

人乳头瘤病毒（16 型,18 型）核酸检测试剂盒（PCR 荧光法）说明书

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒（16 型,18 型）核酸检测试剂盒（PCR 荧光法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于女性宫颈拭子样本中 HPV 16 型和 18 型核酸的定性检测。

人乳头瘤病毒（HPV）能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖，目前已鉴定的 HPV 达 100 多种型别，依据 HPV 与癌症的相关性分为低危型和高危型。HPV16 型和 18 型为最常见的两种高危型病毒。

由于未做相关验证，本产品不能用于如下用途：

①筛查宫颈细胞学检查为 ASC-US（意义未确定的非典型鳞状上皮细胞）结果的患者，以确定是否需要进行阴道镜检查；

②对于 30 岁及以上的女性，通过检测是否有高危型 HPV 感染，与宫颈细胞学检查联合进行宫颈癌筛查，此检测结合细胞学病史和其他风险因素的评估、以及临床诊疗和筛查指南的要求，用于指导患者的管理；

③对于某年龄段（根据临床试验结果而定）女性，通过检测是否有高危型 HPV 感染，进行宫颈癌筛查，此检测结合细胞学病史和其他风险因素的评估、以及临床诊疗和筛查指南的要求，用于指导患者的管理。

此检测不能独立或优先于宫颈细胞学检查应用，不推荐在任何年龄段的人群中单独使用本检测进行宫颈癌筛查；此方法不能代替宫颈细胞学检查。

年龄<30 岁的女性中，HPV 感染率很高，同时自主清除率也很高，因此对这部分人群，如宫颈细胞学检查正常则不应再采用 HPV 检测进行联合筛查，建议仅采用宫颈细胞学方法进行筛查。本试剂检测结果应结合宫颈细胞学检查及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。HPV 核酸检测试剂的应用应符合相关临床诊疗和筛查指南的要求。

【检验原理】

本试剂盒选用乳头瘤病毒（HPV）E1 区作为扩增区域，设计特异引物及特异 Taqman 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对 HPV16/18 型核酸的自动化检测。

【主要组成成分】

组成	主要组成成分	规格
核酸提取液	含 0.2M NaCl、5%Chelex-100	1.8mL×1
HPV 16/18 反应混合液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	14μL×1
HPV16/18 阳性对照	含 HPV16/18 基因组 DNA(重组克隆)	100μL×1
阴性对照	含 0.9%NaCl	100μL×1

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

【储存条件及有效期】

-20℃保存，有效期 12 个月。未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复

冻融不得超过三次。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

具有 FAM 荧光通道的 ABI7500 型荧光 PCR 扩增仪。

注意：使用 ABI 仪器探针模式设置，Reporter Dye: FAM; Quencher Dye: None; Passive Reference: None。

【样本要求】

1. 样本：女性宫颈拭子样本。

2.采集：

应当选用国家批准生产的一次性使用的女性拭子，拭子应当包括套管、棉签杆、塞子，棉签杆与塞子都应连接牢固。样本采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。

先用棉/麻拭子将宫颈口过多的分泌物擦去，用扩阴器扩阴，再换取棉拭子伸入宫颈，通过上皮交界处，直到看不到拭子头，旋转 10~20 秒，取出拭子，将拭子置入无菌玻璃管中，密闭送检。

3. 存放：

2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融。

4. 运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1.样本处理(样本处理区)

(1) 样本试管中加入 1mL 无菌生理盐水(冻存样本使用前在室温融解并充分混匀)，充分震荡摇匀，吸取液体转至 1.5mL 离心管中，12000rpm 离心 5min。弃上清取沉淀加入 50μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打)，混匀后 2000rpm 离心 10sec，100℃水浴或干浴 10min，12000rpm 离心 10min，上清供 PCR 扩增用（如样本裂解产物当天不使用，请于-20℃保存）。

(2) 阴性对照、阳性对照直接取出 50μL，加入 50μL 核酸提取液，混匀后 100℃水浴或干浴 10min。12000rpm 离心 10min，备用。

2.试剂配制 (试剂准备区)

从试剂盒中取出 HPV16/18 反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。

计算需准备样品数 n 份[n=样本数+2 管对照品]。

每测试反应体系配制如下：

试 剂	HPV16/18 反应混合液	Taq 酶
用 量	35.6μL	0.4μL

计算上述各试剂的使用量，加入一适当体积的离心管中，充分混匀后，按 36μL 量分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

3.上样 (样本处理区)

各反应管中分别加入 4μL 的阴性对照、阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管转移至检测区。

4.PCR 扩增及荧光检测（PCR 检测区）

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上,按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度	时 间
1	1	95℃	3min
2	40	94℃	15sec
		60℃	30sec

检测荧光选择：报告基团为 FAM 荧光，淬灭基团为 none,校准通道选择 none.

5.试验结果有效性判断

阳性对照 Ct 值应小于 36，阴性对照 Ct 无数值，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

【阳性判断值】

通过研究确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 参考值为 36。

【检验结果的解释】

选择 FAM 通道，调节 baseline cycler 至 6~15(不同仪器根据实际情况，baseline cycler 可在 2~15 之间变化),阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点，如果部分样本出现噪音线且在阈值以上，应当将该样本判为阴性结果，在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，判断如下：

	判断标准	判断结果
HPV16/18 反应混合液	Ct≤36	阳性
	Ct 值无数值	阴性
	36 < Ct < 40	重复实验，重复结果 Ct<36.0 判为阳性，否则为阴性

【检验方法的局限性】

检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医生参考使用。

【产品性能指标】

1. 检测限: 500copies/反应。
2. 特异性: 本试剂盒与沙眼衣原体(CT)、解脲脲原体（UU）、淋球菌（NG）、HSV-2、人乳头瘤病毒不同型别 HPV6/11/31/33/42/43，交叉反应率不大于 15.0%。
3. 精密度: 一份弱阳性的标本连续重复 10 次检测，其 CT 值的 CV 值不大于 5%。
5. 抗干扰性: 浓度为 0.4g/mL 的血红蛋白、1%的鬼臼毒素酊和 5%的咪喹莫特对检测结果均无影响。
6. 对比试验: 三家临床单位共检测标本 540 份,阳性符合率为 99.05%，阴性符合率为 99.09%，总符合率为 99.07%。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 实验室严格分区操作：

第一区：PCR 前准备区~准备扩增所需试剂。

第二区：样本处理区~待检测样本和对照品的处理。

第三区：检测区~PCR 扩增检测。

4. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
5. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
6. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
7. 加样时应使样品完全放入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
8. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
9. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
10. 工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
11. PCR 反应混合液应避免光低温保存。
12. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986–994.
5. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026–1030.

6. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

住所：杭州市西湖区振中路 210 号

联系方式：

电话：0571-87775858 传真：0571-87775851

售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

联系方式：

电话：400-118-2266 传真：0571-87775851

生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）

生产许可证编号：浙食药监械生产许 20120007 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163402349

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2021.04.02

修改日期：2022.04.25