

# 应用海藻糖脂核酸免提取技术对宫颈分泌物前处理进行 HPV 核酸检测的实验评价

张 咪, 杨春利, 成 军, 戴玉柱 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院检验科, 杭州 310013)

**摘要:** **目的** 采用海藻糖脂核酸免提取技术在宫颈分泌物人乳头瘤病毒 (HPV) 基因分型检测前处理, 评价该技术在 HPV 检测中的应用价值。**方法** 收集 2023 年 7 月 1 日~9 月 30 日联勤保障部队第九〇三医院 50 例 HPV 检测样本, 并选取 12 份 HPV 核酸检测质控品 (不同亚型), 采用海藻糖脂核酸免提取技术前处理作为实验组, 临床常规前处理作为对照组, 对该免提取技术用于检测 HPV 的准确度、灵敏度和精密度进行评价, 并分析两组方法的相关性。**结果** 实验组中临床样本 (27 例阳性样本和 23 例阴性样本) 和质控品 HPV 的分型结果与对照组一致, 两组符合率 100%, 准确度良好; 实验组检出限达到了 100 copies/ml, 灵敏度较高; 精密度评价结果显示, 高中低三个水平的临床样本和质控品的检测 CV 均 < 5%, 精密度良好; 两组检测结果 (*Ct* 值) 的相关性评价显示, 回归方程为  $Y=2.524+0.901X$ ,  $r=0.963$ , 实验组与对照组间 HPV 核酸检测 *Ct* 值具有良好的相关性。**结论** 海藻糖脂核酸免提取技术可用于临床宫颈分泌物 HPV 核酸检测前处理, 适合临床应用推广。

**关键词:** 人乳头瘤病毒; 前处理; 海藻糖脂核酸免提取技术

**中图分类号:** R446; R373 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 02-191-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.02.036

## Application Evaluation of Nucleic Acid Detection of HPV in Cervical Secretions Based on Algal Glycolipid Nucleic Acid-free Extraction Technology

ZHANG Mi, YANG Chunli, CHENG Jun, DAI Yuzhu (Department of Clinical Laboratory, the 903rd Hospital of the People's Liberation Army, Hangzhou 310013, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the application value of algal glycolipid nucleic acid-free extraction technology in human papillomaviruses (HPV) nucleic acid of cervical secretions. **Methods** From July 1 to September 30, 2023, 50 HPV samples were collected from the 903rd Hospital of PLA, and 12 quality control products of HPV nucleic acid were selected. Samples treated with algal glycolipid nucleic acid-free extraction technology were tested as the experimental group, samples treated with clinical routine detection kit were tested as the control group. The nucleic acid-free extraction technology for HPV detection was assessed for accuracy, sensitivity, precision and the correlation between the two methods. **Results** The HPV typing results of clinical samples (27 positive samples and 23 negative samples) and quality control products in the experimental group were consistent with those in the control group, with a 100% coincidence rate and high accuracy. The experimental group's detection limit reached 100 copies/ml, demonstrating great sensitivity. The intra-assay coefficient of variations were less than 5%, indicating good precision. The detection results (*Ct* values) of the two groups showed a strong correlation ( $P<0.05$ ), and the linear regression equation was  $Y=2.524+0.901X$ ,  $r=0.963$ . There was a good correlation between the *Ct* values of HPV nucleic acid testing between the experimental group and the control group. **Conclusion** Algal glycolipid nucleic acid-free extraction technology can be used in clinical cervical secretion HPV nucleic acid detection before treatment, which is suitable for clinical application and promotion.

**Keywords:** HPV; pre-treatment; algal glycolipid nucleic acid-free extraction technology

人乳头瘤病毒 (HPV) 属于乳头瘤病毒科, 女性 5% 的癌症与其感染有关, 包括子宫颈癌、阴道癌等<sup>[1]</sup>。人乳头瘤病毒高危基因型 (high-risk human papillomavirus, HR-HPV) 的持续感染, 是全球第四大常见恶性肿瘤 (宫颈癌) 的主要病因<sup>[2-6]</sup>。

文献 [7-9] 显示 HPV 的持续感染, 是诱发宫颈癌前病变的高发因素。目前, HPV 感染的筛查主要通过分子生物学手段, 无创性和高敏感性使其成为早期检测、监测治疗反应和评估癌症复发的高效工具<sup>[10]</sup>。但大多数 HPV DNA 检测过程需要进行核酸提取,

**基金项目:** 浙江省自然科学基金 (批准号: LGF20H200009); 第九〇三医院自主科研项目 (课题编号: ZJ202301)。

**作者简介:** 张咪 (1995-), 女, 学士, 初级检验技师, 研究方向: 分子生物学, E-mail: 597617938@qq.com。

**通讯作者:** 戴玉柱 (1985-), 男, 硕士, 硕士生导师, 副主任技师, 研究方向: 临床感染性疾病的分子诊断, E-mail: dyz5895@qq.com。

成军 (1967-), 男, 硕士, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 病原诊断学, E-mail: cj1171967@163.com。

该过程存在易发生交叉感染、操作复杂等缺点。所以项目组自主研发了海藻糖脂核酸免提取技术<sup>[1]</sup>，该技术采用专用采样管收集标本，混匀后静置数分钟即可上机扩增，大大缩短了检测时间。该技术具有通用性、方便性、核酸释放率高、保存时间长等优点，已应用于新型冠状病毒、腺病毒、肺炎克雷伯菌等病原的检测。本研究拟采用海藻糖脂核酸免提取技术对宫颈分泌物HPV检测进行核酸前处理，替换临床常用磁珠核酸提取技术并与之对比，从检测结果的准确度、灵敏度、精密度以及相关性分析等方面，综合评价该技术在HPV检测中的应用价值。

## 1 材料与与方法

1.1 研究对象 选取2023年7月1日~9月30日，联勤保障部队第九〇三医院妇产科和体检中心的50例HPV检测样本，每例样本同时采集2份为研究对象。样本收集与实验研究均通过联勤保障部队第九〇三医院医学伦理委员会审核（批准文号：20240111/01/01/001）。其中以每批次检测中HPV质控品（高、中、低）为参考，来确定样本中HPV浓度水平（ $Ct \leq 25$ 为高值， $25 < Ct \leq 30$ 为中值， $30 < Ct \leq 35$ 为低值）。

1.2 试剂与仪器 海藻糖脂免提取技术试剂<sup>[1]</sup>为所在实验室自主研发；磁珠法核酸提取试剂盒（圣湘生物科技股份有限公司）；高危型人乳头瘤病毒核酸（分型）检测试剂盒（荧光PCR法，圣湘生物科技股份有限公司产品）；人乳头瘤病毒（HPV）DNA定值质控品（10种：16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 53, 58, 66型）[普良基因科技（深圳）有限公司产品]；Natch 96核酸提取仪（圣湘生物科技股份有限公司）；ABI 7500荧光PCR仪（Applied Biosystems公司产品）。

## 1.3 方法

1.3.1 样本前处理方法分组：根据是否需要核酸处理方法分为两组：①实验组（免提取组）：将样本直接采集于装配有海藻糖脂免提取液（2ml）的实验专用采样管，震荡30s混匀后，在常温下静置5min；②对照组（提取组）：使用高危型人乳头瘤病毒核酸（分型）检测试剂盒配套的磁珠法核酸提取液，按照试剂说明书步骤提取核酸。

1.3.2 HPV基因分型检测：依照高危型人乳头瘤病毒核酸（分型）检测试剂盒说明书，将两组不同前处理方法处理后的标本分别加入已构建的反应体系，置于ABI 7500型实时荧光定量PCR仪中进行扩增和荧光检测，具体操作和结果判读严格按照操作说明书进行。

1.3.3 准确度分析：选取10例HPV阳性质控品（16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 53, 58, 66型）、2例

阴性质控品以及临床样本50例。实验组分别吸取100 $\mu$ l液体质控品和标本直接加入装配有海藻糖脂免提取试剂（2ml）的实验管中混匀，静置5min后上机扩增，对照组按照核酸提取说明书操作，每个样本重复检测3次。两组扩增所得的定性（阴阳性、型别）结果比较其符合率，进而评价其准确度。

1.3.4 灵敏度分析：选择HPV-16型阳性质控品（ $10^7$  copies/ml）进行倍比稀释，稀释至 $1 \times 10^2$  copies/ml，各浓度均采用海藻糖脂免提取技术进行前处理并重复3次检测，以评估该技术的灵敏度。

1.3.5 精密度分析：基于基质不同的考虑，选取HPV-16型质控品依次稀释至 $10^5$  copies/ml,  $10^4$  copies/ml,  $10^3$  copies/ml以及相对应 $Ct$ 值的临床标本3例，共计6例。作为高、中、低三个浓度水平的两组待测样本，各重复检测10次，计算变异系数（CV），以YY/T1182-2010《核酸扩增检测用试剂（盒）》精密度要求（ $CV \leq 5\%$ ）为评价标准。

1.3.6 相关性分析：选取10例HPV阳性质控品（16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 53, 58, 66型）、2例阴性质控品以及临床样本50例，分别完成海藻糖脂免提取技术和临床常规方法前处理，处理后核酸加入扩增体系进行扩增，两组扩增所得的定量结果（ $Ct$ 值）完成数据相关性评价。

1.4 统计学分析 采用SPSS 27.0软件进行统计学分析，HPV型别与阴阳性结果为计数资料，采用%表示，两组间比较采用 $\chi^2$ 检验； $Ct$ 值为计量资料，采用均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组数据间 $Ct$ 值比较进行Spearman相关性分析。 $P < 0.05$ 为差别具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 准确度和灵敏度分析 50例临床样本及12例质控品，经两组前处理方法后扩增所得结果：50例临床样本中包含27例阳性标本，23例阴性标本，其中阳性标本型别包括HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68型；10例HPV阳性质控品结果为16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 53, 58, 66型，2例阴性质控品均为阴性；说明临床样本和质控品不同型别阳性符合率均为100%，见表1，即实验组采用的前处理技术具有良好的准确性。对16型质控品原液进行倍比稀释，两组前处理方法的检出限均为 $10^2$  copies/ml，即实际两组的检出限均可达到HPV检测试剂盒说明书要求（400 copies/ml）见表2。

2.2 精密度分析 见表3。经计算统计，高、中、低三个浓度水平的临床样本和质控品CV值均 $< 5\%$ ，符合行业标准，说明使用海藻糖脂免提取试剂检测方法精密度良好。

表1 海藻糖脂核酸免提取技术应用于 HPV 的准确度分析

分型	实验组	对照组		总一致性 (%)
		阳性	阴性	
HPV68	阳性	6	0	100
	阴性	0	66	
HPV52	阳性	6	0	100
	阴性	0	66	
HPV53	阳性	5	0	100
	阴性	0	67	
HPV33	阳性	5	0	100
	阴性	0	67	
HPV16	阳性	4	0	100
	阴性	0	68	
其他亚型	阳性	21	0	100
	阴性	0	25	

注：其他8种 hr-HPV 型别包括 HPV18, 31, 35, 39, 51, 56, 58, 66。阳性样本存在多重感染，因此基因型例数大于阳性样本总数。

表2 海藻糖脂核酸免提取技术应用于 HPV 的灵敏度分析

质控品浓度 (copies/ml)	三次重复检测 Ct 值			$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	
$10^7$	20.80	20.28	20.05	$20.38 \pm 0.38$
$10^6$	23.76	23.35	23.21	$23.44 \pm 0.29$
$10^5$	27.23	26.03	27.05	$26.77 \pm 0.65$
$10^4$	29.76	29.36	30.88	$30.00 \pm 0.79$
$10^3$	33.65	34.11	35.07	$34.28 \pm 0.72$
$10^2$	37.68	37.82	36.99	$37.50 \pm 0.44$

表3 海藻糖脂核酸免提取技术应用于 HPV 的精密度分析

标本类型	组别	Ct 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	CV (%)
临床样本	高值	$23.51 \pm 1.03$	4.40
	中值	$29.96 \pm 0.74$	2.48
	低值	$34.33 \pm 0.95$	2.75
质控品	高值	$27.98 \pm 0.76$	2.72
	中值	$30.47 \pm 0.95$	3.11
	低值	$33.42 \pm 0.83$	2.49

2.3 相关性分析 见图1。实验组与对照组所得 HPV 检测 Ct 值定量结果回归方程为  $Y=2.524+0.901X$ ，相关系数  $r=0.963$ ，两种前处理方

法具有良好的相关性 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

HPV 是世界范围内常见的性传播感染性病原，其扰乱正常的社会生活并产生致命的后果（诱发肿瘤），且其感染率近年来呈上升和年轻化趋势<sup>[12]</sup>。疫苗接种和筛查分别是宫颈癌的一级和二级预防策略<sup>[13-16]</sup>。因此，二级预防策略 HPV 筛查显得尤为重要。鉴于检测技术的敏感度和特异度，HPV DNA 检测为首选筛查宫颈癌的方法。

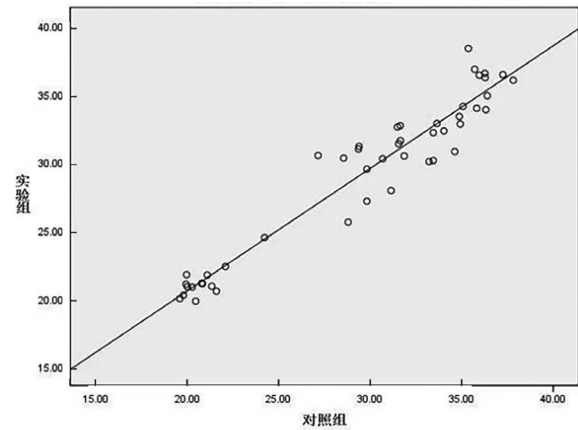


图1 对照组和实验组阳性 Ct 值相关性分析图

目前，临床有大量的商业化 HPV 核酸检测试剂和实验室自建检测方法，这些检测都必须进行核酸提取，传统核酸提取法虽然能够提取到纯度较高的核酸，但该步骤操作繁琐耗时长，容易发生交叉感染<sup>[17]</sup>。免提取技术可以解决这一问题，所在实验室自主研发的海藻糖脂核酸免提取试剂大大优化了核酸提取过程，无需高温裂解，仅需将样本采集于装配有试剂的实验专用采样管，混匀后 5min 即可上机检测，相比常规方法减少了操作步骤，缩短了反应时间，提升了前处理效率。尽管免提取技术在病原检测领域应用广泛<sup>[17-19]</sup>，但尚未有相关临床数据验证免提取技术可应用于 HPV 检测。本研究将海藻糖脂核酸免提取技术融入临床常规的 HPV DNA 检测方法中，发现该方法有准确度好、精密度好、灵敏度高、不影响试剂盒原有检测性能等特点。此外，使用两种方法定量检测所得 Ct 值经相关性分析，两组数据有较好的相关关系，且型别结果符合率为 100%，说明海藻糖脂免提取方法同样适用于 HPV 检测前处理。海藻糖脂免提取试剂凭借其自有的通用性、方便性、核酸释放率高、保存时间长等优点，弥补了现有常规检测操作繁多、易发生交叉感染的不足，适合在临床推广应用。

然而，本研究所建立的方法也存在一定的局限性：①本研究虽同目前临床常规检测方法具有相当的检测性能，但可能存在样本选择的区域时间

范围和数量带来的实验结果影响,且验证样本量少且缺乏客观的多中心的临床性能评价;②本研究方法中所使用的实验室自主研发免提取试剂仍需临时装配,缺乏成品商品化试剂,该过程可能会给实验结果带来一定误差。因此,本实验室将在进一步探索免提取试剂的更多适用性的同时对该方法进行全面的评估和实现免提取试剂商品化,使其取代现有常规检测方法并更适用于临床。

综上所述,海藻糖脂核酸免提取技术用于 HPV 检测前处理相较于临床常规检测方法有较好的准确度、灵敏度和精密度,且操作简便、不易发生交叉感染和 DNA 丢失,适合在临床应用推广。

#### 参考文献:

- [1] OYOUNI A A A. Human papillomavirus in cancer: infection, disease transmission, and progress in vaccines[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2023, 16(4): 626-631.
- [2] WILLIAMSON A L. Recent developments in Human papillomavirus (HPV) vaccinology[J]. *Viruses*, 2023, 15(7): 1440.
- [3] GAMBOA-HOIL S I. Human papillomavirus in men[J]. *Revista Internacional de Andrologia*, 2023, 21(1): 100325.
- [4] NGO-METZGER Q, ADSUL P. Screening for cervical cancer[J]. *American Family Physician*, 2019, 99(4): 253-254.
- [5] 沈华, 盛晓鹏. HPV 阳性宫颈癌组织中 IGF2BP2 和 RPRD1B 的表达水平及临床价值研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(5): 121-126.  
SHEN Hua, SHENG Xiaojuan. Expression and clinical value of IGF2BP2 and RPRD1B in HPV positive cervical cancer tissues[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(5): 121-126.
- [6] BRUNI L, SERRANO B, ROURA E, et al. Cervical cancer screening programmes and age-specific coverage estimates for 202 countries and territories worldwide: a review and synthetic analysis[J]. *the Lancet Global Health*, 2022, 10(8): e1115-e1127.
- [7] YANG Yueming, XU Lijiang, YUAN Songhua, et al. Optimal screening and detection strategies for cervical lesions: a retrospective study[J]. *Journal of Cancer*, 2024, 15(11): 3612-3624.
- [8] DERBIE A, AMARE B, MISGAN E, et al. Histopathological profile of cervical punch biopsies and risk factors associated with high-grade cervical precancerous lesions and cancer in northwest Ethiopia[J]. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0274466.
- [9] 田美月, 王源, 陈迎弟, 等. HR-HPV 持续感染患者阴道微生态与阴道灌洗液 CCL28 水平表达的相关性研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2024, 39(4): 155-160.  
TIAN Meiyue, WANG Yuan, CHEN Yingdi, et al. Study on the correlation between the vaginal microecology and CCL28 levels expression in the vaginal lavage fluid of patients with persistent HR-HPV infection[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2024, 39(4): 155-160.
- [10] VO D T, STORY M D. Facile and direct detection of human papillomavirus (HPV) DNA in cells using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 59: 101760.
- [11] 中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院. 一种通用型鼻咽拭子核酸免提取试剂及其使用方法、应用: 中国, CN116426608A [P/OL]. 2023-03-07 (2023-07-14). <http://static.tianyancha.com/patent/content/PDF/ooace936ef769c14fcdf33757d4dd6c8.pdf>.  
The 903rd Hospital of People's Liberation Army. The invention relates to a general nasopharyngeal swab nucleic acid free extraction reagent, a method for use and application thereof: China, CN116426608A [P/OL]. 2023-03-07 (2023-07-14). <http://static.tianyancha.com/patent/content/PDF/ooace936ef769c14fcdf33757d4dd6c8.pdf>.
- [12] 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.
- [13] SHEN Ye, HUANG Yanru, WANG Wenbo, et al. Prevalence and genotype distribution of HPV infection among women in Xiamen, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1130226.
- [14] MARKOWITZ L E, SCHILLER J T. Human papillomavirus vaccines[J]. *the Journal of Infectious Diseases*, 2021, 224(12 Suppl 2): S367-S378.
- [15] WANG Renjie, PAN Wei, JIN Lei, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge[J]. *Cancer Letters*, 2020, 471: 88-102.
- [16] LI Mingzhu, ZHAO Chao, ZHAO Yun, et al. Immunogenicity, efficacy, and safety of human papillomavirus vaccine: data from China[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1112750.
- [17] 黄媛媛, 王宇, 周承星, 等. 呼吸道病毒核酸快速检测方案的建立与应用 [J]. *生物工程学报*, 2023, 39(9): 3838-3848.  
HUANG Yuanyuan, WANG Yu, ZHOU Chengxing, et al. Development and application of a rapid scheme for detection of respiratory virus nucleic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(9): 3838-3848.
- [18] 刘丽. 乙型肝炎病毒核酸免提取荧光定量 PCR 方法应用价值分析 [J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27(16): 60, 137.  
LIU Li. Application value of quantitative PCR method for non-extraction of hepatitis B virus nucleic acid[J]. *China Medical Device Information*, 2021, 27(16): 60, 137.
- [19] 郭鹏波, 章波, 王彦红, 等. 免提取冻干式百日咳鲍特菌核酸检测方法建立及应用 [J]. *实验与检验医学*, 2021, 39(4): 789-791, 801.  
GUO Pengbo, ZHANG Bo, WANG Yanhong, et al. Establishment of freeze-dried and direct amplification Q-PCR method for *B. pertussis*[J]. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2021, 39(4): 789-791, 801.

收稿日期: 2024-08-26

修回日期: 2024-10-16