

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书

【产品名称】

通用名称：高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】

24 人份/盒，48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于对人宫颈脱落细胞样本中 14 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) E6/E7 区 mRNA 定性检测。

用于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(ASC-US 人群分流用途)。由于未做相关验证，本产品不能用于宫颈癌筛查相关临床预期用途。

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^[4]。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。

大量的研究表明：HPV 在宫颈细胞异常以及宫颈癌的病理学上具有最为重要的作用。超过 99% 的宫颈鳞状细胞癌和部分宫颈腺癌中均可检出 HPV DNA^[2,3]。至今发现的 HPV 约有 200 多种^[1]，但并非所有的型别都会引起宫颈癌，根据 HPV 感染人体后可致宫颈癌的相关性，有 14 种基因型(HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)被称为高危型^[4]。进行 HPV DNA 检测可提高高级别宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞状细胞癌的检出率，对细胞学检查结果可疑患者的分类及癌前病变的治疗后随访具有重要意义^[5]。

HPV 的致癌作用与 HPV DNA 基因组的整合有关。HPV DNA 在宫颈良性病变中主要以游离状态存在，在恶性病变中以整合状态为主。低危型 HPV DNA 总是保持游离状态，很少整合到宿主细胞基因组中，而大部分高危型 HPV DNA 可整合到宿主细胞 DNA 中，具有转录活性的 HPV 基因组整合到宿主染色体是宫颈病变快速转化为宫颈癌的标志之一^[6]。其致癌机制被认为是持续感染 HPV 以及机体免疫功能下降和宫颈局部微环境改变因素使 HPV DNA 整合于宿主染色体脆弱区，使编码特异性 DNA 束缚蛋白的 E2 区破坏，而 E6、E7 转化作用受 E2 的调控，从而引起 E6 和 E7 两种癌基因的过表达^[7,8]。

由于 HPV 无法在体外细胞培养，且不能诱导易于检测的免疫反应，所以不能采用血清学的方法进行 HPV 的检测，HPV 的准确确定依赖于分子生物学技术。形态学以及临床观察仅仅对于 HPV 的存在提供一些推断性支持。目前

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

国内外对 HPV 进行检测的方法主要集中在以靶序列扩增为基础的检测和以信号放大为基础的检测技术两方面。

【检验原理】

本试剂盒基于多重荧光 PCR 技术,通过实时荧光 PCR 仪,进行一步法 RT-PCR 核酸扩增与检测。可在同一反应管中通过仪器两种荧光检测通道分别检测 14 种高危型 HPV 的 E6/E7 区 mRNA 及细胞内对照 $\beta 2$ 微球蛋白基因 mRNA。细胞内对照 $\beta 2$ 微球蛋白基因 mRNA 用于评估样本质量及 PCR 抑制因素。

【主要组成成分】

主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	24 人份规格(管)	48 人份规格(管)	主要成分
RT-PCR 混合液	468 μ L	936 μ L	特异性引物探针、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)、硫酸镁 ($MgSO_4$)
酶混合液	12 μ L	24 μ L	热启动 Taq 酶、逆转录酶
阳性对照	40 μ L	80 μ L	含 HPV16、内对照目的片段的假病毒 RNA

试剂盒组成	24 人份规格(管)	48 人份规格(管)	主要成分
空白对照	40 μ L	80 μ L	无 RNA 酶的水
DNase I	36 μ L	72 μ L	DNase I
DNase I 反应液	24 μ L	48 μ L	Tris 盐酸缓冲液
DNase I 终止液	24 μ L	48 μ L	乙二胺四乙酸 (EDTA)

注:不同批号试剂盒中各组分不可以互换;

试剂盒不包含但检测需配套的试剂及器械:

1. 提取试剂:

- 1) 潮州凯普生物化学有限公司生产的核酸提取试剂盒 (离心柱法)【粤潮械备 20150013】
- 2) 潮州凯普生物化学有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (磁珠法 DR-4801-KZ 型)【粤潮械备 20210003】

2. 采样器及保存液:

- 1) 潮州凯普生物化学有限公司生产的一次性使用宫颈细胞采集器【粤械注准 20162220713】和样本保存液【粤潮械备 20160007】
- 2) 宁波华莱斯医疗器械有限公司生产的一次性使用宫颈采样拭子【浙械注准 20172181163】和豪洛捷公司生产的细胞保存液 PreservCyt Solution【国械备 20140197】。

【储存条件及有效期】

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

-15℃以下避光储存，有效期 12 个月。避免反复冻融，冻融次数应不超过 5 次。试剂盒采用蓄冷剂包装运输。

试剂盒开盖后于 25℃暴露于空气的时间建议不超过 24 小时；或开盖使用后拧紧瓶盖放置于-15℃以下避光储存，建议不超过 12 个月。

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

【适用仪器】

荧光 PCR 仪：ABI7500（具有 FAM, HEX/JOE 荧光检测通道）；宏石实时荧光定量 pcr 仪 SLAN-96S。

【样本要求】

1. 样本采集

检查前准备：3 天内不使用阴道内药物或对阴道进行冲洗；24 小时内不应有性行为；检查应在非月经期内进行；检查前阴道不进行醋酸或碘液涂抹。

使用推荐搭配的样本采集器采集样本，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

标识并保持样本管直立放置，送实验室检测。

推荐搭配的样本采集器及保存液

【采样系统 1】

采样刷：潮州凯普生物化学有限公司生产的一次性使用宫颈细胞采集器【粤械注准 20162220713】；

保存液：潮州凯普生物化学有限公司生产的样本保存液【粤潮械备 20160007】。

【采样系统 2】

采样拭子：宁波华莱斯医疗器械有限公司生产的一次性使用宫颈采样拭子【浙械注准 20172181163】；

保存液：豪洛捷公司生产的细胞保存液 PreservCyt Solution【国械备 20140197】。

2. 样本保存和运送

样本采集后立即送检。采样系统 1 采集的样本保存条件为：2~8℃保存不超过 7 天，-15℃以下保存不超过 12 个月进行检测，-70℃以下保存不超过 24 个月；采样系统 2 采集的样本保存条件为：2~30℃保存不超过 30 天，-15~-70℃保存不超过 24 个月。样本冻融次数应不超过 7 次。标本运送时建议采用低温保存运送。

【检验方法】

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

1. 样本RNA提取 (在样本处理区进行, 本操作为建议方法)

1.1 手动提取

采样系统 1 采集的样本: 样本混匀后, 取 200 μ L 于离心管中。

采样系统 2 采集的样本: 样本混匀后取 1mL 置于离心管中 (如果细胞数量少可以加大体积到 2mL), 12000 转离心 3min, 吸弃 800 μ L 上清液, 剩余 200 μ L 与沉淀混匀。

采用潮州凯普生物化学有限公司生产的核酸提取试剂盒 (离心柱法)【备案号: 粤潮械备 20150013】提取 RNA, 具体操作步骤详见试剂盒说明书。

1.2 自动提取

采样系统 1 采集的样本: 样本混匀后, 取 300 μ L 于离心管中。

采样系统 2 采集的样本: 样本混匀后取 1mL 置于离心管中 (如果细胞数量少可以加大体积到 2mL), 12000 转离心 3min, 吸弃 700 μ L 上清液, 剩余 300 μ L 与沉淀混匀。

采用潮州凯普生物化学有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (磁珠法 DR-4801-KZ 型)【备案号: 粤潮械备 20210003】配套广东凯普科技智造有限公司生产的 HBNP-4801A 全自动核酸提取仪【备案号: 粤潮械备 20140035】提取 RNA, 具体操作步骤详见试剂盒说明书。

1.3 提取的 RNA 应立即检测或于-15 $^{\circ}$ C 以下保存不超过 1 个月, -70 $^{\circ}$ C 以下保存不超过 6 个月。避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次。

1.4 取 7.5 μ L 提取的 RNA 用于后续 DNase I 处理。

2. 提取 RNA 的 DNase I 处理

2.1 从试剂盒中取出 DNase I、DNase I 反应液、DNase I 终止液, 解冻后放置于 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 使用前混匀, 8000 转/分钟离心 10s, 避免反复冻融。

2.2 按照表 2 配制 DNase I 处理体系:

表 2 每人份 DNase I 处理体系

DNase I	1.5 μ L
DNase I 反应液	1.0 μ L
RNA	7.5 μ L
合计	10.0 μ L

2.3 盖紧 PCR 反应管管盖, 稍做离心, 置于 PCR 仪器中, 无需热盖, 37 $^{\circ}$ C, 30min 后置于冰上冷却;

2.4 加入 1 μ L DNase I 终止液混匀后, 待 PCR 仪器热盖升温后, 将样品放入, 65 $^{\circ}$ C 10min 终止反应, 立即置于冰上冷却至少两分钟后, 即得到处理好的样本 RNA (无 DNA)。处理好的样本 RNA 立即用于 RT-PCR 扩增检测。

3. 扩增试剂准备 (在PCR前准备区进行)

3.1 从试剂盒中取出 RT-PCR 混合液, 室温下避光解冻, 上下颠倒混匀后,

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

8000 转/分钟 10s。从试剂盒中取出酶混合液，8000 转/分钟 10s。

3.2 按照表 3 配制扩增试剂：

表 3 扩增试剂的制备

组份	RT-PCR混合液	酶混合液
1 人份用量	19.5μL	0.5μL
10人份用量	195μL	5μL

3.3 将配制好的扩增试剂充分混匀，8,000 转/分钟 10s，向设定的 n 个 PCR 反应管中分别加入 20μL 配制好的扩增试剂，转移到样本处理区。

4. 加样 (在样本处理区进行)

4.1 在对应的PCR反应管中分别加入5μL处理好的样本RNA、空白对照、阳性对照RNA，盖紧管盖，稍做离心。(反应总体积为25μL/人份，每次反应需要设置一个阳性对照以及一个空白对照。)

4.2 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。

5. RT-PCR扩增 (在检测区进行)

按照表4设置两种荧光检测通道的报告荧光、淬灭荧光；Passive Reference选择none。

表4 荧光检测通道的设定

Detector Name	Target	Reporter Dye	Quencher
FAM	14 种高危型 HPV E6/E7 区 mRNA(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FAM	none
HEX	细胞内对照 β 2 微球蛋白基因 mRNA	HEX/JOE	none

荧光PCR仪上按照表5设定程序：

表5 RT-PCR扩增程序的设定

程序	循环数	温度	恒温时间	采样模式
1	1	50℃	15min	无
2	1	95℃	2min	无
3	45	95℃	15 sec	无
		60℃	60 sec	单次采集荧光
4	1	38℃	30 sec	无

6. 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

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

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。

【阳性判断值】

根据127例临床样本所测的Ct值结果，利用ROC曲线法确定本试剂盒目的基因的Ct阳性判断值为37，内参基因的Ct阳性判断值为37。

【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（或 NoCt）。
- 1.2 阳性对照在各荧光检测通道 Ct 值 ≤ 32 。

符合以上两个条件，此次实验视为有效。

空白对照结果扩增曲线图见图1：

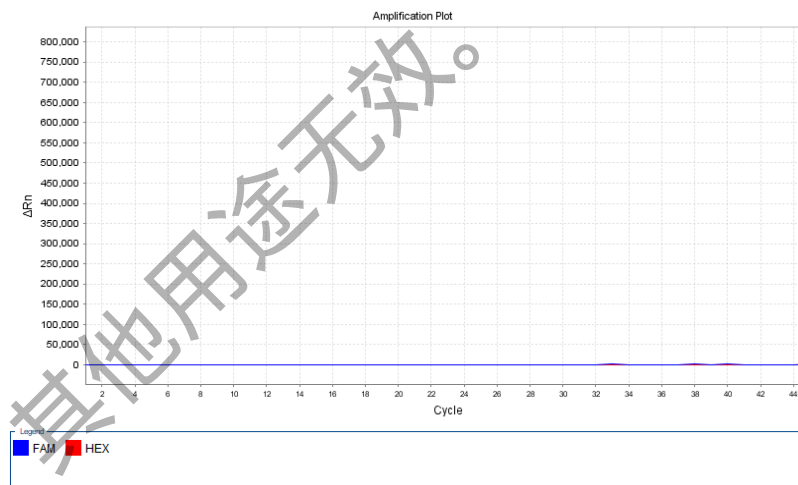


图1 空白对照

阳性对照结果扩增曲线图见图2：

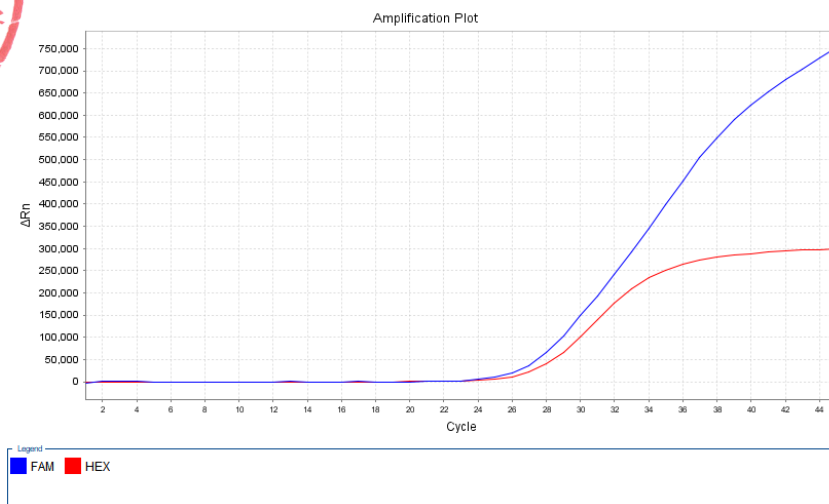


图2 阳性对照

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

2. 结果判断

- 2.1 样本在 FAM 荧光检测通道 Ct 值显示为 Undet(或 NoCt), 其内对照 B2M 在 HEX 荧光检测通道 Ct 值 ≤ 37 , 判断为阴性。
- 2.2 样本在 FAM 荧光检测通道有明显扩增曲线, Ct 值 ≤ 37 , 判断为阳性。
- 2.3 样本在 FAM 荧光检测通道有明显扩增曲线, $37 < \text{Ct 值} < 45$, 建议重做, 重做结果有明显扩增曲线且 Ct 值 < 37 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 (或 NoCt), 判断为无效, 需重新采样。

阴性、阳性结果扩增曲线图分别见图3、图4:

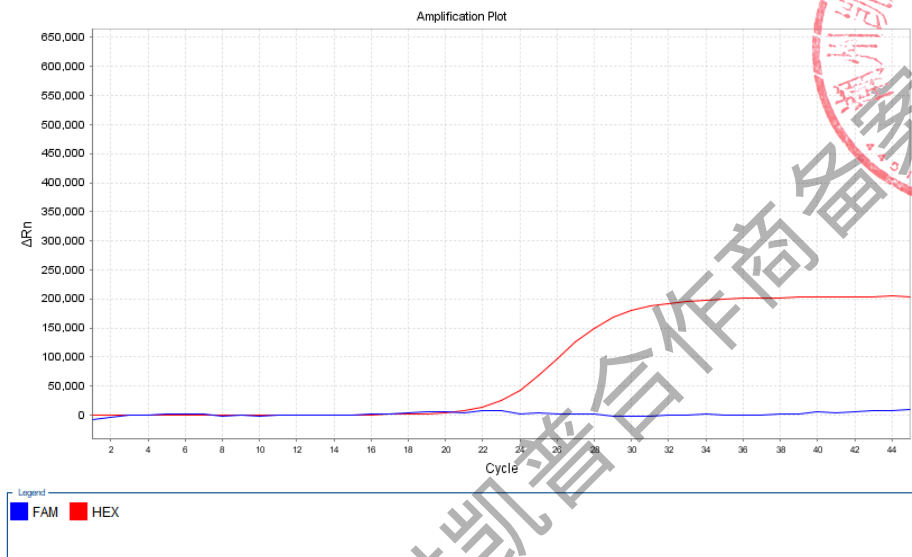


图3 阴性

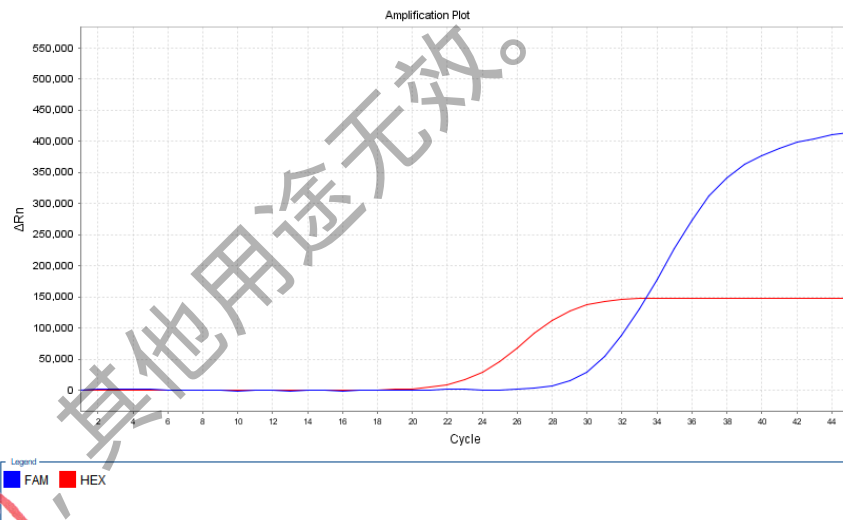


图4 阳性

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于检测以下 14 种高危型 HPV E6/E7 区 mRNA: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68。
2. 阴性结果不能完全排除 HPV 感染, 样本中靶基因浓度低于检测限可造成阴性结果, 待测靶序列的变异或其它原因导致的序列改变也可能导致假阴性结果。不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
3. 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。

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

【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 500 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的企业参考品，结果均为阳性。

3. 特异性

3.1 对试剂盒检测范围内的 14 种高危型 HPV 的质粒 DNA 的检测结果全部为阴性。

3.2 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、人型支原体、梅毒螺旋体、白色念珠菌、阴道毛滴虫、单纯疱疹病毒 2 型）以及试剂盒检测范围外的 HPV 6、11、26、40、42、43、44、53、54、61、67、69、70、71、72、73、81、82、83 无交叉反应。

4. 批内精密度和批间精密度

检测阴性样品和 2 个浓度梯度的测试品：临界阳性样品、（中或强）阳性样品，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% 血红蛋白、5% 宫颈粘液、5% 白细胞对本试剂盒的检测无明显影响。

5.2 宫颈脱落细胞样本含有 0.5%、1% 咪康唑（Miconazole）、1-2% 的壬苯醇

醚栓（爱侣栓）（国药准字 H10930186）、人体润滑剂（桂食药监械(准)字 2014 第 2660006 号）和洁尔阴洗液（国药准字 Z10930008）的样本对本试剂盒的检测无明显影响；含有 0.5% 和 1% 噻康唑（Tioconazole）的样本对本试剂盒的检测有干扰。

6. 临床试验研究结果

准确性研究，与 Sanger 测序系统对比，七家临床单位共检测 1260 例 HPV 临床样本，总符合率为 99.68%，阳性符合率为 99.53%，阴性符合率为 99.76%，Kappa 值=0.993。与同类已上市试剂对比，三家临床单位共检测 422 例 HPV 临床样本，总符合率为 99.05%，阳性符合率为 98.65%，阴性符合率为 99.50%，Kappa 值=0.981。

针对不同的采集方法，两家临床单位同步对用两种采集方法采集的宫颈脱落细胞进行检测，总符合率为 100%；阳性符合率为 100%；阴性符合率为 100%，Kappa 值=1.000。

ASC-US 人群分流研究，三家临床单位共检测 856 例 HPV 临床样本，与阴道镜检查和组织病理学检查结果对比，针对 $\geq$ CIN2 水平的临床性能，临床灵敏度为 95.61%、临床特异性为 84.77%、Youden 指数为 0.8038、阳性似然比为 6.28，阴性似然比为 0.0518，诊断比数积为 121.24。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

2. 操作过程中应特别注意防止RNase对RNA降解作用，应使用无核酸酶的耗材，包括枪头、离心管、PCR管等。
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、眼睛或黏膜组织与之直接接触。在处理样品和试剂后彻底清洗双手。

【标识的解释】



体外诊断医疗器械



其他详见说明书

【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. Bosch, F.X, and N. Munoz. The viral etiology of cervical cancer [J]. Virus Res. 2002; 89: 183-190.
3. Meijer, C.J., A.J. Van Den Brule, P.J. Snijders, T. Helmerhorst, P. Kenemans, and J.M. Walboomers. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening [J]. IARC Sci. Pub. 1992; 119: 271-281.
4. Meijer CJ, Snijders PJ, and Castle PE. 2006. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecol Oncol 103: 12-17.
5. Petry, K. U., S. Menton, M. Menton, F. van Loenen-Frosch, H. de Carvalho Gomes, B. Holz, B. Schopp, S. Garbrecht-Buettner, P. Davies, G. Boehmer, E. van den Akker, and T. Iftner. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients [J]. Br. Cancer. 2003; 88: 1570-1577.
6. Zhang Y, Dasgupta J, Ma RZ, et al. Structures of a HPV E6 polypeptide

高危型人乳头状瘤病毒 E6/E7 区 mRNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

bound to MAGUK proteins: mechanisms of targeting tumor suppressors by a high-risk HPV oncoprotein[J] Virol, 2007, 81(7): 3618-3626

【说明书核准及修改日期】

7. Lazo, P.A. Papillomavirus integration: prognostic marker in cervical cancer. Am[J]. Obstet. Gynecol. 1997. 176: 1121-1122.
8. Kalantari, M., F. Karlsen, G. Kristensen, R. Holm, B. Hagmar, and B. Johansson. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis [J]. Int. J. Gynecol. Pathol. 1998. 17: 146-153.

【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区试验区北片高新区 D5-3-3-4

联系方式： 传真：

售后服务单位名称：

联系方式： 传真：

生产地址：广东省潮州市经济开发区试验区北片高新区 D5-3-3-4

潮州市经济开发区试验区北片高新区 D5-5 小区 (B 幢) 4 层

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】