

• 论 著 •

## 人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒评价

曲守方, 于 婷, 孙 楠, 高尚先, 黄 杰<sup>△</sup>

(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂一室, 北京 100050)

**摘要:**目的 评价人乳头瘤病毒(HPV)核酸检测试剂盒的性能。方法 用 HPV 基因分型参考品作为标准品,按照抽验方案的要求对抽样的 HPV 核酸检测试剂盒[聚合酶链反应(PCR)-荧光探针法]的准确度、特异度和检测限进行评价。结果 准确度和检测限的结果均符合企业产品注册标准的要求,而特异度结果中存在着 HPV 型别交叉反应现象。结论 医疗器械监督抽验工作应将国产和进口医疗器械产品的抽验工作均纳入体系,持续监测产品的性能。

**关键词:**人乳头瘤病毒; 准确度; 特异度; 检测限; 交叉反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0181-02

## Evaluation of human papillomavirus nucleic acid detection Kit

Qu Shoufang, Yu Ting, Sun Nan, Gao Shangxian, Huang Jie<sup>△</sup>

(1st Division of in Vitro Diagnostic Reagents, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the performance of sampling diagnostic kit for detecting human papillomavirus(HPV) nucleic acid. **Methods** HPV genotyping reference materials was selected as the standard. According to the sampling plan, evaluated the accuracy, specificity and detection limits of HPV nucleic acid detection kit(polymerase chain reaction-fluorescent probing method). **Results** The results of accuracy and detection limit were accord with the demands of enterprise product registration standard. But there was cross-reactivity phenomenon for HPV genotype in the specificity. **Conclusion** The sample testing work of medical devices should fully incorporate the domestic and imported medical devices into the system and continue to monitor the performance of these products.

**Key words:** human papillomavirus; accuracy; specificity; detection limit; cross-reaction

宫颈癌是全球妇女中发病率仅次于乳腺癌的恶性肿瘤,在女性生殖器肿瘤中占首位。大量的研究表明,90%以上的宫颈癌伴有人乳头状瘤病毒(HPV)感染,其中高危型 HPV 感染与宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变(CIN)的发生、发展及预后密切相关<sup>[1-3]</sup>。高危型 HPV 核酸检测结合巴氏细胞涂片筛查,作为有效的宫颈癌筛查手段可以检出宫颈癌及其癌前病变。目前 HPV 分型检测主要采用分子生物学的方法检测 HPV 的核酸,包括聚合酶链反应(PCR)-荧光法、PCR-反向点杂交法、杂交捕获-化学发光法以及基因芯片法等方法<sup>[4-6]</sup>。国内 HPV 核酸检测试剂盒主要针对高度保守的编码晚期蛋白的 L1 基因或全基因组进行检测。本课题组在前期工作中已经建立了 HPV 基因分型参考品(包括 L1 基因和全基因组)<sup>[7-8]</sup>,并制定了相应的 HPV 核酸分型检测试剂(盒)的行业标准<sup>[9]</sup>。为了加强对 HPV 核酸检测试剂盒的质量监督,2013 年国家食品药品监督管理总局开展了 HPV 检测试剂盒抽验工作。按照抽验方案的要求,依据企业的产品注册标准,本研究对抽样的 HPV 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)的准确度、特异度和检测限等项目进行检测,从而对抽验的试剂盒质量进行评价,了解国内 HPV 核酸检测试剂盒的质量现状。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** 荧光定量 PCR 仪 7500,美国 ABI 公司。HPV L1 基因分型参考品(批号:360002-201001),包括 14 种高危型 HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73),3 种中等危险型(26、53、66)和 13 种低危型 HPV(6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81、83、CP8304);HPV 全基因组分型参考品(批号:360003-201101),包括 11 种高危型 HPV(16、18、31、33、35、45、56、58、59、73、82),2 种中等危险型 HPV

(26、66),7 种低危型 HPV(6、11、61、67、69、71、81)和阴性参考品;N1~N5:N1 为沙眼衣原体核酸阳性、N2 为单纯疱疹病毒核酸阳性、N3 为解脲脲原体核酸阳性、N4 为巨细胞病毒核酸阳性及 N5 为 HPV 阴性的正常宫颈细胞提取核酸);浓度为 2 ng/mL 的人类全基因组 DNA 样品,中国食品药品检定研究院提供。人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(批号:20130903)由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供。试剂盒采用荧光探针检测技术结合核酸扩增方法,合并检测 HPV6 型和 HPV11 型的核酸 DNA,并分型检测 HPV16 型和 HPV18 型的核酸 DNA。

**1.2 方法** 将约为  $10^6$  copy/mL 的人乳头瘤病毒 L1 基因分型参考品中的 HPV6、11、16 和 18,加入人类全基因组 DNA 样品后,稀释为  $10^5$  copy/mL 和  $10^3$  copy/mL 的溶液,分别用于准确度和检测限检测;其余 26 个 HPV 型别稀释为  $10^5$  copy/mL 用于特异度检测。人乳头瘤病毒全基因组分型参考品中的阴性参考品(N1-N5)以及 HPV 67、69、71 和 82 型,用于特异度检测。分别用 HPV 6/11 反应液、HPV16 反应液和 HPV18 反应液检测人乳头瘤病毒基因分型参考品。

## 2 结果

**2.1 准确度** 对试剂盒检测范围内 HPV 6、11、16 和 18 型国家分型参考品进行检测,结果均为阳性,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。符合企业产品注册标准中准确度(阳性符合率)的要求,即对试剂盒检测范围内型别的 HPV 不同型别国家分型参考品或企业 HPV 阳性参比品进行检测,要求全部为阳性结果。

**2.2 特异度** 试剂盒检测范围外的 HPV82 型(全基因组)在 HPV16PCR 反应液中的检测结果为阳性,有交叉反应,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。试剂盒检测

范围外的其他 HPV 型别的国家分型参考品和阴性参考品的检测结果均为阴性。在企业产品注册标准中,要求对试剂检测范围外 HPV 不同型别国家分型参考品或企业 HPV 阴性参比品进行检测,要求全部为阴性结果。

**2.3 检测限** 在企业产品注册标准中要求试剂盒检测范围内的 HPV6、11、16 和 18 型国家分型参考品的检测限均不高于 300 copy/mL。对稀释为  $10^3$  copy/mL 的 HPV L1 基因分型参考品中的 HPV 6、11、16 和 18 溶液进行检测,结果均为阳性,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

### 3 讨 论

随着分子生物学技术的发展,不仅可以从宫颈组织病变中分离到 HPV 核酸 DNA,而且可以对 HPV 核酸 DNA 进行分型。根据与肿瘤的关系,HPV 可以分为低危型和高危型<sup>[10-11]</sup>。低危型 HPV 包括 HPV 6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81 等型别,主要引起生殖道和肛周皮肤等湿疣类病变和 CIN I,较少发生恶变;高危型 HPV 包括 HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82 等,主要引起 CIN II、CIN III 和宫颈癌的发生<sup>[12-13]</sup>。HPV16 型和 HPV82 型均属于高危型 HPV,但是分子流行病学研究表明特别是 HPV16 感染与子宫颈癌密切相关<sup>[14-15]</sup>。研究报道几乎所有的 CIN II、CIN III 都能检测到 HPV 核酸 DNA,其中 75%~93% 是 HPV16 型核酸 DNA<sup>[16]</sup>。因此 HPV 核酸的检测在临床宫颈癌的筛查中具有重要的检测意义。当临床标本检测到高危型 HPV16 型阳性时,再结合细胞学和阴道镜检查,综合检测结果进行相应处理。

由于 HPV 一些型别的基因位点相近,序列很相似,当根据不同基因型的核酸序列设计特异度的引物和探针时,引物和探针与不同 HPV 基因型的序列有一定程度匹配,引物探针能够识别不同基因型从而导致交叉反应现象。在 HPV 核酸检测试剂盒设计时,如果没有全面考虑 HPV 检测限与特异度之间的平衡,也会造成 HPV 型别交叉反应,尤其是高危型别与低危型别之间的交叉。研究报道 HPV16 型特异引物与 HPV 66 型的模板 DNA 易发生错配<sup>[17]</sup>,HPV 66、82 和 53 型是造成高危探针交叉反应的主要型别<sup>[18-19]</sup>。肖克林等<sup>[20]</sup>报道美国 Digene 公司的第二代杂交捕获法(HC2)高危型探针与 HPV 53、66、11 及 cp8304(HPV 81)等基因型发生交叉反应。在人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)的抽验检测中,结果表明 HPV82 型国家分型参考品在 HPV16 PCR 反应液中的检测结果为阳性,即 HPV82 型和 HPV16 型有交叉反应现象。该试剂盒在临床检测中易把 HPV82 型感染诊断为 HPV16 型感染,引起误诊,造成过度治疗并给患者造成很大的心理负担。

在 2013 年医疗器械监督抽验工作中发现有的 HPV 核酸检测试剂盒存在着 HPV 型别交叉反应现象,在日常产品注册检测和其他评价工作中发现个别试剂盒存在着漏检现象和试剂盒中缺少内控的现象。许多国内 HPV 核酸检测试剂盒在设计时只是参考了国外文献报道的 HPV 基因型,没有考虑国内流行的 HPV 基因型,同时有些进口的 HPV 核酸检测试剂盒对国内流行的个别 HPV 基因型的检出也存在着缺陷,从而导致了漏检现象发生。尽管目前尚未进行正式要求,部分 HPV 核酸检测试剂盒在设计时缺少内标,在实验操作中未对质控进行要求,从而影响检测结果的可靠性。这些问题影响了临床检验中 HPV 核酸检测试剂盒的质量。

医疗器械监督抽验工作将督促企业对发现的问题进行分析,促进企业调整试剂盒的探针设计和反应体系,避免漏检和

交叉反应,并重视试剂盒的质控设计,改进产品质量。医疗器械监督抽验工作应将国产和进口医疗器械产品的抽验工作纳入体系,并持续监测产品的性能。

### 参考文献

- [1] 陈雪梅,覃世榕,施丹华,等. 宫颈上皮内瘤变及宫颈癌患者人乳头状瘤病毒感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(24): 3883-3885.
- [2] 宋云焕,李莉. 四价 HPV 疫苗预防宫颈癌、HPV 感染相关疾病 Meta 分析[J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 37(6): 479-482.
- [3] 范文生,李亚里,杨怡卓,等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(7): 745-747.
- [4] 彭敏,宋春林,王夷黎,等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 583-584.
- [5] 陈占国,周武,许张晔,等. 导流杂交方法检测人乳头状瘤病毒分型的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(9): 1345-1348.
- [6] 黄杰,曲守方,包蕾,等. 人乳头瘤病毒基因分型检测方法进展[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1562-1566.
- [7] 黄杰,曲守方,徐任,等. 人乳头瘤病毒基因分型质控品的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 559-562.
- [8] 孙彬裕,曲守方,徐超,等. 人乳头瘤病毒全基因组基因分型国家参考品的建立[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1597-1602.
- [9] 曲守方,孙彬裕,于婷,等. 人乳头瘤病毒核酸(分型)检测试剂(盒)行业标准的验证实验[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2039-2042.
- [10] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical Cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-527.
- [11] Yang MJ, Luo L, Nie K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. J Med Virol, 2012, 84(6): 957-963.
- [12] Dell G, Gaston K. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(12/13): 1923-1942.
- [13] Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study[J]. Lancet, 2001, 357(9271): 1831-1836.
- [14] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2004, 364(9447): 1757-1765.
- [15] 黄雅,冯玉昆. HPV 亚型检测与宫颈癌筛查[J]. 医学综述, 2007, 13(19): 1453-1454.
- [16] 郎景和. 重视女性生殖道癌前病变及交界性肿瘤的诊断与治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2003, 19(8): 449-450.
- [17] Marta MN, Laimonis LA. Human papillomaviruses modulate expression of microRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins[J]. J Virol, 2010, 84(10): 5212-5221.
- [18] Herrero R, Castellsague X, Pawlta M, et al. Human papillomaviruses and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study[J]. J Natl Cancer Int, 2003, 95(1): 1772-1783.
- [19] 孙海魁,陈汶,陈凤,等. 第二代杂交捕获检测人乳头瘤病毒交叉反应对子宫颈筛查的影响[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2013, 20(5): 420-425.
- [20] 肖克林,吴丽娟,王敏,等. 杂交捕获法和 PCR-RDB 法检测妇女 HPV 感染的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 545-547.