

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 123—2015

基于第二代测序技术的 HPV 基因分型 检测标准

2015-01-23 发布

2015-02-01 实施

目 次

目 次	I
前 言	II
1 范围	1
2 缩略语	1
3 术语和定义	1
4 检测工作程序	2
5 实验室工作程序	4
6 检测报告	5
7 受检者资料和样本的保存	5
8 质量控制	6
附录 A(资料性附录) 基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测申请单	6
附录 B (资料性附录) 基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测报告单	7

前 言

本标准按照 GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由深圳市卫生和人口计划生育委员会归口。

本标准负责起草单位：深圳华大基因医学有限公司、深圳华大临床检验中心。

本标准主要起草人：渠新风、张琪、王夏曼、颜妙丽。

本标准为首次发布。

基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测标准

1 范围

本标准规定了基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测的检测对象、受检者资料和样本的采集、实验室工作程序、检测报告、受检者资料和样本的保存以及质量控制等。

本标准适用于使用第二代测序技术的进行 HPV 基因分型检测的机构，对受检者阴道自取样和医生操作下完成受检者宫颈取样进行基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测。

2 缩略语

下列缩略语适合于本标准。

bp: 碱基对 (base pair)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)

HPV: 人乳头瘤病毒 (human papillomavirus)

NCBI: 美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)

A: 腺嘌呤 (Adenine)

T: 胸腺嘧啶 (Thymine)

G: 鸟嘌呤 (Guanine)

C: 胞嘧啶 (Cytosine)

U: 尿嘧啶 (Uracil)

Sanger: 双脱氧链终止法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 宫颈癌

又称子宫颈癌,系指发生在宫颈阴道部或移行带的鳞状上皮细胞及宫颈管内膜的柱状上皮细胞交界处的恶性肿瘤。

3.2 生殖器疣

由人乳头瘤病毒（HPV）感染所致的以肛门生殖器部位增生性损害为主要表现的性传播疾病。大多发生于18~50岁的人群。大约经过半个月至8个月，平均为3个月的潜伏期后发病。此病较为常见，主要通过性接触传播。

3.3 人乳头瘤病毒

无包膜病毒，环状双链DNA，约8kb；是嗜上皮病毒，主要寄宿于人的皮肤、粘膜的上皮细胞。目前发现200多种亚型，有40多种与生殖道感染有关。99.7%宫颈癌患者均能发现高危型HPV病毒，世界卫生组织与国际癌症研究中心均确认高危型HPV病毒的持续感染是宫颈癌发病的主要原因。根据致病性的高低分为高危型及低危型，高危型病毒会导致相关部位高度病变及癌症，低危型病毒会导致相关部位生殖器疣及低度病变。

3.4 第二代测序技术

基于第一代sanger测序技术、利用边合成边测序原理，通过捕捉新合成的末端的标记来确定DNA序列的一种新的测序技术。第二代测序技术具有通量高、成本低等特点，能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定。

3.5 碱基对

碱基对是一对相互匹配的碱基，被氢键连接起来，组成碱基对的碱基包括A、T、G、C、U；是形成DNA、RNA单体以及编码遗传信息的化学结构。

3.6 自取样

指检测对象自行按照取样指导采集样本。

3.7 医生取样

指检测对象经妇科医生操作采集宫颈脱落细胞样本。

4 检测工作程序

4.1 检测对象

HPV检测对象是有性生活史、具有宫颈癌预防需求的女性人群。

4.2 受检者资料和样本的采集、运输与保存

4.2.1 受检者资料收集

受检者基本资料：包括姓名、年龄、取样日期等。

4.2.2 样本采集、运输与保存

样本采集注意事项

- 1) 月经正常妇女，在月经来潮后 10~18 天为最佳检查时间。
- 2) 取样前 48 小时内不要做阴道冲洗，不要用避孕药膏等阴道内用药物。
- 3) 取样前 48 小时最好不要行性生活。
- 4) 取样前不进行醋酸或碘液涂抹。

4.2.3 自取样样本

4.2.3.1 样本采集

受检者严格按照操作说明进行自取样，具体操作如下：

- 1) 自取样套装：包括申请单，宫颈取样刷，DNA 样本保持卡及保持卡转运封存袋。
- 2) 脱下贴身衣物后，将两腿张开，将一条腿放在椅子或平台上（注意保持平衡）。
- 3) 用拇指、食指捏住取样刷的尾部，切勿触碰刷毛。
- 4) 将取样刷缓慢插入阴道中，前后摇动着缓慢推送进阴道，直到捏住取样刷的手指感到刷头略有阻力时即可。
- 5) 将取样刷朝同一个方向缓慢旋转 3~5 圈，取出时刷头逆方向旋转缓慢移出。
- 6) 将取样刷头在保持卡的样本涂布区域反复涂抹 3~5 次，室温晾干保持卡。
- 7) 将保持卡放入转运袋中，密封好。取样刷在保持卡上涂抹完后，将其扔进垃圾箱。
- 8) 保持卡样本涂布区域由“紫色”变为“白色”或“浅粉色”，表示取样合格；否则，需重新取样；在样本保持卡上粘贴唯一编号标签。

4.2.3.2 样本保存与运输

- 1) 保存条件：常温下保存3个月，要求存放环境通风干燥，避免样本保存卡受潮、霉变。
- 2) 运输条件：常温运输，于7天内送达。

4.2.4 医生取样样本

4.2.4.1 样本采集

受检者需在正规医疗机构由妇科医生进行样本采集。

4.2.4.2 样本保存与运输

- 1) 保存条件：保存液2.5ml以上，具有肉眼可见浑浊。于4℃暂存1周。
- 2) 运输条件：必须采用冰袋低温运输，切勿使用干冰，于1周内送抵。

5 实验室工作程序

5.1 样本接收

5.1.1 核对样本编号和送检单。

5.1.2 检查待检样本状态：根据 4.2.2 的要求，对符合要求的样本接收并登记，对不符合要求的样本，拒收、登记并通知重新采样。

5.2 DNA 提取

5.2.1 使用 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒说明书操作，提取采集的脱落细胞样本全基因组 DNA。

5.2.2 提取过程中，设置阴性对照和阳性对照。

5.2.3 提取后的阴性对照和阳性对照进行 index 引物扩增，要求阴性对照无目的条带，阳性对照有清晰的目的条带。

5.3 PCR 扩增

5.3.1 针对 HPV DNA 特异性高度保守区设计多对 index 引物进行 PCR 扩增，扩增过程中设置阴性对照和阳性对照。

5.3.2 PCR 扩增后利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物条带，条带应该明亮清晰，片段大小正确，阴性对照无目的条带，阳性对照有清晰的目的条带。

5.3.3 PCR 产物混合：将同一个 PCR 板的 PCR 反应产物等体积混合。

5.4 文库构建与 DAN 测序

5.4.1 将 PCR 产物进行末端修复，通过 3'端加碱基“A”使得 DNA 片段与 5'端带有“T”碱基的特殊接头连接。

5.4.2 使用 Agilent（安捷伦）2100 电泳检测文库的片段大小及产量，使用 Q-PCR 仪检测文库产量；根据 Q-PCR 结果，对文库进行等物质的量混合。

5.4.3 混合后的文库与光学透明玻璃芯片上的接头杂交，使用第二代高通量测序仪进行 DNA 测序，获得样本碱基序列信息。

5.5 数据分析

将获取的样本碱基序列信息与美国国立生物技术信息中心（NCBI）数据库中的 HPV 型别标准序列进行比对，并对比对结果进行统计分析，从而判断是否感染 HPV 及 HPV 的基因型别。

5.6 实验室要求

应符合临床基因扩增检验实验室的硬件要求，遵循分区明确、单一流向、因地制宜、方便使用的原则，避免交叉污染。

6 检测报告

6.1 检测报告包含受检者基本信息、送检单位信息。

6.2 检测报告包含 HPV 具体型别。

6.3 检测报告包括对检测结果的相关解释，基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测的标准报告单参见附录 B。

7 受检者资料和样本的保存

7.1 受检者资料包括送检单、实验室数据记录和实验室检测结果，保存半年，另有要求的除外。

7.2 受检者 HPV DNA 样本保存半年。

8 质量控制

8.1 相关人员应接受生物安全、检测技术等专业培训，持证上岗。

8.2 配备必要的基础设施和适宜的检测环境，对设施和环境进行监控。

8.3 设立阴性、重复对照，确保每次检测的质量。如阴性对照与预期结果不相符时，进行原因分析并采取纠正措施，形成书面记录。

附 录 A

基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测申请单

受检者信息（注：a.带*为必填项 b.请在□处打“√”）

*姓名：_____ *年龄：_____ *联系电话：_____

*地址：_____省_____市/镇_____区/县_____ 邮编：_____

末次月经 _____年_____月_____日 绝经： 是 否 身份证号：_____

*送检医院：_____科室：_____住院/门诊号：_____送检医生：_____

*临床诊断：_____既往病史：_____

*其他送检单位：_____ *取样日期：_____年_____月_____日

检测须知

1. 取样检测前请如实填写上方申请单上的个人信息，我们承诺会对您所有的个人资料进行保密。
2. 本检测适用于有性生活史的女性人群。
3. 您需保证目前处于非月经期，如果月经刚结束，需要在月经期结束 3 天后再进行采样。
4. 您需保证取样前 48 小时内没有做阴道冲洗或者使用阴道内药物。
5. 您需保证取样前 48 小时内没有性生活或者盆浴。
6. 有明显出血病史的受检者禁止采样。
7. 由于个人体质不同，可能会造成取样失败，如需检测，需要重新取样。
8. 在取样过程中或知道结果后，如果由于心理和生理因素造成精神负担，请向当地专业医疗机构咨询本机构作为第三方检测机构，对此不承担责任。
9. 您对这次检测有自主选择权利，如有特殊情况或疑问，请及时向医生反映，以作恰当的处理。

附录 B
(资料性附录)

基于第二代测序技术的 HPV 基因分型检测报告单

基本信息

姓名: _____ 年 龄: _____ 电 话: _____
 送检单位: _____ 送检科室: _____ 送检医生: _____
 原样本编号: _____ 住院(门诊)号: _____ 床 号: _____
 样本类型: _____ 样本采集日期: _____ 华大编号: _____

检测结果

HPV 基因分型检测	检测结果	参考值
HPV16		阴性 (-)
HPV18		阴性 (-)
HPV31		阴性 (-)
HPV33		阴性 (-)
HPV35		阴性 (-)
HPV39		阴性 (-)
HPV45		阴性 (-)
HPV51		阴性 (-)
HPV52		阴性 (-)
HPV56		阴性 (-)
HPV58		阴性 (-)
HPV59		阴性 (-)
HPV66		阴性 (-)
HPV68		阴性 (-)
HPV6		阴性 (-)
HPV11		阴性 (-)

附注:

1. 本实验共检测以上 16 种型别。
2. 国际癌症研究署 (IARC) 2005 年报告: 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 共 14 种 HPV 型别被列为高危致癌型 HPV 型别。HPV6、11 型为低危型, 是引起生殖器疣的主要致病病毒。
3. HPV 阳性代表您现在正处于 HPV 感染期, 并可能存在“宫颈上皮内瘤变 (CIN)”或癌症。详情请咨询临床医生, 作进一步确诊, 如果医生确认您不需要临床处理, 意味着您还没有此类病变, 或病变程度较低, 您的身体有可能会自行清除病变, 这种情况下, 您需要临床确诊后一年内, 再次接受 HPV 检测复查, 以确定您是否康复。
4. 本报告结果只对送检样本负责。

操作者: _____

审核者: _____

报告日期: _____