

人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【货号】JC80301

【包装规格】24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于分型定性检测妇女宫颈脱落细胞样本中 21 种人乳头瘤病毒型别（具体包括 HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 26, 82, 73 及 HPV 6, 11 和 81 型）。

HPV 是一种主要存在于人皮肤、黏膜及女性宫颈上皮细胞异形区的微小共价双链环状 DNA 病毒，至今发现的 HPV 约有 200 多种。研究表明，HPV 某些型别持续性感染是导致宫颈癌的最主要因素。根据世界卫生组织统计，每年大约有 50 万左右的宫颈癌新发病例，占有癌症新发病例的 5%，在中国每年约有 8 万左右的女性死于宫颈癌。目前，实验室检测方法主要有核酸检测、细胞学检测、病理组织学检测等。本产品可用于由于感染 HPV21 个型别而引起的宫颈癌相关疾病的辅助诊断，不用于病毒载量的判断。由于未进行相应临床试验，不得用于宫颈癌筛查相关的临床用途。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，主要以人乳头瘤病毒基因组 L1 区为靶区域，设计 21 个型别特异性引物和探针，分别以 FAM、HEX、ROX 标记相应型别。探针为包括 5'端报告基团和 3'端淬灭基团的寡核苷酸，在 PCR 扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被 Taq 酶（5'→3'外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对人乳头瘤病毒在核酸水平上的定性检测。同时参考基因可以用于监控并排除由于仪器故障、试剂因素、操作不当或样本中的抑制物等因素造成的假阴性结果。

【主要组成成分】

试剂盒	规格及数量（24 人份）	规格及数量（48 人份）	主要成分
核酸扩增反应液	960μL/管×2 管	1280μL/管×3 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液、Taq 酶、UNG 酶
A 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 16、18、31 型的特异性引物和探针
B 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 59、66、53 型的特异性引物和探针
C 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 33、58、45 型的特异性引物和探针
D 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 56、52、35 型的特异性引物和探针
E 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 68、51、39 型的特异性引物和探针
F 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 82、26、73 型的特异性引物和探针
G 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	HPV 6、11、81 型的特异性引物和探针
H 反应液	192μL/管×1 管	384μL/管×1 管	参考基因的特异性引物和探针
阳性对照（A-H 组）	20μL/管×8 管	20μL/管×8 管	HPV21 个型别及参考基因质粒
去 RNA 酶水 （空白对照）	250μL/管×1 管	250μL/管×1 管	经焦碳酸二乙酯处理的水

备注：不同批号间的试剂不能互换。

本试剂盒检测需要配套用品：江苏健友医疗科技有限公司生产一次性使用无菌宫颈采样器（产品注册号：苏械注准 20182660365）

配套使用江苏硕世生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂（备案号：苏泰械备 20190089 号）

【储存条件及有效期】

试剂盒避光-20±5℃储存，有效期12个月。冰袋低温运输不能超过4天；反复冻融次数不能超过5次。

生产日期、有效期至：见标签

【适用仪器】

Linegene 9600 荧光定量 PCR 仪（杭州博日科技有限公司）、SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪（上海宏石医疗科技有限公司）

【样本要求】

1. 样本类型：宫颈脱落细胞
2. 样本的采集：采样前，用棉拭子轻轻擦拭宫颈口过多的分泌物，将宫颈采样刷伸入宫颈口鳞柱上皮交界处，顺时针或逆时针旋转 3-5 圈采集宫颈脱落细胞，将其放入标有病人编号的取样管中，密闭送检。
3. 样本保存和运输：样本采集后应及时检测，2℃-8℃保存 3 天内完成检测，-20±5℃保存不超过 12 个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过 5 次，采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

从-20±5℃取出试剂盒，将各试剂融化混匀并短暂离心后备用。计算需要进行的反应份数n（n=待测样本数+空白对照1份+阳性对照1份），取出8个离心管分别标记1#、2#、3#、4#、5#、6#、7#和8#，分别加入n×10μL 核酸扩增反应液，然后对应每个编号离心管分别加入n×8μL A反应液（1#）、n×8μL B反应液（2#）、n×8μL C反应液（3#）、n×8μL D反应液（4#）、n×8μL E反应液（5#）、

$n \times 8\mu\text{L}$ F反应液（6#）、 $n \times 8\mu\text{L}$ G反应液（7#）、 $n \times 8\mu\text{L}$ H反应液（8#），混匀并短暂离心后，依次分装至对应编号PCR八联管中，每管 $18\mu\text{L}$ ，总共分装 n 排PCR反应八联管，1排PCR八联管为1人份。

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 样本DNA提取 取出样本，振荡混匀后，取待测样本按照提取试剂盒说明书操作。

2.2 加样

（1）小心打开PCR八联管盖，每份待测样本核酸溶液、空白对照按照 $2\mu\text{L}$ /管依次加入对应编号含有A-H反应体系的PCR八联管中，1排PCR八联管为1人份，阳性对照（A-H组）同样按照 $2\mu\text{L}$ /管分别加入对应的A-H反应体系的PCR八联管中，总体积为 $20\mu\text{L}$ /管。

（2）盖紧PCR八联管盖，低速短暂离心。

3. PCR扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 循环参数设定（请参照仪器的操作说明进行设置）

步骤		温度	时间	循环数
1	UNG 酶处理	50 ℃	5 min	1 cycle
2	预变性	95 ℃	10 min	1 cycle
3	变性	95 ℃	10 s	45 cycles
	退火、延伸及检测荧光	58 ℃	40 s	
步骤 3 中 58℃时荧光检测 ， 检测通道选择为：FAM、HEX、ROX				

3.3 结果分析

3.3.1 杭州博日Linegene 9600荧光定量PCR仪：反应结束保存结果，根据分析后图像调节基线的起始循环、终止循环（可以根据实际情况自行调整，起始循环可以在3~15、终止循环可设在5~20，调整空白对照的扩增曲线平直或低于阈值线；也可由仪器进行自动判读，起始循环为3、终止循环为15），点击确定自动获得分析结果，在同一界面的显示区察看结果。

3.3.2 上海宏石SLAN-96P荧光定量PCR仪：反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节基线起点、终点、阈值；也可由仪器进行自动判读，默认起始循环为6、终止循环为12、阈值为0.12），点击分析自动获得分析结果，在同一界面察看结果。

【阳性判断值】

1. 根据临床试验结果，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的 HPV 各型别的定性参考值，见下表。

HPV 型别探针荧光标识表及参考值

组别	探针标记	HPV 型	参考值	组别	探针标记	HPV 型	参考值
A 组	FAM	HPV16	36.9	E 组	FAM	HPV68	35.2
	HEX	HPV18	36.2		HEX	HPV51	34.6
	ROX	HPV31	35.5		ROX	HPV39	35.5
B 组	FAM	HPV59	34.8	F 组	FAM	HPV82	35.8
	HEX	HPV66	36.5		HEX	HPV26	35.5
	ROX	HPV53	35.3		ROX	HPV73	35.0
C 组	FAM	HPV33	35.7	G 组	FAM	HPV 6	34.6
	HEX	HPV58	35.4		HEX	HPV11	37.0
	ROX	HPV45	35.0		ROX	HPV81	35.6
D 组	FAM	HPV56	36.0	H 组	FAM	参考基因	36.7
	HEX	HPV52	35.1				
	ROX	HPV35	34.5				

【检验结果的解释】

质量控制

1. 空白对照：无典型S型扩增曲线显示。
2. 阳性对照：HPV21个型别及参考基因检测呈典型S型扩增曲线且 $CT \leq 30$ 。
3. 参考基因：H组FAM通道扩增曲线呈典型S型曲线且 $CT \leq 36.7$ ，否则与样本采样、运输、保存条件及实验操作等导致的失误有关。
4. 以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验定性结果无效。

结果判读

在仪器正常，空白对照、阳性对照、H组的FAM通道均正常的情况下，根据HPV型别探针荧光标识表进行分析。

HPV型别定性分析

根据参考值（参考范围），在 A-H 组中的 HPV 型别扩增曲线呈典型 S 型曲线且 CT 值小于参考值，判断相应的 HPV 型别为阳性；无典型 S 型扩增曲线或 CT 值大于参考值，判断相应的 HPV 型别为阴性。

【检测方法的局限性】

1. 本试剂盒适用于妇女宫颈脱落细胞样本中HPV病毒的定性检测，检测结果仅供临床参考，对患者临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查（如病理学和细胞学结果）及治疗反应等情况综合考虑。
2. 检测结果和样本的实验操作有关，操作失误可能导致假阴性结果，同时对H组参考基因FAM通道结果的判读可以排除样本采样、运输、保存条件及样本处理中可能的假阴性。如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。
3. 本检测结果仅供临床参考，不作为HPV感染诊治的唯一依据，阴性结果仅说明低于本试剂盒的检测阈值，但不能排除HPV感染的可能，阳性结果建议结合临床结果进一步确诊。

【产品性能指标】

1. HPV21 个型别检测灵敏度： 10^4 copies/mL（20 copies/反应）；
2. 特异性：与人乳头瘤病毒感染部位相同、症状相似的病原体及于试剂盒检测范围之外的其它病原体（HPV40、42、43、44 型、嗜酸乳杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪链球菌、化脓链球菌、无乳链球菌、棒状杆菌、沙眼衣原体、淋病奈瑟菌、大肠杆菌、肠道球菌、梭菌属、消化链球菌、克雷伯菌、肠杆菌属、变形杆菌、假单胞菌、拟杆菌、双歧杆菌属、梭菌、腺病毒、巨细胞病毒、

EB 病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 2 型、白色念珠菌、阴道毛滴虫等）无交叉反应；

3. 干扰物质（血液、子宫粘液、人体润滑剂、洁尔阴洗液、硝酸咪康唑、硝呋太尔制霉素）对检测没有影响；

4. 精密度：同一批次的产品变异系数 CV 值小于 5%；

5. 准确性：对本试剂盒范围内的 21 个型别临床样本检测，准确性为 99.6%（其中 HPV16 和 18 型阳性样本各 50 例，其余各型别阳性样本分别为 20 例），HPV 16、18、31、33、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、26、82、73 及 HPV 6、11 型准确性为 100%，HPV35 和 81 型准确性为 95%；不同型别之间不存在交叉反应。

6. 临床试验中，对比试剂为人乳头状瘤病毒(HPV)分型检测试剂盒(PCR+膜杂交法)。与对比试剂相比较，检测阳性符合率为 91.2%；阴性符合率为 98.2%；总符合率为 97.7%；Kappa 值为 0.823（各型别符合率详见下表）。对比试剂盒检测范围外的型别准确率为 HPV26（90.48%）、HPV73（85.0%）和 HPV82（92.86%）。

型别	阳性 符合率%	阴性 符合率%	总符合率 %	kappa 值	型别	阳性 符合率%	阴性 符合率%	总符合率 %	kappa 值
HPV16	91.5	97.5	95.7	0.896	HPV56	94.9	95.8	95.7	0.433
HPV18	88.6	99.3	98.1	0.900	HPV52	95.4	93.9	94.2	0.799
HPV31	79.6	99.2	98.3	0.796	HPV35	85.0	98.6	98.5	0.501
HPV59	100.0	98.5	98.5	0.697	HPV68	97.5	97.9	97.9	0.768
HPV66	94.2	98.9	98.8	0.791	HPV51	97.1	96.6	96.6	0.469
HPV53	92.6	98.7	98.3	0.866	HPV39	96.8	98.8	98.7	0.810
HPV33	84.3	99.4	98.5	0.862	HPV6	94.5	98.5	98.3	0.785
HPV58	90.4	98.8	97.6	0.898	HPV11	90.4	99.0	98.8	0.784
HPV45	92.6	99.5	99.4	0.791	HPV81	82.9	97.8	97.1	0.722

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外检测试剂。操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
2. 为保证实验结果的准确性和可靠性请使用已校准的移液器，选用合格的一次性使用的PCR反应管、离心管、枪头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含DNA酶和RNA酶。
3. 实验严格分区操作；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后立即清洁工作台。
4. 本试剂盒使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
5. 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
6. 待测样本尽可能新鲜，-70℃保存的核酸DNA，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
7. 每次实验应设置空白对照和阳性对照。不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
8. 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密封袋内再转移至样本处理区。
9. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
10. 反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染。
11. 扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
12. 实验中用过的枪头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同丢弃。
13. 工作台及各种实验用物品经常用10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。
14. 实时荧光 PCR 仪需定期校正和清洁载样板板孔。
15. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【参考文献】

1. Andersson, S., H. Safari, M. Mints, I. Lewensohn-Fuchs, U. Gyllensten, and B. Johansson. 2005. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). Br. J. Cancer 92:2195–2200.
2. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer, a worldwide perspective international biological study on cervical cancer (BSCC) study group [J]. J Natl Cancer Inst 1995;87(11):796-802.
3. Boulet GA, et al. 2009. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia2 in a liquid-based cytology setting Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18:2992–2999.
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol 2010;11:1048–56.
5. Elizabeth A. Else, Ryan Swoyer, Yuhua Zhang, et al., Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Assay . J Clin Microbiol., May 2011, Vol. 49, No. 5:1907–1912
6. Gravitt PE, et al. 2007. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. Int. J. Cancer 121:2787–2793.
7. Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervi-cal intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. J Natl Cancer Inst 2010;102:1478–88.
8. Lorincz AT, et al. 2002. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. Lancet 360:228–229.
9. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papil-lomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. Int J Cancer 2011;128:927–35.
10. Maelle Saunier, et al. 2008. Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of

HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. J. Clin. Microbiol. 46:3678–3685

11. Nicolas Wentzensen, et al. 2012. Human Papillomavirus Load Measured by Linear Array Correlates with Quantitative PCR in Cervical Cytology Specimens. J. Clin. Microbiol. 50:1564–1570

12. Xi LF, et al. 2011. Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study. J. Infect. Dis. 203:1425–1433.

【生产企业】江苏硕世生物科技股份有限公司

注册地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14四楼办研区）

邮编：225300

电话：0523-86201616 传真：0523-86201617

网址：www.s-sbio.com

【生产许可证编号】苏食药监械生产许 20100121 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20153400364

【说明书批准日期及修改日期】 2021年2月20日