

2020 ~ 2022 年度上海及其他省市临床实验室 HPV6 与 HPV11 型核酸检测室间质量评价结果分析

徐 幸, 王国飞, 杨依缙, 肖艳群, 周 靖

(上海市临床检验中心分子生物学室, 上海 200126)

摘要: **目的** 通过开展人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 6 型、11 型核酸检测室间质量评价 (external quality assessment, EQA) 计划, 来评估实验室检测能力, 分析其存在问题, 提高检测质量。**方法** EQA 计划一年两次, 样本盘含阳性样本 4 支, 包括 HPV6, HPV11 强阳性、弱阳性各 1 支, 由具有尖锐湿疣 (condyloma acuminata, CA) 临床表现, HPV6 或 HPV11 阳性患者的宫颈分泌物 (上海市第一妇婴保健院提供) 制成。阴性样本 1 支, 由 C-33A 细胞株 (中科院购入) 培养制成。样本冷链送至各参评实验室, 要求其在规定时间内检测并上传结果。上海市临床检验中心 (以下简称中心) 依据回报结果计算各实验室的成绩。**结果** 6 轮 EQA 活动共计发出样本盘 163 份, 收到有效报告 140 份。实验室合格率 96.43% (135/140), 样本符合率 97.86% (685/700)。假阴性 13 个, 假阳性 2 个, 弱阳性样本占假阴性结果的 76.92% (10/13)。**结论** 实验室 HPV6/11 型核酸检测准确率比较高, 个别实验室弱阳性样本的检出能力有待提高, 通过参加 EQA 计划可及时发现问题并提高检测质量。

关键词: 人乳头瘤病毒; 尖锐湿疣; 室间质量评价

中图分类号: R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 01-179-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.01.034

Analysis of External Quality Assessment Results for HPV6 and HPV11 Nucleic Acid Testing in Clinical Laboratories of Shanghai and Other Provinces and Cities from 2020 to 2022

XU Xing, WANG Guofei, YANG Yixiao, XIAO Yanqun, ZHOU Jing

(Department of Molecular Biology, Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China)

Abstract: Objective To evaluate the testing capabilities of laboratories, analyze existing issues, and improve testing quality, through carrying out the external quality assessment (EQA) of clinical laboratories for human papillomavirus (HPV) type 6 and 11 nucleic acid detection. **Methods** EQA plan was carried out twice a year. Each panel contains 4 positive samples, including one strong positive sample and one weak positive sample of HPV6 and HPV11, made from cervical secretions from patients with clinical manifestations of condyloma acuminata (CA) and positive for HPV6 or HPV11 (from Shanghai First Maternity and Infant Hospital). One negative sample was cultured from the C-33A cell line (from Chinese Academy of Sciences). Samples were sent to participating laboratories by cold chain, and laboratories were required to detect test samples and upload their results within the specified time. Shanghai Center for Clinical Laboratory (SCCL) calculated the scores of each laboratory based on the return results. **Results** A total of 163 sample panels were sent out in the 6 rounds of EQA plan and 140 valid reports were received. The laboratory qualification rate was 96.43% (135/140) and the sample compliance rate was 97.86% (685/700). There were 13 false negative results and 2 false positive results, with weakly positive samples accounting for 76.92% (10/13) of the false negative results. **Conclusion** The detection accuracy of HPV6/11 nucleic acid in each laboratory was relatively high, and the detection ability of weak positive samples in individual laboratories may need to be improved. The laboratory could discover problems and improve its quality management by participating in EQA.

Keywords: human papillomavirus; condyloma acuminatum; external quality assessment

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种小而无包膜的双链 DNA 病毒^[1]。DNA 序列分析发现 HPV 至少有 200 多个基因型, 不同类型的

HPV 引起不同类型的细胞病理变化^[2]。HPV 分为高危型 (high risk, HR)、可能高危型和低危型 (low risk, LR)^[3]。女性外阴感染以 LR-HPV 为主, 如

作者简介: 徐幸 (1995-), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 临床分子生物学检测及质量控制工作, E-mail: xuxing@sccl.org.cn。

通讯作者: 周靖 (1976-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 临床实验室管理工作, E-mail: zhoujing@sccl.org.cn。

HPV6, HPV11等^[4]。HPV6, HPV11感染多表现为尖锐湿疣 (condyloma acuminata, CA) 和复发性呼吸道乳头瘤状病 (recurrent respiratory papillomatosis, RRP) 等^[5-6]。CA潜伏期一般在3周~8个月, 常以亚临床感染形式存在, 传染性强、复发率高, 临床治疗较为棘手^[7-9]。RRP是良性肿瘤, 发病率约为4/100 000万例儿童, 具有复发性、多侵犯声门、远处转移、恶变可能等特点^[10-11]。HPV6, HPV11型核酸检测在临床已广泛开展, 检测方法包括质谱、基因分型和PCR定量等, 临床更多采用基因分型和PCR定量检测^[12]。目前, 国内外缺乏关于实验室HPV6, HPV11检测能力的研究, 本研究自2020年起通过自行制备、验证及评价HPV6, HPV11室间质量评价 (external quality assessment, EQA) 样本, 开展EQA活动, 评估参评实验室的检测能力, 帮助实验室分析问题, 提高检测质量。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 参评实验室: 2020~2022年间参加EQA活动的实验室163家, 包括全国二、三级医疗机构和第三方独立实验室。

1.1.2 EQA阳性样本: 收集具有典型CA临床表现, HPV6, 11型核酸结果阳性患者的宫颈分泌物 (上海市第一妇婴保健院提供), 混合后用生理盐水稀释成Ct值在22和30左右的两个浓度, 0.5ml/支分装。EQA阴性样本: 将C-33A细胞株 (中科院) 培养在DMEM (含10ml/dl胎牛血清) 培养液中, 置37℃, 5ml/dl CO₂培养箱内, 2次/周传代, 第10代时2 000r/min离心, 收集细胞, 生理盐水重悬后调整至10⁴个/ml, 0.5ml/支分装。

1.2 仪器与试剂 CO₂培养箱 (德国Memmert公司); ABI 7500荧光定量PCR仪 (美国Thermo Fisher Scientific公司); Centrifuge 5424R高速离心机 (德国Eppendorf公司); DMEM培养液, 胎牛血清 (Gibco公司); 0.01mol/L磷酸盐缓冲液 (上海生工); HPV6/11型检测试剂盒 (上海之江)。

1.3 方法

1.3.1 EQA方案设计: EQA活动一年两次, 样本盘含5份样本, HPV6, 11高低浓度各1支, 阴性样本1支, 随机编号后冷链至实验室。实验室在样本接收起1周内, 用常规检测系统 (仪器+试剂+方法) 检测并通过网络系统上报。

1.3.2 EQA样本验证与评价

1.3.2.1 PCR+膜杂交法: 抽取样本盘一份, 用HPV分型检测试剂盒 (凯普生物, PCR+膜杂交法) 检测。阳性: Biotin对照和HPV杂交点同时显色, 阳性点为清晰可见蓝色原点。阴性: 只有Biotin

对照及内对照 (IC) 显色。结果判读见图1。

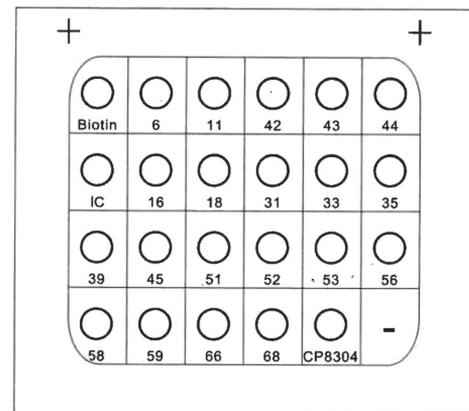


图1 PCR+膜杂交法结果判读图

1.3.2.2 实时荧光PCR法 (qPCR法): 抽取样本盘一份, 用HPV6/11型核酸测定试剂盒 (上海之江) 检测。阴性质控Ct值: UNDET或40, 阳性质控: Ct值≤35。阳性: 待测样本Ct值≤38, 扩增曲线呈典型S型。阴性: 非典型S型。

1.3.2.3 PCR毛细电泳片段分析法: 抽取样本盘一份, 用HPV核酸检测及基因分型试剂盒 [PCR毛细电泳片段分析法 (海尔施基因)] 检测。有效样本的结果中应出现pcDNA (峰高≥500RFU) 和β-globin特异峰。因细胞量太少导致未出现β-globin特异峰, 但出现特异HPV型别的峰时, 仍为有效样本。阳性对照峰高: 750RFU~15600RFU。阳性: 特异HPV型别的峰高≥300RFU。

1.3.2.4 均匀性评价: 参照CNAS-GL003: 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求, 从能力验证样品中随机抽取HPV6, HPV11高低浓度样本各10支, 用试剂盒 (上海之江) 检测, 每支样本重复检测2次。

1.3.2.5 稳定性评价: 参照CNAS-GL003: 2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求, 选取同一批号HPV6, HPV11高低浓度、阴性样本各6支, 2~8℃保存7天, 在结果上报截止日前后3日内, 用试剂盒 (上海之江) 检测, 每支样本重复检测1次。

1.4 统计学分析 依据回报结果统计参评实验室的得分, 回报结果与预期相符计20分, 与预期不符计0分, 得分≥80分EQA成绩合格, <80分不合格。采用Microsoft Excel 2016软件作为数据统计分析工具, 计算实验室的合格率、样本总体符合率、假阳性率和假阴性率。

2 结果

2.1 EQA样本验证与评价结果

2.1.1 PCR+膜杂交法: 见图2。结果依次为HPV6, HPV6, HPV11, HPV11, 阴性, 均符合预期靶值。

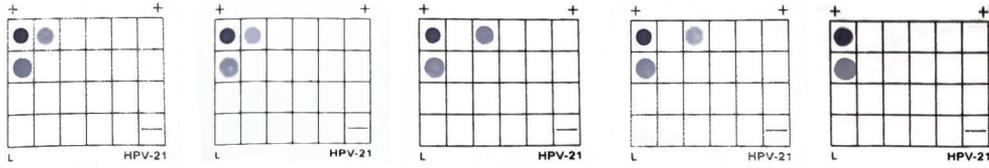


图2 PCR+膜杂交法结果图

2.1.2 qPCR法：见图3。结果均符合预期靶值。 次为 HPV6, HPV6, HPV11, HPV11, 阴性, 均符

2.1.3 PCR毛细电泳片段分析法：见图4。结果依 合预期靶值。

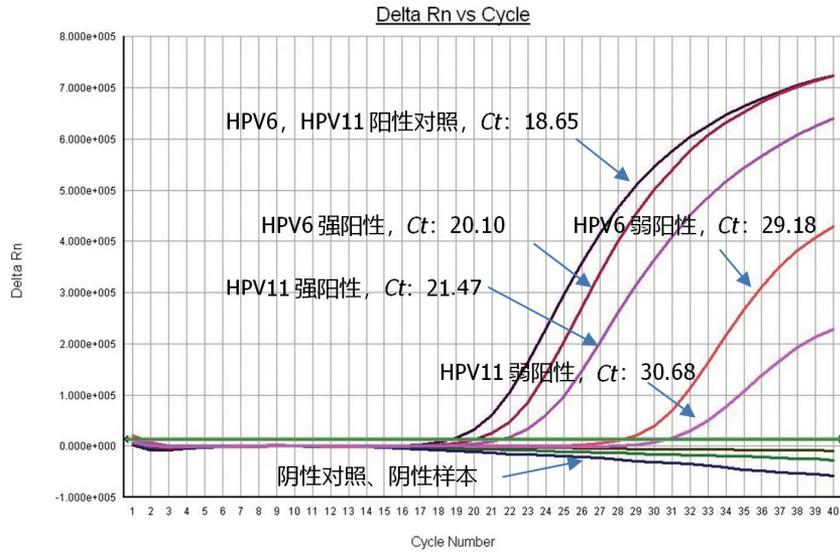


图3 qPCR法扩增曲线图

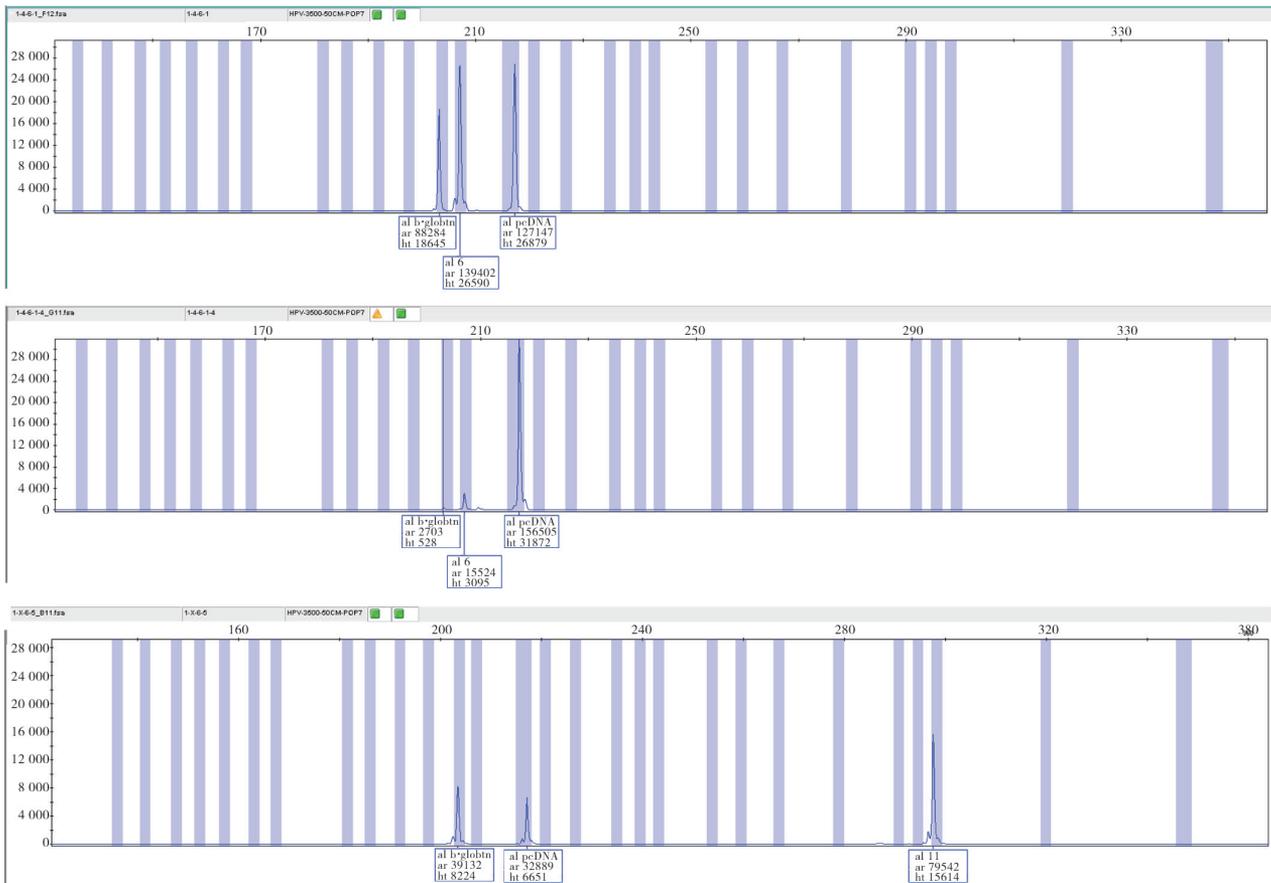
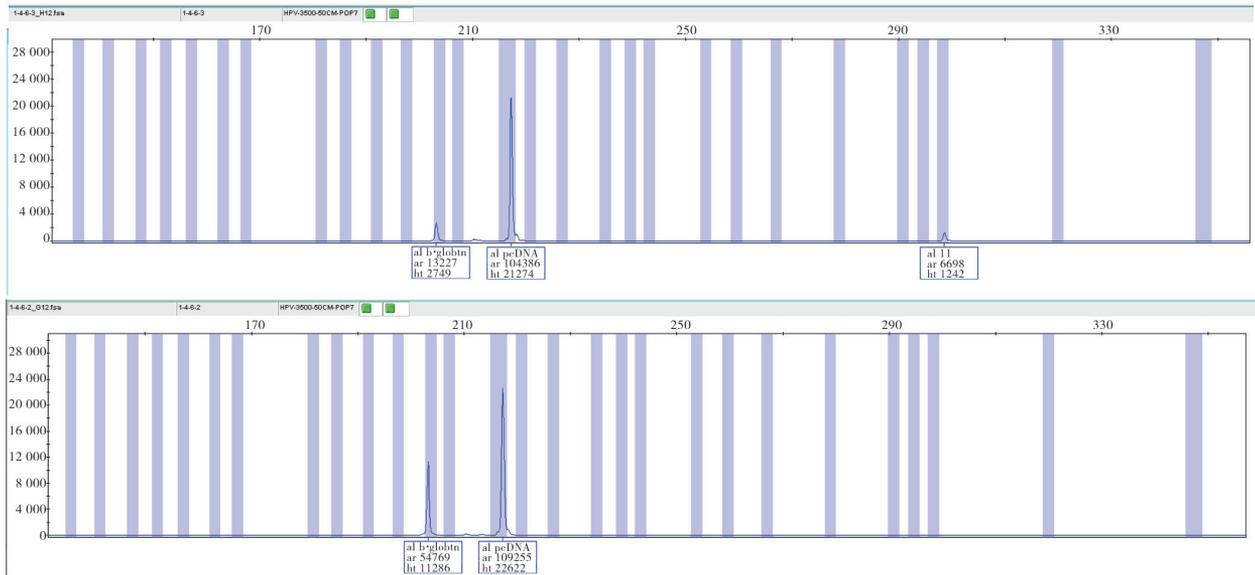


图4 PCR毛细电泳片段分析结果图



续图 4 PCR 毛细电泳片段分析结果图

2.1.4 EQA 样本均匀性和稳定性评价：采用 qPCR 法进行检测，结果均符合预期靶值，见图 5，图 6。

表明样本具有良好的均匀性和稳定性，可满足样本发放和传递的要求。

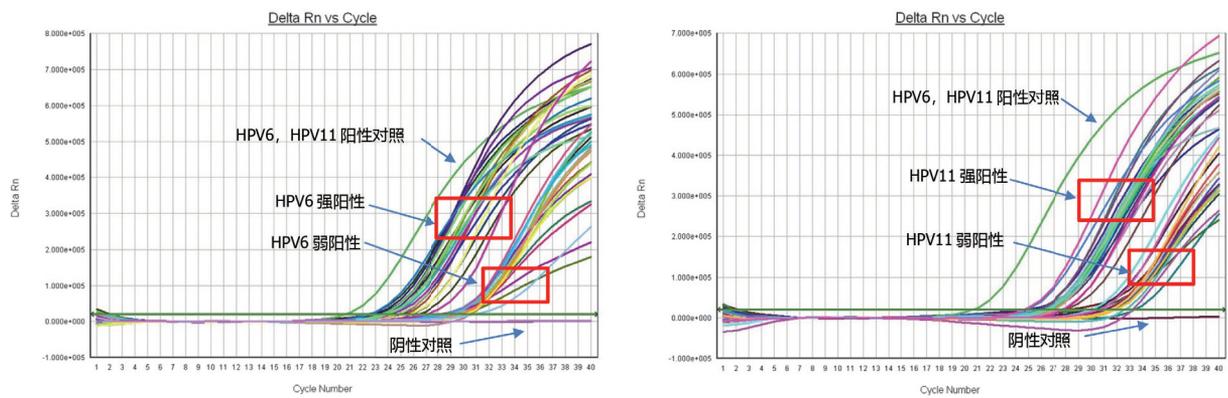


图 5 均匀性评价 qPCR 法扩增曲线图

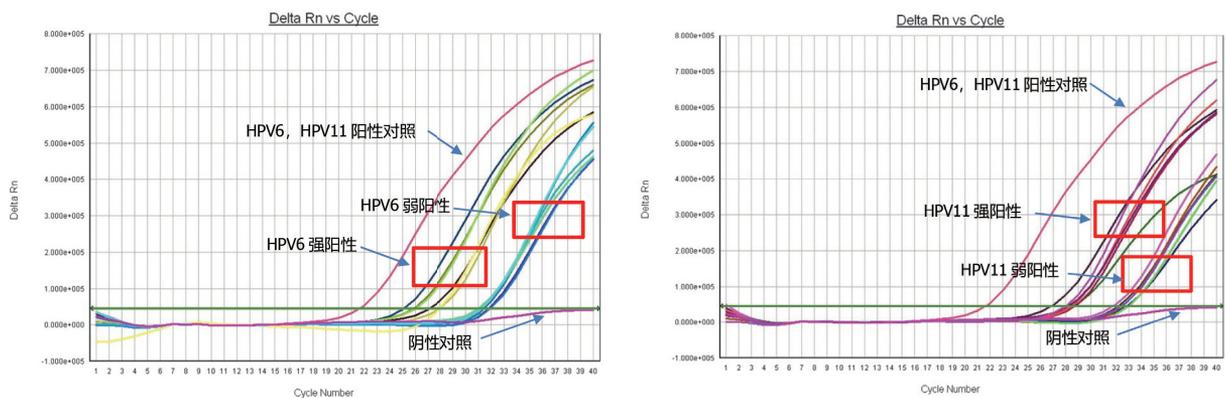


图 6 稳定性评价 qPCR 法扩增曲线图

2.2 参评实验室结果回报 2020 ~ 2022 年共计发出样本盘 163 份，收回有效报告 140 份，有效回报率依次为 90.91%(40/44)，80.95%(51/63) 和 87.50% (49/56)。参评实验室使用最多的试剂品牌为湖南圣湘，其次为上海之江。实验室最常用的方法

为 qPCR 法，占 84.29% (118/140)，其次是杂交法 10.71% (15/140) 和电泳法 5.00% (7/140)。

2.3 EQA 结果 实验室总体合格率为 96.43% (135/140)，三年间合格率依次为 92.5%(37/40)，98.04%(50/51) 和 97.96% (48/49)。样本总体符合

3 讨论

准确检出 HPV6, 11 感染对诊断尖锐湿疣 (CA) 和复发性呼吸道乳头瘤状病 (RRP) 具有重要意义, 随着基因检测的检出限越来越低, 检测结果的准确度和可靠性也越来越受到挑战。稀释低浓度水平核酸样品, 扩增定量和传感过程中引入的偏差都给最终结果带来很大的不确定度^[13]。

本研究通过组织 EQA 活动, 对实验室检测质量进行有效评估。报告显示, 错误集中在假阴性, 造成的原因较为复杂, 可总结以下几点: ①试剂储存或运输条件不当导致 Tag DNA 聚合酶活性不足或丧失; ②实验人员操作不当: 未充分混匀样本和抽提液致核酸获得率低; ③离心机离心效果差导致未分离出目标 DNA; ④ PCR 扩增仪温控、灯源损坏或未正确设置扩增程序等导致扩增失败; ⑤一次性耗材存在 PCR 抑制剂。建议实验室从以下几个方面改进: ①使用弱阳性样本进行试剂质检, 增加弱阳性质控; ②规范实验操作, 强化人员培训, 完善实验室质量管理体系、保证合理分区^[14]; ③定期校准设备如离心机、金属浴、移液器等; ④使用蒸馏水浸泡冲洗、高压灭菌后的一次性耗材, 消除或部分消除外源性抑制剂的影响^[15]。

值得关注的是, 第3轮 EQA 活动中一家实验室出现了2个弱阳性样本假阴性。实验室使用试剂 A (无内标, qPCR 法), 阴阳性质控在控, 仪器与试剂均在有效期内。错误原因为实验人员在抽提核酸时未离心 EQA 样本, 直接向样本管内加入核酸抽提剂, 核酸产物未达试剂 A 检测下限 (1×10^3 copies/ml)。第5轮 EQA 活动中, 一家实验室同样出现了2个弱阳性样本假阴性, 该实验室使用试剂 B (外源性内标, qPCR 法), 阴阳性质控、内标结果均在控, 该内标可监测因核酸提取及扩增过程中 PCR 抑制物、仪器及耗材的不良影响而造成的假阴性。需要注意的是, 因外源性内标在反应中会与目的基因产生竞争性关系, 对反应过程产生影响^[16], 若靶标检测结果为阴性, 即使外源性内标结果正常也应警惕因提取或扩增效率不足所致的假阴性。第5轮 EQA 中, 一家实验室出现了1个弱阳性样本假阴性, 该实验室使用试剂 C (内源性内标, PCR+膜杂交法), 阴阳性质控在控, 假阴性结果的内标信号未起线。在排除样本保存不当、核酸降解等因素后, 推测原因为不良的提取或扩增过程导致该孔扩增失败。建议实验室关注内标情况, 若内标信号未起线, 无论靶基因有无曲线, 均提示实验环节出现问题, 实验室应寻找原因, 复检样本, 防止发生检测错误。

假阳性的原因可能是: ①人员操作 (如交叉污染) 或实验室污染 (如气溶胶)^[17]; ② PCR 仪的性

能差异等质量问题造成非特异扩增。建议实验室: ①若存在核酸污染, 第一时间查找污染源和污染原因, 明确原因后采取有效的去污染措施^[18]; ②加强人员培训, 增加阴性质控数量并随机摆放, 对仪器进行清洁和去核酸, 不同分区使用各自的清洁用具以防交叉污染, 对使用后的实验室清洁消毒^[19]; ③试剂配制、核酸提取、PCR 扩增等环节按要求分区操作; ④检测系统使用前进行方法学性能验证; ⑤因参评实验室收到的样本编号不同, 不排除实验室之间比对数据, 上传错误的实验结果。

本研究使用的 EQA 样本为稀释的临床样本与培养的细胞株制成, 可最大程度模拟临床样本监督实验室检测质量。不足的是低浓度样本 Ct 值在 30 左右, 无法评估实验室检测更低浓度临床样本的能力。中心拟在 2023 年 EQA 计划中改进此不足, 制备发放更低浓度的 EQA 样本, 进一步帮助实验室提高此方面的检测质量。

综上所述, 大部分实验室检测 HPV6, 11 能力良好, 个别实验室弱阳性样本的检出能力有待提高。分析 EQA 长期数据后发现, 参加时间越久, 实验室检测能力提高越明显^[20]。EQA 活动中出现错误的实验室在下次活动中均未再发生相同的错误, 说明实验室通过参加 EQA 活动能够发现检测过程中的不足, 在分析原因并做好纠正措施后, 可有效提高检测质量, 为临床治疗及用药提供有力的帮助。

参考文献:

- [1] 丁宁, 徐文健, 张慧林. HPV DNA 和 mRNA 检测的应用现状和对比分析 [J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(5): 392-396.
DING Ning, XU Wenjian, ZHANG Huilin. Application situation and comparative analysis of HPV DNA and mRNA detection[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2023, 32(5): 392-396.
- [2] GARBUGLIA A R, LAPA D, SIAS C, et al. The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 188.
- [3] GAUTAM A, GEDDA M R, RAI M, et al. Human papillomavirus genome based detection and typing: a holistic molecular approach[J]. Current Molecular Medicine, 2019, 19(4): 237-246.
- [4] 张仕华, 孙辉, 杜彦丹. 人乳头瘤病毒感染与生殖器病变关系的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(4): 48-51.
ZHANG Shihua, SUN Hui, DU Yandan. Advances in research on the relationship between human papillomavirus infection and genital lesions[J]. China Medical Herald, 2020, 17(4): 48-51.
- [5] DIAS M C, STUQUI B, PROVAZZI P J S, et al. Analysis of nucleotide alterations in the E6 genomic region of human papillomavirus types 6 and 11 in

- condyloma acuminatum samples from Brazil[J]. *Advances in Virology*, 2019, 2019: 5697573.
- [6] HU Zheng, MA Ding. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(10): 5217-5236.
- [7] ZHOU Yunying, WANG Lu, PEI Fengyan, et al. Patients with LR-HPV infection have a distinct vaginal microbiota in comparison with healthy controls[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 294.
- [8] 范昉, 尹婧, 邢建军, 等. 男性尖锐湿疣患者 HPV 基因型和临床特征及其复发的危险因素 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(11): 1690-1694.
FAN Fang, YIN Jing, XING Jianjun, et al. HPV genotypes and clinical characteristics of male patients with condyloma acuminatum and risk factors for recurrence[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2023, 33(11): 1690-1694.
- [9] 惠海英, 宫艳艳, 弥鹏. 西安地区女性尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒分型及与复发关系分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(4): 140-142.
HUI Haiying, GONG Yanyan, MI Peng. Study on relationship of human papillomavirus genotyping and recrudescence for female patients with condyloma acuminatum in Xi'an[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(4): 140-142.
- [10] FORTES H R, VON RANKE F M, ESCUISSATO D L, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a state-of-the-art review[J]. *Respiratory Medicine*, 2017, 126: 116-121.
- [11] 周思含, 肖洋, 马丽晶, 等. 幼年型复发性呼吸道乳头状瘤病中人乳头状瘤病毒感染状态与病情变化的相关性分析 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2023, 30(2): 103-106.
ZHOU Sihan, XIAO Yang, MA Lijing, et al. Correlation analysis between HPV infection status and disease development in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis[J]. *Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2023, 30(2): 103-106.
- [12] 冯婷, 李海英, 曾成龙, 等. 西京医院性病门诊 7 712 例尖锐湿疣患者疣体组织 HPV 型别回顾性分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(5): 143-145, 149.
FENG Ting, LI Haiying, ZENG Chenglong, et al. Retrospective analysis of verrucous tissue 7 712 patients with HPV types condyloma acuminatum in venereal outpatient of Xijing Hospital[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(5): 143-145, 149.
- [13] 闻艳丽, 梁文, 刘刚. 数字 PCR 法定量低浓度水平短链 DNA 标准物质的研究 [J]. *中国测试*, 2020, 46(1): 44-49.
WEN Yanli, LIANG Wen, LIU Gang. Quantification of short length and low concentration level DNA reference material based on digital PCR[J]. *China Measurement & Test*, 2020, 46(1): 44-49.
- [14] 王莹, 姚瀚鑫, 刘真意, 等. 新型冠状病毒核酸检测假阳性及假阴性影响因素分析 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(8): 1176-1179.
WANG Ying, YAO Hanxin, LIU Zhenyi, et al. Analysis of influencing factors of false positive and false negative detection of novel coronavirus nucleic acid[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2023, 20(8): 1176-1179.
- [15] 郭洪晨. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 假阴性原因分析 [J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(13): 3131-3132.
GUO Hongchen. Analysis of false negative causes of HBV-DNA detected by fluorescence quantitative PCR[J]. *Chinese Journal of Misdiagnostics*, 2010, 10(13): 3131-3132.
- [16] 何安娜, 张梦怡, 李逢钰, 等. 人乳头瘤病毒 6 型和 11 型通用型含内源性内参的重组酶介导的等温扩增技术检测方法的建立 [J]. *新发传染病电子杂志*, 2022, 7(2): 25-29.
HE Anna, ZHANG Mengyi, LI Fengyu, et al. Establishment of a universal endogenous internally controlled recombinase-aided amplification detection method for human papilloma virus types 6 and 11[J]. *Electronic Journal of Emerging Infectious Diseases*, 2022, 7(2): 25-29.
- [17] 王雪亮, 徐幸, 魏萌, 等. 上海地区 PIK3CA 基因突变检测室间质量评价分析 [J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(5): 376-379.
WANG Xueliang, XU Xing, WEI Meng, et al. External quality assessment for PIK3CA mutation testing in Shanghai area, China[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2020, 38(5): 376-379.
- [18] 王爽, 潘阳, 徐新民, 等. 新型冠状病毒核酸 PCR 检测假阳性核酸污染类型的鉴别方法 [J]. *首都医科大学学报*, 2022, 43(3): 427-432.
WANG Shuang, PAN Yang, XU Xinmin, et al. Identification of nucleic acid contamination in false positive result within detection of SARS-CoV-2 PCR[J]. *Journal of Capital Medical University*, 2022, 43(3): 427-432.
- [19] 况薇, 童玲玲, 王诚. HPV 分型检测技术的质量管理与控制: 基于 PCR-RDB 平台 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(S01): 191-193.
KUANG Wei, TONG Lingling, WANG Cheng. Quality management and control of HPV genotyping and testing technology: based on PCR-RDB platform[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2022, 43(S01): 191-193.
- [20] 钟堃, 方遥, 王艳惠. 临床实验室室间质量评价不同计划的结果评价探讨与研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(2): 162-166, 178.
ZHONG Kun, FANG Yao, WANG Yanhui. Discussion and research on the result evaluation of external quality assessment scheme for clinical laboratory[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(2): 162-166, 178.

收稿日期: 2023-05-01

修回日期: 2023-10-27