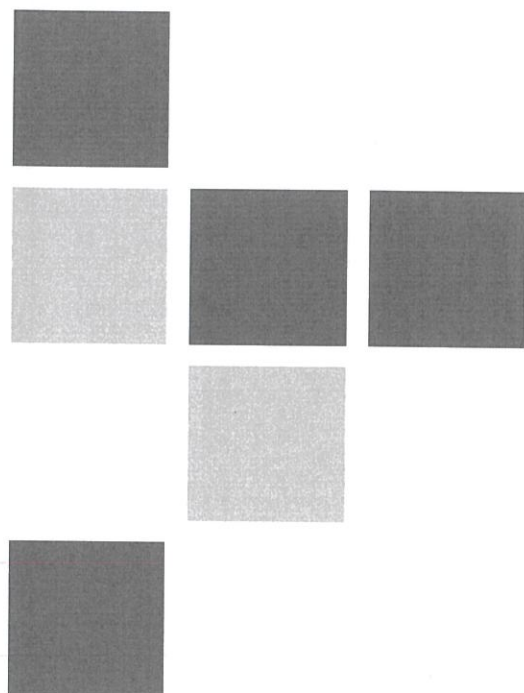




人乳头瘤病毒（23个型）核酸分
型检测试剂盒（荧光PCR法）
说明书



潮州凯普生物化学有限公司
Hybribio Limited

人乳头瘤病毒（23个型）核酸分型检测 试剂盒（荧光PCR法）说明书

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒（23个型）核酸分型检测试剂盒（荧光PCR法）

【包装规格】

32人份/盒

【预期用途】

用于对人宫颈脱落细胞样本中23种人乳头瘤病毒DNA的分型定性检测，包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、6、11、42、43、44、53、81、73、82型。

人乳头状瘤病毒（human papillomavirus, HPV）是一类特异感染人类上皮、黏膜的微小共价双链环状DNA病毒，在电镜下观察该病毒为球形、无包膜、表面有72个壳微粒，直径45~55nm^[1]。其基因组长度约为8000bp，主要由早期基因区（E区）、晚期基因区（L区）和长控制区（long control region, LCR）组成。E区有6个开放式阅读框（ORF），即E1、E2、E4、E5、E6、E7。L区编码主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2。LCR含DNA复制、表达调控元件。

至今发现的HPV约有200多种，其中约40种与生殖道感染相关^[2]。HPV的感染者中，绝大多数是可自愈的，不会以宫颈癌作为最后的结局。极少数高危型HPV阳性的女性会进展为细胞学高度鳞状上皮内病变，表现为CIN2-3或癌^[3]。迄今为止，科学研究已确认子宫颈癌是感染性疾病，致癌原因是人乳头状瘤病毒（HPV），几乎所有的宫颈癌的标本中都可以找到HPV病毒，使宫颈癌成为目前人类所有癌症中唯一病因明确的癌症^[4]。HPV可分为高危型和低危型两种，高危型主要与宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia, CIN）II、III级和宫颈癌的发生

DNA聚合酶 (5U/μL)	96 μL	热启动DNA聚合酶 (5U/μL) 50% 甘油
阳性对照	50 μL	三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液 (TE), <0.01% HPV16、HPV39、HPV58、HPV11、HPV53、 β-globin克隆质粒DNA
空白对照	250 μL	灭菌注射用水 (H ₂ O)
细胞保存液	16mL	磷酸缓冲盐溶液 (PBS)
细胞裂解液	1.6mL	三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl), 氯化钾 (KCl)

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】

-15℃ 以下储存，有效期6个月。避免反复冻融，冻融次数应不超过5次。运输过程中试剂盒采用冰袋加干冰包装进行运输。

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

【适用仪器】

荧光PCR仪：LineGene 9660、ABI7500（具有FAM, HEX/JOE, ROX/Red 610, Cy5荧光检测通道）

【样本要求】

1. 样本采集

使用一次性使用宫颈脱落细胞采集器采集样本，方法如下：由医生以窥阴器暴露宫颈，用棉拭子将宫颈过多的分泌物擦去。将宫颈刷置于宫颈口，轻轻搓动宫颈刷使其顺时针旋转3至5圈。慢慢取出宫颈刷，将其放入装有细胞保存液的样本管中。在管口处将多余的刷柄折断，将刷头留在样本管中，旋紧管盖，做好样品标识并保持洗脱管直立放置，送检验室检

3.1 在对应的PCR反应管中分别加入2 μL处理好的样本DNA、空白对照、阳性对照，盖紧管盖，稍做离心。（反应总体积为20 μL/人份，每次反应需要设置一个阳性对照以及一个空白对照。）

3.2 转移到检测区，放入相应的荧光PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。

4. PCR扩增（在检测区进行）

按表3设置四种荧光检测通道的报告荧光、淬灭荧光；Passive Reference选择none。

表3 荧光检测通道的设定

Detector Name	相应PCR混合液各通道检测项						Reporter Dye	Quencher
	1	2	3	4	5	6		
FAM	16	35	52	66	42	81	FAM	none
HEX	18	39	56	68	43	73	HEX/JOE	none
ROX	31	45	58	6	44	82	ROX/Red 610	none
Cy5	33	51	59	11	53	globin	Cy5	none

荧光PCR仪上按表4设定如下程序：

表4 扩增程序的设定

程序	循环数	温度	恒温时间	采样模式
1	1	95℃	10 min	无
2	45	95℃	15 sec	无
		60℃	60 sec	单次采集荧光
3	1	38℃	5 sec	无

5. 基线，阈值的设定

具体设置方法请参照各仪器使用说明书。

基线的起点和终点确定原则：基线是指PCR开始时信号很低、接近背景且比较平稳的那个阶段。起点要避开开始的几个循环，由于高温导致的信号增高，设在信号已经降到背景高度且能维持平稳的地方，一般在3到6个循环之间；终点要避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方，一般在

本组数据中最小的Ct值前再3个循环处。另外，起点与终点之间最好能间隔8个循环以上，以满足统计基线标准偏差的数学要求。

阈值设定：荧光阈值的缺省设置是3~15个循环的荧光信号的标准偏差的10倍（机器自动设置）。但我们通常采用手动设置，手动设置的原则是该阈值要大于样本的荧光背景值和空白对照的荧光最高值，同时要尽量选择进入指数期的最初阶段，真正的信号出现在荧光信号超过阈值后。

【检验结果的解释】

1. 质控对照

1.1 空白对照在各荧光检测通道Ct值均应显示为Undet.

1.2 阳性对照在对应荧光检测通道Ct值≤36。

符合以上两个条件，此次实验视为有效。

2. 结果判断

2.1 样本按照下表5进行结果判断。

2.2 样本中globin在Cy5荧光检测通道Ct值≤40，其他荧光检测通道Ct值显示为Undet，判断为阴性。

2.3 样本在除globin之外其他荧光检测通道40<Ct值<45，建议重做，重做结果Ct值<40者为阳性，否则为阴性。

2.4 样本在各荧光检测通道Ct值显示为Undet，判断为无效，需重新采样。

表5 对应PCR反应管结果判断

对应PCR反应管	FAM 通道 Ct值≤ 40判断为	HEX 通道 Ct值≤ 40判断为	ROX 通道 Ct值≤ 40判断为	Cy5 通道 Ct值≤ 40判断为
PCR混合液1 (16/18/31/33)	16	18	31	33
PCR混合液2 (35/39/45/51)	35	39	45	51
PCR混合液3 (52/56/58/59)	52	56	58	59

PCR混合液4 (66/68/6/11)	66	68	6	11
PCR混合液5 (42/43/44/53)	42	43	44	53
PCR混合液6 (81/73/82/ 内对照(globin))	81	73	82	globin

3. 常见问题分析

如果出现FAM、HEX、ROX、CY5荧光检测通道Ct值<15的强阳性样本，可直接报告为阳性，并将其从样本表中剔除，再按上面步骤分析其他样本，或建议将DNA用TE缓冲液进行100倍稀释重做。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于检测以下23种HPV: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 6, 11, 42, 43, 44, 53, 81, 73, 82。
2. 由于个别病例可能感染量比较少，因此，阴性结果并不能完全排除HPV感染的可能性，另外，取样出错也可能会导致假阴性结果。
3. 待测靶序列的变异或其它原因导致的序列改变也可能会导致假阴性结果。
4. 样本处理过程出现交叉污染，会造成假阳性结果。
5. 本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，为达到诊断目的，此检测结果要与临床检查、病史和其它的检查结果结合使用。

【产品性能指标】

1. 最低检出量

检测3个浓度梯度的测试品，确定最低检出量是20拷贝/反应。

2. 准确性



检测试剂盒检测范围人乳头瘤病毒不同型别国家分型参考品或经标化的企业参考品，结果均为阳性且分型正确。

3. 特异性

对感染部位相同的其他病原体（沙眼衣原体、淋球菌、解脲脲原体、生殖支原体、人型支原体、梅毒螺旋体、白色链珠菌、阴道毛滴虫、单纯疱疹病毒2型、化脓性链珠菌、阴道加德纳菌、巨细胞病毒）以及试剂盒检测范围外的HPV26、HPV61、HPV67、HPV69、HPV71无交叉反应。

4. 批内精密度和批间精密度

检测2个浓度梯度的测试品，批内精密度和批间精密度Ct值的变异系数（CV,%）均不大于5.0%。

5. 干扰物质

5.1 宫颈脱落细胞样本含有1% 血、5% 粘液、5% 白细胞对本试剂盒的检测无明显影响。

5.2 宫颈脱落细胞样本分别人为加入一定比例抗菌药物，含有1%咪康唑（Miconazole）对本试剂盒的检测无明显影响，含有0.5%噻康唑（Tioconazole）对本试剂盒的检测有干扰。

6. 临床试验研究结果

临床研究中，试验试剂与对照系统1的临床总一致率为96.45%，阳性一致率为95.89%，阴性一致率为97.59%，可信区间下限均高于93.0%；试验试剂与对照系统2的临床正确率为100%；灵敏度为100%；特异度为100%，可信区间下限均高于91.0%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。
2. PCR混合液和DNA聚合酶切勿反复冻融。
3. 有关实验室管理规范请严格按照有关主管部门颁布的基因扩增实验室管理规范执行。
4. 实验请严格分区操作，各区物品不得交叉使用，每个区使用专用的仪



器和设备。

5. 试剂盒内各组分使用前，充分混匀后稍做离心。

6. 加样时应使样本加入反应液中，不应有样本黏附在管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

7. 扩增完毕后取出反应管，放置于指定的袋子中丢弃，不可以打开样本盖。

8. 实验中使用滤芯吸头，使用后直接打入装有1%次氯酸钠的废液缸中。

9. 实验区定期进行紫外消毒。

10. 所有临床样品都应视为传染性物质，操作和处理需符合相关法规要求，比如卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》。

11. 在处理样品和试剂时，佩戴一次性防护手套和实验服等，避免皮肤、眼睛或黏膜组织与这些原料直接接触。在处理样品和试剂后彻底清洗双手。

【参考文献】

1. 耿建祥，王旭波.人乳头瘤病毒检测及其应用.人民卫生出版社，2009.
2. Eileen F. Dunne; Elizabeth R. Unger; Maya Sternberg; et al, Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. JAMA. 2007;297(8):813-819.
3. Castle PE, Wacholder S, Sheman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR, Rush BB, Demuth F, Schiffman M.2002. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative woman. Cancer Nov; 95(10): 2145-2151.
4. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV.2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol Apr; 55(4):244-265.



【基本信息】

注册人/生产企业名称：潮州凯普生物化学有限公司

住所：广东省潮州市经济开发试验区北片高新区D5-3-3-4

联系方式：0768-2852923 传真：0768-2852920

售后服务单位名称：潮州凯普生物化学有限公司

联系方式：0768-2852923 传真：0768-2852920

生产地址：

生产地址A：广东省潮州市经济开发试验区北片高新区D5-3-3-4

生产地址B：潮州市经济开发试验区北片高新区D5-5小区（B幢）4层

生产许可证编号：粤食药监械生产许20041040号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20153401700

【说明书核准及修改日期】

说明书核准日期：2020年06月28日

