

人乳头瘤病毒基因分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒基因分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测男性尿道分泌物及女性宫颈分泌物样本中的人乳头瘤病毒 6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83 和 CP8304 型 DNA。

HPV 属于乳多空病毒科，乳头瘤病毒属。其具备组织特异性，只在皮肤及粘膜中增殖，并且不会产生病毒血症。高危型 HPV 病毒持续性感染是导致宫颈癌发生的必要因素。HPV 拥有 100 多种基因型，根据致病性差异大致可分为两类：导致宫颈癌的“高风险”型；引起生殖器疣的“低风险”型。

本试剂盒用于体外定性检测人泌尿生殖道分泌物样本中的人乳头瘤病毒 6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83 和 CP8304 型 DNA 并进行分型；适用于临床人乳头瘤病毒感染的辅助诊断，因未进行相关的临床试验，本产品不能用于宫颈癌筛查的相关用途。

【检验原理】

本试剂盒在 PCR 扩增原理的基础上，根据扩增产物的序列，结合两侧引物的特征，在两条引物之间设计一条与扩增产物能特异性识别的双荧光标记探针。探针采用双荧光标记技术，其 5'端标记报告基团，3'端标记淬灭基团。其中报告基团与淬灭基团在探针完整的条件下会产生荧光能量转移现象，即报告基团受激后不能产生荧光的现象。而若 PCR 扩增过程中有特异靶基因存在，标记探针在退火过程中与目标基因特异性结合，PCR 延伸过程中，当引物延伸到探针位置时，Taq 酶便以其 5'端外切酶的活性将探针酶解，从而使 5'端的报告基团摆脱了 3'端淬灭基团的抑制，恢复荧光特性，通过适当的设备检测扩增产物的荧光强度即可推算出扩增产物的量，实现实时跟踪自动化检测或终点分析 PCR 检测的目的，对人乳头瘤病毒 HPV 核酸进行特异性分析，使用八联管平行检测，可对人乳头瘤病毒进行 6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83 和 CP8304 型 DNA 特异性分析并进行分型，为临床检验提供实验室辅助诊断的依据。

【主要组成成份】

组成成分	规格	数量	生化组成
核酸洗脱液	1.6mL/支	4	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠
石蜡油	1.0 mL/支	3	石蜡油
HPV 酶混合液	140μL/支	1	水生栖热菌 DNA 聚合酶、尿嘧啶糖基化酶
HPV 反应缓冲液 1#	650μL/支	1	HPV6、11、82 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 反应缓冲液 2#	650μL/支	1	HPV16、68、43 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 反应缓冲液 3#	650μL/支	1	HPV18、31、42 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 反应缓冲液 4#	650μL/支	1	HPV33、45、44 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 反应缓冲液 5#	650μL/支	1	HPV52、39、51 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 缓冲液 6#	520μL/支	1	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 扩增液 6#	130μL/支	1	HPV53、56、83 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、乙二胺四乙酸二钠
HPV 反应缓冲液 7#	650μL/支	1	HPV58、59、73 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸
HPV 反应缓冲液 8#	650μL/支	1	HPVCP、66、35 引物探针、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁、乙二胺四乙酸二钠、脱氧核糖核苷三磷酸

组成成分	生化组成	规格	数量
HPV 分型阴性对照	生理盐水	200μL/支	1
HPV 分型阳性对照	生理盐水、6、11、16、18、31、33、35、39、42、43、44、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83 和 CP8304 型质粒	200μL/支	1

【储存条件及有效期】

-20℃下避光保存，有效期 12 个月。开瓶后 4℃避光保存，不得超过 3 天。反复冻融次数不得超过 3 次。运输使用保温包装物，加放-20℃预冷低温冰袋，冰袋量不少于总体积的 20%，密封装箱，在 8℃以下运输，时间不超过 72 小时。

生产日期及失效日期见外包装标签。

【适用仪器】

全自动医用 PCR 分析系统（GeneLight 9800）

【样本要求】

1. 适用标本类型：男性尿道分泌物、女性宫颈分泌物。
2. 采集：

男性：用细小棉拭子伸入尿道约 2~4 厘米，捻动拭子采集分泌物，棉拭子用 1mL 无菌生理盐水洗涤，保存于 1.5mL 无菌样品管中，密闭送检（采集分泌物前 2 小时禁小便）。

女性：用棉拭子将宫颈口过多的分泌物轻轻擦拭干净，更换棉拭子，用生理盐水浸润的棉拭子，紧贴宫颈口粘膜，稍用力转动两周，以取得分泌物，保存于 1.5mL 无菌样品管中，密闭送检。
- 配套的采集设备：一次性使用抗体分型采样盒（生产厂家为：江苏建友医疗科技有限公司），内含一次性使用无菌宫颈采样器 C 型一只， 5ml 保存液瓶一个（内含 2ml 保存液）。
3. 保存：待测分泌物拭子在 2-8℃保存，保存期不应超过 72 小时；在-20℃保存期 1 年，-70℃以下长期保存；标本一经采集，应尽可能快的送至检测实验室。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

（1）取出试剂盒中的核酸洗脱液、HPV 反应缓冲液和酶混合液室温放置，充分融化后振荡混匀，3000~5000g 离心 5 秒。6#反应缓冲液一次性用完，则缓冲液 6#全部加入扩增液 6#管里；若一次性用不完，根据需要的人份数配制反应体系（每人份配置体系：20μL 缓冲液 6#+5μL 扩增液 6#）。

（2）如果一支核酸洗脱液一次性用完，直接取 32μL 酶混合液加至核酸洗脱液中；若需单独配置则取干净离心管，配制核酸洗脱液（每人份配置体系：250μL 核酸洗脱液+5μL 酶混合液）；按照需要计算好试剂用量充分混合均匀，3000~5000g 离心 5 秒，移至标本处理区。
2. 标本处理（标本处理区）

（1）采用厦门安普利生物工程有限公司的核酸提取试剂（闽厦械备 20150083 号）。按待测标本数和对照品数，取样本管做好标记，分别加入裂解液 150μL，裂解液使用前应振摇混悬，然后分别加入待测标本或对照品 50μL，混悬，70 度加热 15 分钟；静置 1 分钟冷却至室温，加入 33μL

裂解液 A0，混悬，室温静置 10 分钟；磁吸附 90 秒，去上清；加入 150μL 洗涤液，混悬，磁吸附 90 秒，去上清；加入 150μL 重复洗涤液，混悬，磁吸附 60 秒，去上清，每管加入 250μL 核酸洗脱液，振荡混匀，室温静置 10min，备用。

（2）按顺序在八联管中分别加入 25μL HPV 反应缓冲液 1~ HPV 反应缓冲液 8，然后分别加入标本处理步骤洗脱液 25μL，然后分别加入石蜡油 15μL，稍微离心，置入荧光 PCR 扩增仪内。

3. 上机检测（扩增检测区）

1) 循环条件设置

38℃5 分钟，95℃ 2 分钟；进入以下循环：95℃ 15 秒，58℃ 50 秒（30 秒后读荧光），40 循环。

2) 仪器检测通道选择

荧光素设定为 FAM、ROX、HEX/VIC，荧光信号收集设在 58℃ 30 秒，具体设置方法请参考仪器使用说明书。

4. 结果分析条件设定

使用 GeneLight 9800 实时跟踪荧光 PCR 仪进行分析时，基线取 2~12 个循环的荧光信号，阈值可以根据仪器噪音情况调整，设定原则以相应通道阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，且 Ct 值不存在或≥40 为准。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照 Ct 值=0，阳性对照所有型别 Ct 值均≤35，否则该次实验视为无效。若对照试验结果有效，检验结果按下列解释报告。

2. 八联管中的各个荧光通道有信号升起表示该标本感染对应分型，具体对应情况参考下表。

反应液编号	1 或 A			2 或 B			3 或 C			4 或 D			5 或 E			6 或 F			7 或 G			8 或 H		
荧光通道	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX	FAM	ROX	HEX
Ct 值	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38	≤38
对应型别	6	11	82	16	68	43	18	31	42	33	45	44	52	39	51	53	56	83	58	59	73	CP	66	35

3. 如果检测样本 Ct 值在 38≤Ct<40 范围内，样本重检。如果重检结果样本 Ct≤38.0，判断为阳性，报告阳性；如果重检检测样本 Ct 值=0 或>38，判断为阴性，报告阴性。

【产品性能指标】

本试剂盒检测阳性参考品符合率 100%，阴性参考品符合率 100%，最低检测限为 5.0×10²copies/mL，批内重复性以及批间差变异系数 CV 均≤5%。

本试剂盒检出结果不受常见外用药物（氟尿嘧啶软膏、鬼臼毒素软膏、米奎莫特乳膏、重组人干扰素 a2b 凝胶）的干扰；本试剂盒不受白细胞及阴道避孕药干扰；宫颈粘液浓度达到 40%及以上时、血红蛋白浓度达到 13.1g/l 及以上时对本试剂盒会产生影响，采样时应避免取到宫颈粘液或血样分泌物；本试剂盒与泌尿生殖道常见病原体（白色念珠菌、化脓链球菌、梅毒螺旋体、阴道毛滴虫）无交叉反应；本试剂盒与临床症状相似的病原体（人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 II 型、淋病奈瑟球菌、解脲脲原体、沙眼衣原体）无交叉反应；

本试剂盒人乳头瘤不同基因型之间不存在交叉反应。

【检验结果的局限性】

样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。若果样本处理时没控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。本试剂盒未设置内标，故不能排除由于样本采集、保存、运输过程失误造成的假阴性结果。

【注意事项】

1. 在实验前，应详细阅读试剂盒使用说明书。

2. 实验室应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范进行管理，实验操作人员必须经过卫生部临检中心组织的临床基因扩增实验室技术人员上岗培训并取得临床基因扩增实验室技术人员上岗证。

3. 实验过程严格分区进行：

第一区：试剂准备区——准备扩增所需试剂；

第二区：标本处理区——待测样本和对照品处理；

第三区：扩增检测区——PCR 扩增检测。

4. 实验操作的各个阶段应使用专用的仪器设备，扩增检测区的物品及 PCR 产物严禁进入试剂准备区和标本处理区，以免造成污染。

5. 试剂准备及样本处理应在生物安全柜中进行。

6. 稍微离心是指利用离心机闪动离心，如离心机无闪动离心功能，可采用 3000g 离心 5 秒。

7. 在标本处理过程中，所涉及到去上清步骤，请尽量吸去上清液，同时避免将沉淀吸掉，以免影响检测准确性。

8. 采集用品、实验操作所需消耗品应一次性使用。

9. 应将样本视为潜在的传染源，操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

10. 工作台及各物品定期使用 10%次氯酸、70%酒精或紫外灯交替处理。

【参考文献】

[1]《体外诊断试剂说明书编写指导原则》

[2]《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

[3]金奇等.《医学分子病毒学》[M].北京:科学出版社,2001.325-345.

[4]C A Heid, J Stevens, K J Livak, et al. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 6: 986-994.

[5] William T Seamam, et al. Comparison of Two PCR-Based Human Papillomavirus Gnetyping Methods. [J] . Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(10). 3437-3445.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门安普利生物工程有限公司

住所：厦门市海沧区阳光路 10 号

联系方式：电话 0592-5656000 传真 0592-5656011 邮政编码：361022 网址：<http://www.amplly.com>

售后服务单位名称：厦门安普利生物工程有限公司

联系方式：电话 0592-5656000 传真 0592-5656011 邮政编码：361022 网址：<http://www.amplly.com>

生产地址：厦门市海沧区阳光路 10 号

生产许可证编号：闽食药监械生产许第 20100057 号

【医疗器械注册证编号】国械注准 20163400699

【说明书核准及修改日期】2016 年 9 月 12 日