

高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】 32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测女性宫颈脱落上皮细胞样本中高危型人乳头瘤病毒(HPV)（HPV16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82）核酸DNA，并对 HPV16、HPV18 型进行分型鉴定。

由于未完成相关临床试验，本产品不得用于宫颈癌筛查相关的预期用途。

【检验原理】

本试剂盒选用人乳头瘤病毒（HPV）特异区域(包括 E1、E7、L1 区)，设计引物及特异 Taqman 探针，扩增约 120bp PCR 片段，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高危型 HPV 核酸的自动化检测。

本试剂盒采用 HPV18 高危（HPV18High-Risk，以下简称 HPV18HR）PCR 反应液同时检测 HPV16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 型及内标，检测时选取 FAM、HEX/VIC、ROX、Cy5 荧光通道。

本试剂盒检测体系含有尿嘧啶 DNA 糖基化（UNG 酶）和 dUTP 防污染措施，充分降解可能的产物污染，避免假阳性结果。同时本试剂盒设置了阴、阳对照，阴性对照为人基因组 DNA，阳性对照为人基因组 DNA 稀释的 HPV16、18、52 型基因组 DNA

【主要组成成分】

- 核酸提取液：含 0.2M NaCl、50mM Tris-HCl(pH 8.0)、1%巯基乙醇、5%Chelex-100；
 - HPV 18HR PCR 反应混合液 1：含 Tris-HCl、KCl、MgCl₂、dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP、Taq 酶及抗体、UNG 酶；
 - HPV 18HR PCR 反应混合液 2：含 HPV 16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 型引物荧光探针及 β-globin 的引物荧光探针；
 - HPV 18HR 阳性对照：含人基因组 DNA 稀释的 HPV 16、18、52 型基因组 DNA（重组克隆）；
 - HPV 18HR 阴性对照：含人基因组 DNA。
- 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±5℃环境下避光储存，有效期为 12 个月；反复冻融不得超过 3 次；每次复溶后在室温下放置不得超过 30min；

开瓶后，在-20±5℃保存 3 个月内有效。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500 型荧光 PCR 扩增仪。

注意：使用 ABI 仪器时探针模式设置，Reporter Dye: FAM、HEX/VIC、ROX、Cy5；Quencher Dye: None；Passive Reference: None。

【样本要求】

- 样本类型：女性宫颈脱落上皮细胞
- 样本采集：

应当选用国家已批准的一次性使用宫颈采样拭子：拭子应包括刷头（分刷毛部分、连接部分）、刷杆两部分组成，且刷头与刷杆应连接牢固，无脱开现象。样本采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。

取一次性使用宫颈拭子伸入宫颈口与粘膜交界处逆时针转三圈，停留 10 秒钟，将取样拭子放于样本保存液中，密闭送检。样本保存液主要成分应为无菌生理盐水，体积不大于 2.0mL，需使用江苏健友医疗科技有限公司生产的细胞保存液（注册证号：苏械注准 20172410782）。

- 样本存放：2-8℃保存 3 天；-20±5℃下保存 12 个月；但应避免反复冻融。
- 样本运输：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)

- 如采用试剂盒配套的核酸提取液，操作方法如下：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 5 分钟。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。
- 如采用磁珠法进行样本核酸的提取，需使用我公司的核酸提取或纯化试剂（浙江械备 20150133 号），直接按照说明书进行操作。
- 阴性对照、阳性对照直接取出 50μL，如采用试剂盒配套的核酸提取液，则直接加入 50μL 核酸提取液，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。如采用磁珠法进行提取，则直接按

照说明书进行操作。

- 样本及对照品裂解产物应立即检测，不能保存。

2.试剂配制 (试剂准备区)

从试剂盒中取出 HPV18HR PCR 反应混合液 1、2，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备样本数 n 份[n=样本数+2 管对照]。

每测试反应体系配制如下：

试 剂	HPV18HR PCR 反应混合液 1	HPV18HR PCR 反应混合液 2
用 量	34μL	2μL

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)

各对应的反应管中分别加入 4μL 的阴性对照、阳性对照、样本处理上清液，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	25℃	10min
2	1	95℃	3min
3	40	94℃	15sec
		64℃	31sec*

检测荧光选择：FAM、HEX/VIC、ROX、Cy5 荧光通道，荧光收集在 64℃，31sec*。

5.质量控制

每次试验均设置阴阳对照组，用于检测试剂性能，其中阳性对照为 FAM、HEX/VIC、ROX 及 Cy5 通道均具有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤32；阴性对照为仅 Cy5 通道具有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤32，否则视为本次试验无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

【阳性判断值】

本试剂盒采用模拟梯度稀释参比品，以荧光具有明显 S 型扩增曲线的 Ct 值作为阳性判断值的标准，并结合临床试验报告，验证此阳性判断值，本试剂盒 HPV16 型 Ct 值 ≤33.9；HPV18 型 Ct 值 ≤34.2；其他 HPV 高危型 Ct 值 ≤32.2。

【检验结果的解释】

- 阳性对照检测结果为 FAM、HEX/VIC、ROX 及 Cy5 通道均具有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤32。
- 阴性对照检测结果为仅 Cy5 通道具有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤32。

- 实验结果判断：HPV 检测结果对应检测指标及判断，如下表所示：

荧光染料设置	检测型别	Ct 值及结果判断
FAM	HPV26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 型	Ct 值 ≤32.2，表示其他高危型 HPV 阳性
HEX/VIC	HPV16 型	Ct 值 ≤33.9，表示 HPV16 型阳性
ROX	HPV18 型	Ct 值 ≤34.2，表示 HPV18 型阳性
Cy5	β-globin 内标	Ct 值 ≤35.5，结果可用，否则实验失败，建议重新提取 DNA

备注：调节 baseline cyclers 至 6~15(不同仪器根据实际情况，baseline cyclers 可在 2~18 之间变化)，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照的最高点为准。当在阈值以上的荧光扩增曲线呈明显的“S”型曲线则判断为阳性结果；当部分样本扩增曲线在阈值以上但无明显的“S”型曲线则判断为阴性结果。建议试验结束后分别调整 FAM 通道、VIC/HEX 通道、ROX 通道、Cy5 通道的阈值线，阈值线分别在各个通道最高值的 1/20-1/100。

- 若临床样本在检测中出现内标起线 Ct 值 ≤35.5，而 HPV 检测结果 Ct 值大于阳性判断值且 <40，且具有明显 S 型扩增曲线，则需重复检测，结果亦然则判断为阳性结果，如无 Ct 值，则判断为阴性结果。
- 若临床样本在检测中出现内标起线 Ct 值 >35.5 或者无 Ct 值，分两种情况：a.样本内标起线 Ct 值在 35.5-40 之间，该样本提取 DNA 重复检测，若内标起线 Ct 值在 35.5-40 之间，则判断该样本中人基因组含量较低，检测结果可采纳。b.样本内标不起线，则建议该样本提取 DNA 重复检测，如果内标仍不起线而检测 HPV 型别为阳性，则判断为阳性。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒仅用于所述 18 种高危型人乳头瘤病毒核酸 DAN 的检测，分别为 HPV16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82。
- 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。

3. 关于假阴性/假阳性结果可能性预测：

a: 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。

b: 不适当的试剂保存方式可能导致假阴性结果。

c: 待检测的高危型人乳头瘤病毒靶序列发生变异或者其他因素导致的序列改变也可能导致假阴性结果。

d: 未在本试剂盒验证范围内的其他干扰物质或PCR抑制因子，可能导致假阴性结果。

e: 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亦可造成阴性结果。

f: 处理样本时出现的交叉污染，可能会造成假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 人乳头瘤病毒全基因组分型参考品符合率：在本试剂盒检测范围内型别均为阳性；不在本试剂盒检测范围内型别均为阴性。

2. 检测限：本试剂盒的检测下限为 2000 拷贝/反应。

3. 企业内部阳性/阴性参考品符合率：阳性参考品结果均为阳性；阴性参考品均为阴性。

4. 精密度：对不同来源的克隆质粒和临床样本在高、低浓度水平上的测试结果 Ct 值的 CV 均不大于 5%。

5. 分析特异性：检测不在本试剂盒检测范围内 HPV 基因型、相关病原体检测结果均为阴性；不同浓度干扰物质对试剂盒性能无影响。具体验证结果如下：

验证类型	浓度/滴度	验证结果
其他 HPV 型别 1（全基因组参考品）	约 10 ⁵ copies/mL	阴性
其他 HPV 型别 2（HPV40、42、43、44、83 样本）	约 10 ⁵ copies/mL	阴性
其他 HPV 型别 3（HPV54、72 基因克隆）	1×10 ⁵ copies/mL	阴性
单纯疱疹病毒Ⅱ型	1×10 ⁶ copies/mL	阴性
梅毒螺旋体	N/A	阴性
解脲支原体	1×10 ⁵ copies/mL	阴性
人型支原体	N/A	阴性
淋病奈瑟菌（淋球菌）	1×10 ⁵ copies/mL	阴性
白色念珠菌	1×10 ⁵ copies/mL	阴性
阴道毛滴虫	N/A	阴性
沙眼衣原体	1×10 ⁵ copies/mL	阴性
EB 病毒	2.2×10 ⁵ copies/mL	阴性
巨细胞病毒	1×10 ⁵ copies/mL	阴性

“N/A”指未对其滴度进行验证。

不同物质抗干扰性上限如下：

类别	上限
血红蛋白	16mg/μL
白细胞	(1.0-4.0)*10000/μL
宫颈粘液	100%
阴道避孕药	2%
阴道抗真菌药	2%
阴道润滑剂	20%
女性卫生用品	N/A

“N/A”指的是对女性卫生用品以模拟评价方式进行，无上限测试。

6.临床总结：本试剂盒以批准上市、临床评价较好的同类产品为对照，HPV16 种高危型阳性符合率 98.20%，阴性符合率 98.24%，总体符合率 98.23%。HPV16 型阳性符合率 98.46%，阴性符合率 99.84%，总体符合率 99.72%。HPV 18 型阳性符合率 96.30%，阴性符合率 100%，总体符合率 99.86%。HPV 18 种高危型阳性符合率 98.5%，阴性符合率 98.38%，总体符合率 98.44%。

【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. 产品性能仅针对女性宫颈脱落上皮细胞及【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法（包括样本采集液等）进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。

3. 本试剂盒仅用于体外检测。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 加样时应使样本完全放入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

9. 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。

10. 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。

11. 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。

12. PCR 反应混合液应于-20±5℃保存。

13. 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 20193400983

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019.12.09

修改日期：2022.04.29