局限性, 可以直接获取特定环境中的全部病毒核酸信息, 从而研究各病毒的分布情况、对已知病毒的鉴定、实时监测病毒的变异及动态变化, 以及发现可能存在的新病毒。也为临床的疑难危重感染性病例提供了一种更为高效的检测方法, 拓宽了临床医生对于疾病诊断的思路, 并对公共卫生事业的发展起到了积极的推动作用。近年, 新兴的第三代测序技术, 如: 单分子实时测序技术和纳米孔单分子测序技术相较于NGS技术, 具有超长的读长, 且测序周期更短, 无需模板进行扩增, 还可以直接检测表观修饰位点等独特优势, 有望在未来为研究者及临床医生提供一种弥补NGS技术不足的新选择。

参考文献

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments[J]. *Virology*, 2010, 401(1): 70-79.
2. Willemsen A, Bravo IG. Origin and evolution of papillomavirus (onco) genes and genomes[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1773): 20180303.
3. 陈志辽, 林仲秋. HPV感染相关问题的再认识[J]. *中国癌症防治杂志*, 2018, 10(4): 262-266.
CHEN Zhiliao, LIN Zhongqiu. Re-understanding of HPV infection-related issues[J]. *Chin J of Oncol Prev and Treat*, 2018, 10(4): 262-266.
4. 毛亚文, 陈江华. DNA测序技术的发展进程[J]. *亚热带植物科学*, 2018, 47(1): 94-100.
MAO Yawen, CHEN Jianghua. The development process of DNA sequencing technology[J]. *Subtropical Plant Science*, 2018, 47(1): 94-100.
5. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural

- products[J]. *Chem Biol*, 1998, 5(10): R245-R249.
6. Zhang W, Yang S, Shan T, et al. Virome comparisons in wild-diseased and healthy captive giant pandas[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 90.
 7. Lasken RS, McLean JS. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(9): 577-584.
 8. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 133:171-182.
 9. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1): 63-77.
 10. Huang M, Peng M, Gan CH, et al. A case of intracranial molluscum contagiosum virus infection diagnosed by metagenomic sequencing of cerebrospinal fluid[J]. *Acta Virol*, 2019, 63(3): 333-337.
 11. Kafetzopoulou LE, Pullan ST, Lemey P, et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 74-77.
 12. Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(7): 605-615.
 13. 安顺, 鲁清月, 李振红, 等. HPV检测方法及其在宫颈癌筛查中应用的研究进展[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2017, 6(4): 809-810.
AN Shun, LU Qingyue, LI Zhenhong, et al. Research progress on HPV detection method and its application in cervical cancer screening[J]. *Clinical Laboratory Journal. Electronic Edition*, 2017, 6(4): 809-810.
 14. Harlé A, Guillet J, Thomas J, et al. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11313.
 15. Ma B, Fang J, Lin W, et al. A simple and efficient method for potential point-of-care diagnosis of human papillomavirus genotypes: combination of isothermal recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick and reverse dot blot[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(28): 7451-7460.
 16. Wong KS, Krane JF, Jo VY. Heterogeneity of p16 immunohistochemistry and increased sensitivity of RNA in situ hybridization in cytology specimens of HPV-related head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cytopathol*, 2019, 127(10): 632-642.
 17. Outh-Gauer S, Augustin J, Mandavit M, et al. Chromogenic in situ hybridization as a tool for HPV-related head and neck cancer diagnosis. *J Vis Exp*, 2019, (148): 10.3791/59422.
 18. Craig SG, Anderson LA, Moran M, et al. Comparison of molecular assays for HPV testing in oropharyngeal squamous cell carcinomas: a population-based study in northern Ireland[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2020, 29(1): 31-38.
 19. Keung ES, Souers RJ, Bridge JA, et al. Comparative performance of high-risk human papillomavirus RNA and DNA in situ hybridization on College of American Pathologists Proficiency Tests[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(3): 344-349.
 20. Trzcinska A, Zhang W, Gitman M, et al. The prevalence, anatomic distribution and significance of HPV genotypes in head and neck squamous papillomas as detected by real-time PCR and sanger sequencing[J]. *Head Neck Pathol*, 2020, 14(2): 428-434.
 21. Omland T, Lie KA, Akre H, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: HPV genotypes and risk of high-grade laryngeal neoplasia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99114.
 22. Orita Y, Gion Y, Tachibana T, et al. Laryngeal squamous cell papilloma is highly associated with human papillomavirus[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2018, 48(4): 350-355.
 23. 朱琪, 许辉, 李遇梅. CD40、CD40L、IFN- γ 、IL-2水平与尖锐湿疣相关性研究[J]. *中国艾滋病性病*, 2017, 23(11): 1068-1070.
ZHU Qi, XU Hui, LI Yumei. Correlation between the levels of CD40, CD40L, IFN- γ , IL-2 and the onset of condyloma acuminatum in high risk population[J]. *Chinese Journal of AIDS & STD*, 2017, 23(11): 1068-1070.
 24. Eftekhaar NS, Karbalaie Niya MH, Izadi F, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in patients with recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in Iran[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(7): 1973-1976.
 25. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer[J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-182.
 26. Otter S, Whitaker S, Chatterjee J, et al. The human papillomavirus as a common pathogen in oropharyngeal, anal and cervical cancers[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2019, 31(2): 81-90.
 27. Xu H, Ling Y, Xi Y, et al. Viral metagenomics updated the prevalence of human papillomavirus types in anogenital warts[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1291-1299.
 28. Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994;186:13-31.
 29. Poljak M, Kocjan BJ, Oštrbenk A, et al. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update[J]. *J Clin Virol*, 2016, 76 Suppl 1:S3-S13.
 30. World Health Organization. Electronic address: sageexecsec@who.int. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017-Recommendations[J]. *Vaccine*, 2017, 35(43): 5753-5755.
 31. Liu Z, Yang S, Wang Y, et al. Identification of a novel human papillomavirus by metagenomic analysis of vaginal swab samples from pregnant women[J]. *Virol J*, 2016, 13:122.
 32. Ling Y, Wang J, Yin J, et al. Genomic organization of a Gamma-6 papillomavirus metagenomic discovered from vaginal swab samples of Chinese pregnant women[J]. *Virol J*, 2020, 17(1): 44.
 33. Mühr LSA, Eklund C, Dillner J. Towards quality and order in human

- papillomavirus research[J]. *Virology*, 2018, 519:74-76.
34. Ure AE, Forslund O. Characterization of human papillomavirus type 154 and tissue tropism of gammapapillomaviruses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89342.
 35. Bolatti EM, Hošnjak L, Chouhy D, et al. Assessing gammapapillomavirus infections of mucosal epithelia with two broad-spectrum PCR protocols[J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 274.
 36. Pastrana DV, Peretti A, Welch NL, et al. Metagenomic discovery of 83 new human papillomavirus types in patients with immunodeficiency[J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00645-18.
 37. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types[J]. *Virology*, 2013, 445(1/2): 224-231.
 38. Sias C, Salichos L, Lapa D, et al. Alpha, Beta, gamma human PapillomaViruses (HPV) detection with a different sets of primers in oropharyngeal swabs, anal and cervical samples[J]. *Virol J*, 2019, 16(1): 27.

本文引用: 胡慧敏, 马红, 李遇梅, 顾文涛, 许辉. 病毒宏基因组学在HPV感染相关性疾病中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(5): 1124-1129. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.05.022

Cite this article as: HU Huimin, MA Hong, LI Yumei, GU Wentao, XU Hui. Research advances of viral metagenomics in HPV infection related diseases[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(5): 1124-1129. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.05.022