

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.13.004

一类 21 种 HPV 亚型检测试剂盒的性能验证和评价*

冯倚帆¹, 张 帅¹, 刘志坚¹, 宋子威¹, 熊晓芸^{2△}

1. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221002; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009

摘要:目的 对某公司的一类 21 种人乳头瘤病毒(HPV)亚型检测试剂盒进行性能验证。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应对待启用的一类 21 种 HPV 亚型检测试剂盒的准确度、最低检测限、精密度、特异度及抗干扰能力等性能参数进行验证及评价。结果 21 种 HPV 亚型检测试剂盒准确度结果与已知结果一致, 符合率为 100.00%; 21 种 HPV 亚型检测试剂盒最低检测限为 10^4 copy/mL; 21 种 HPV 亚型批内变异系数(CV)为 0.22%~3.40%, 均小于 5.00%, 符合行业标准($CV \leq 5.00\%$); 21 种 HPV 亚型批间 CV 为 0.31%~0.91%, 均小于 5.00%, 符合行业标准($CV < 5.00\%$); 白色念珠菌、大肠埃希菌和解脲支原体与 21 种 HPV 亚型检测试剂盒不存在交叉反应; 干扰物质对检测结果无明显影响。结论 21 种 HPV 亚型检测试剂盒主要性能指标满足相关标准要求, 可常规应用于临床。

关键词:聚合酶链反应; 人乳头瘤病毒; 准确度; 性能验证

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)13-1741-04

Performance verification and evaluation of a detection kit for 21 HPV subtypes*

FENG Yifan¹, ZHANG Shuai¹, LIU Zhijian¹, SONG Ziwei¹, XIONG Xiaoyun^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Abstract: Objective To verify the performance of a detection kit for 21 human papillomavirus (HPV) subtypes produced by a company. **Methods** The performance parameters such as accuracy, minimum detection limit, precision, specificity and anti-interference ability of the 21 HPV subtypes detection kit to be used were verified and evaluated by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** The accuracy results of 21 HPV subtypes detection kit was consistent with known results, and the coincidence rate was 100.00%. The lowest detection limit of 21 HPV subtypes detection kit was 10^4 copy/mL. The intra-assay coefficient of variation (CV) of 21 HPV subtypes ranged from 0.22% to 3.40%, all less than 5.00%, meeting the industry standard ($CV \leq 5.00\%$). The inter-assay CV of 21 HPV subtypes ranged from 0.31% to 0.91%, all less than 5.00%, meeting the industry standard ($CV < 5.00\%$). *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Ureaplasma urealyticum* did not have cross-react with the 21 HPV subtypes detection kit. Interfering substances had no significant effect on the test results. **Conclusion** The main performance indicators of the 21 HPV subtypes detection kit meet the requirements of relevant standards and could be routinely used in clinical practice.

Key words: polymerase chain reaction; human papillomavirus; accuracy; performance verification

人乳头瘤病毒(HPV)感染日益引起公众的关注, PATEL 等^[1]基于对全世界 32 项研究的系统回顾分析发现, 每年肛门-生殖器疣的发病人数为每 10 万人就有 160~289 例。低危型 HPV 感染导致皮肤或黏膜疣状突起, 比如 HPV6、11 型易导致尖锐湿疣。有研究发现, 美国每年有 1 400 万人确诊感染 HPV, 意味着 HPV 的流行范围接近 8 000 万人。HPV 某些高危型长期和反复感染是导致恶变(包括宫颈癌、阴

茎癌、肛门癌、阴道癌、外阴癌等)最主要的因素^[2]。有研究发现, 25% 的头颈鳞状细胞癌与 HPV 感染有关^[3], 60% 的口腔鳞状细胞癌主要原因是 HPV16 型长期感染^[4]。而绝大多数宫颈癌病例均由 HPV 感染引起, 中国约占全球宫颈癌的 1/3, 中国 2015 年新增宫颈癌病例约 98 900 例^[5]。依据《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明: CNAS-CL02-A009: 2018》^[6]和《医疗机构临床实验室管理办

* 基金项目: 江苏省卫生和计划生育委员会科研课题(Q2017010)。

作者简介: 冯倚帆, 女, 主治医师, 主要从事分子生物和生化等方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 48786955@qq.com。

法》^[7]在基因扩增检验领域的应用说明,新试剂在实验室应用于临床检验前要进行性能验证,才能保证实验室对该项目检测的质量控制。徐州医科大学附属医院检验科微生物室新购的人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒[江苏硕世生物科技股份有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)]可检测 21 种 HPV 亚型。为确定本实验室新启用试剂能达到试剂说明书上声明的性能指标,满足临床检测要求,保证检测质量,本研究对 21 种 HPV 亚型检测试剂盒的准确度、最低检测限、精密密度、特异度及抗干扰能力等性能进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 江苏硕世生物科技股份有限公司提供的 24 例标本,经亚能生物膜杂交法实验验证其中 19 例阳性(涵盖该试剂盒可检测的 21 种亚型)和 5 例阴性;江苏硕世生物科技股份有限公司提供的阳性参考品,主要成分为 HPV21 种亚型及参考基因质粒;徐州医科大学附属医院检验科微生物室、妇产科实验室和皮肤科实验室提供的白色念珠菌、大肠埃希菌及解脲支原体阳性标本,这些标本与 HPV 感染部位相同,症状相似,且不在该试剂盒检测范围内。

1.1.2 仪器与耗材 SLAN-96P 荧光定量 PCR 分析仪(购自上海宏石医疗科技有限公司);Eppendorf 高速低温离心机、Eppendorf 金属浴恒温器、Eppendorf 漩涡振荡仪、八联管(A~H)均购自美国 Axygen 公司。

1.1.3 试剂 来自江苏硕世生物科技股份有限公司的核酸提取与纯化试剂盒、人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒(荧光定量 PCR),可检测 21 种 HPV 亚型,包括高危型 HPV16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、82、73 型及低危型 HPV6、11、81 型。

1.2 方法

1.2.1 提取 HPV 核酸 取出标本,振荡混匀,吸取 500 μ L 标本于带螺口的离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,保留沉淀物。加入 100 μ L 宫颈细胞标本裂解液,振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 水浴或干浴 10 min。振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,上清液即为核酸溶液,加入反应试剂就可直接用于检测。

1.2.2 PCR 扩增参数:50 $^{\circ}$ C 5 min 尿嘧啶-N-糖基化酶处理;95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 10 s 变性,58 $^{\circ}$ C 40 s 退火、延伸及检测荧光,其中 58 $^{\circ}$ C 时荧光检测的检测通道为 FAM、VIC、ROX 3 种荧光反应,45 个循环;仪器冷却。PCR 扩增结果分析:反应结束仪器可自动保存结果。空白对照无典型 S 型扩增曲线显示;阳性对照 HPV21 种亚型及参考基因检测呈典型 S 型

扩增曲线,且 Ct 值 \leq 30.0;参考基因 H 孔 FAM 通道扩增曲线呈典型 S 型曲线,且 Ct 值 \leq 36.7。

1.2.3 性能验证指标及验证方法 (1)准确度验证。亚能生物膜杂交法试验已检测的 24 例标本(阳性 19 例和阴性 5 例),严格按照 HPV 核酸提取和扩增程序进行试验。将测定结果与已知结果进行比对,若检测结果不一致,需采用金标准测序法进行验证,符合率 \geq 95%为合格。(2)最低检测限。最低检测限的验证选择该试剂公司的企业阳性参照物(浓度为 10^7 copy/mL),进行 10 倍梯度倍比稀释至试剂盒提供的最低检测限为 10^4 copy/mL,重复检测 20 次。检测结果阳性率 \geq 95%为合格。(3)精密密度试验。选择该试剂公司的企业阳性参照物。批内 CV:在一个批次内连续检测做 10 个重复管,并计算 Ct 值的 CV,参考《核酸扩增检测用试剂(盒):YY/T1182-2010》^[8],计算其 CV \leq 5.00%为合格。批间 CV:连续检测 5 d,每天重复 4 次,并计算 Ct 值的 CV,参考文献[9]计算其 CV $<$ 5.00%为合格。(4)特异度。采用该试剂盒检测与 HPV 感染部位相同、症状相似的病原体及该试剂盒检测范围之外的物质,白色念珠菌、大肠埃希菌和解脲支原体分别加入标本中,以阴性标本作为对照,按照核酸提取和扩增程序进行检测。检测结果显示交叉反应阴性为合格。(5)抗干扰能力。将标本(HPV16 型/HPV31 型)均等分为 5 份,编号 1~5,1 号加入与干扰物质等体积的 TE 缓冲液作为对照组,2~5 号分别加入检测标本中常见的干扰物[宫颈黏液、血红蛋白、白细胞、阴道润滑油(5%)]作为试验组。按照核酸提取和扩增程序进行检测,检测结果为 HPV16、31 型检出为验证合格。

1.3 统计学处理 HPV 检测结果一般为指数值,均需要转化为对数值。故本研究对扩增结果 Ct 值进行统计,并根据公式 $CV = s/\bar{x} \times 100\%$ 计算每一项验证结果的 CV 进行分析。

2 结果

2.1 HPV 亚型检测试剂盒准确度验证结果 24 例标本中 19 例阳性标本试验结果与已知结果均一致,符合率为 100.00%,见表 1。

2.2 最低检测限 该试剂盒的最低检测限为 10^4 copy/mL,阴性率为 100.00%,符合试剂盒声明的最低检测限,最低检测限验证合格。

2.3 精密密度 21 种 HPV 亚型和阳性参照物批内 CV 为 0.22%~3.40%,CV 均小于 5.00%,符合行业标准(CV \leq 5.00%);21 种 HPV 亚型和阳性参照物批间 CV 为 0.31%~0.91%,CV 均小于 5.00%,符合行业标准(CV $<$ 5.00%),精密密度验证合格。

2.4 特异度 该试剂盒与白色念珠菌、大肠埃希菌和解脲支原体不存在交叉反应,与试剂盒说明书声明

一致,特异度验证合格。

2.5 抗干扰能力 已知阳性标本分别加入干扰物(宫颈黏液、血红蛋白、白细胞、阴道润滑油)后,均检出 HPV16、31 型,检测结果及参考基因 Ct 值的 CV 为 0.11%~0.32%,抗干扰能力验证合格。

表 1 HPV 分型检测试剂盒准确度验证结果

标本号	实验结果	已知结果	标本号	实验结果	已知结果
1	35 型	35 型	13	18 型	18 型
2	56 型、81 型	56 型、81 型	14	26 型	26 型
3	52 型、53 型	52 型、53 型	15	33 型	33 型
4	53 型、58 型	53 型、58	16	45 型	45 型
5	31 型、66 型	31 型、66 型	17	68 型	68 型
6	16 型、31 型	16 型、31 型	18	73 型	73 型
7	51 型	51 型	19	82 型	82 型
8	59 型	59 型	20	—	—
9	39 型	39 型	21	—	—
10	6 型	6 型	22	—	—
11	11 型	11 型	23	—	—
12	16 型	16 型	24	—	—

注:—表示结果为阴性。

3 讨论

HPV DNA 载量通常估计为每个细胞的 HPV 基因组拷贝数,与 HPV 感染疾病有很大程度的相关性,并且在区分正常细胞学和异常细胞学方面具有特异性^[10]。目前,针对 HPV 的检测方法主要有核酸分型定性检测、HPV-原位杂交、杂交捕获 HPV DNA 检测、细胞学检测、病理组织学检测等,可用于检测高危和低危的 HPV 亚型^[11]。而现阶段有些 HPV 分型检测试剂采用生物膜杂交法,该方法不仅操作步骤烦琐,而且容易污染环境。杂交法试剂在检测 HPV 时,其灵敏度低于其他 PCR 扩增检测试剂,存在一定比例的漏检^[12]。而采用多重荧光定量 PCR,整个检测过程自动化程度高、操作简便,而且能最大限度避免扩增产物引起的环境污染,具有检测原理简单,易取材且取材量少,报告时效较短,以及收费合理等优势。因此,多重荧光定量 PCR 用于诊断 HPV 感染,对细胞异常人群的风险分层、促进患者管理有很重要意义^[13]。

江苏硕世生物科技股份有限公司的 HPV 试剂盒在仪器正常,以及空白对照、阳性对照、八联管 H 孔 FAM 通道均正常的情况下,核酸扩增根据 HPV 亚型探针荧光标记进行分析。根据参考值(参考范围)在 8 个样本孔(A~H 孔)中的 HPV 亚型扩增曲线呈典型 S 型曲线,且 Ct 值小于或等于参考值,判断相应的 HPV 亚型为阳性;无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值大于参考值,则判断相应的 HPV 亚型为阴性。准确度、最

低检测限、精密度和特异度验证扩增曲线均有效,验证结果为合格。在验证抗干扰能力时,出现一条异常曲线,原因是该八联管上机扩增前掌上离心机损坏,未离心的八联管内有气泡,扩增时出现异常曲线,但其他扩增曲线没有受到干扰,验证结果合格是有效的。

该试剂盒以 HPV 基因组 L1 区为靶区域,设计 21 对各亚型特异性引物和 21 条特异探针,分别以 FAM、HEX、ROX 标记相应亚型的探针。探针为包括 5'端报告基团和 3'端淬灭基团的寡核苷酸,在 PCR 扩增过程中,当探针完整时,由于淬灭基团靠近报告基团,报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收,不发出荧光信号。引物延伸时,与模板结合的探针被 Taq 酶(5'→3'外切核酸酶)切断,报告基团与淬灭基团分离,产生荧光信号,荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线,从而实现对 HPV 在核酸水平上的定性检测。多重荧光 PCR 技术与八联管空间分隔技术相结合,在反应中每个 PCR 反应孔内仅包含 3 对不同亚型的特异性引物及其相应的 3 条分别以 FAM、HEX、ROX 荧光标记的特异探针,检测 3 个通道即可分析出具体亚型,故 HPV 不同亚型之间不可能存在交叉反应。这种检测原理的试剂盒通过多个反应孔实现多种亚型的分型,特异性引物 PCR 的优势在于能够保证高灵敏度和高特异度地鉴定单一亚型,有利于在多重感染中检出不同 HPV 亚型。

此外,《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》^[14]中提到干扰物质的选取应至少包括血红蛋白、白细胞、宫颈黏液、阴道避孕药、女性卫生用品、阴道用抗真菌药物、阴道润滑剂等。本次性能验证选择常规检测标本中常见的干扰物包括宫颈黏液、血红蛋白、白细胞、阴道润滑油。在月经期一般不建议做 HPV 核酸检测,故本次试验未选择女性卫生用品。阴道避孕药和阴道用抗真菌药物一般需要在阴道环境中作用一段时间,使有效成分释放,考虑到很难做到较真实的临床模拟,故未选择。

该试剂盒可一次性检出 21 种 HPV 亚型,包括常见的 18 种高危型和 3 种低危型,涵盖了常见的引起不良转归的亚型。检测过程比较简单、高效,同时也不能忽视其可能存在的问题。由于该试剂盒采用八联管空间分隔技术,导致检测通量相对较低。对于大批量筛查需要多台实时荧光定量 PCR 仪。另外,PCR 检测技术也可能由于受 DNA 提取、样品类型和检测方法局限的影响,甚至存在携带污染、扩增产物污染等造成的假阳性、假阴性。在检测过程中,若存在标本采样、运输、保存条件及实验操作不当等可导致参考基因扩增曲线异常,则该次试验定性结果为无

效。严格按照试剂说明书及实验室标准操作程序进行操作,可最大限度避免无效结果出现。

综上所述,本研究整个性能验证过程均处于有效的质量控制下,做到最大限度保证数据的准确性及可重复性,性能验证符合行业标准需求,这份 HPV 亚型检测试剂盒(荧光定量 PCR)可在本实验室进行临床检验相关诊断。

参考文献

- [1] PATEL H, WAGNER M, SINGHAL P, et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13(1): 39-46.
- [2] DUNNE E F, PARK I U. HPV and HPV-associated diseases [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2013, 27(4): 765-778.
- [3] D'SOUZA G, DEMPSEY A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine [J]. *Prev Med*, 2011, 53(Suppl 1): S5-S11.
- [4] SCHACHE A G, POWELL N G, CUSCHIERI K S, et al. HPV-related oropharyngeal cancer in the United Kingdom: an evolution in understanding of disease etiology [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(22): 6598-6606.
- [5] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明: CNAS-CL02-A009:2018[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.

- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 医疗机构临床实验室管理办法[EB/OL]. [2021-10-10]. http://www.gd.gov.cn/zwgk/wjk/zcfgk/content/post_2715928.html.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 核酸扩增检测用试剂(盒): YY/T 1182-2010[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness, approved guideline: EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- [10] MARONGIU L, GODI A, PARRY J V, et al. Human Papillomavirus 16, 18, 31 and 45 viral load, integration and methylation status stratified by cervical disease stage [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 384-389.
- [11] MANDELBLATT J S, LAWRENCE W F, WOMACK S M, et al. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer [J]. *JAMA*, 2002, 287(18): 2372-2384.
- [12] XU L, OSTRBENK A, POLJAK M, et al. Assessment of the roche linear array HPV genotyping test within the VALGENT framework [J]. *J Clin Virol*, 2018, 98: 37-42.
- [13] SUN Z R, ZHANG R, LIU Z H, et al. Development of a fluorescence-based multiplex genotyping method for simultaneous determination of human papillomavirus infections and viral loads [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 860-869.
- [14] 国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心. 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[S]. 北京:中国标准出版社, 2015.

(收稿日期:2021-11-18 修回日期:2022-04-20)

(上接第 1740 页)

- [10] 徐丽,周运恒,李戡,等. 男性不育患者解脲脲原体感染与精子质量和抗精子抗体的关系 [J]. *武警医学*, 2013, 24(8): 686-688.
- [11] 李世佳,苏卫东,邱丽君,等. 白藜芦醇对人精子冷冻损伤的保护作用 [J]. *中华男科学杂志*, 2018, 24(6): 499-503.
- [12] 刘浩,耿春惠,王维,等. 乙肝病毒对人精液参数和精子 DNA 完整性的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(10): 896-898.
- [13] 刘庆德,王志丰,虞利民. 异氟烷对人精子运动功能和顶体反应影响研究 [J]. *中国性科学*, 2016, 25(2): 105-107.
- [14] 杜鹏,黄志承,史哲,等. 精子顶体反应率与精液相关参数之间关系的研究 [J]. *临床医学工程*, 2013, 20(10): 1206-1208.
- [15] QIAN L, LI Q, LI H. Effect of hepatitis B virus infection on sperm quality and oxidative stress state of the semen

of infertile males [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(3): 183-185.

- [16] 庾伟坚,路瑞静,江凡,等. 孕前保健男性年龄与精子 DNA 碎片、精液常规参数的相关性分析 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(1): 30-33.
- [17] 濮义福,卢少明. 精子 DNA 碎片与复发性流产相关性的系统评价 [J]. *中国男科学杂志*, 2020, 34(1): 40-46.
- [18] 周文,李思楠,周欢群,等. 不育男性精子-透明质酸结合率与精液参数的相关性分析 [J]. *中国性科学*, 2020, 29(3): 4-7.
- [19] 武新梅,陈华,陈允国,等. 感染模式对 HBV 感染者精液质量和精子 DNA 碎片化指数的影响 [J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(1): 79-82.

(收稿日期:2021-12-08 修回日期:2022-04-05)