

高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒（PCR 荧光法）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、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68，其中 HPV53、66 为疑似高危型）核酸；并对 HPV16、HPV18 型进行分型鉴定。

人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV），是一种小分子的、无被膜包被的、环状双链 DNA 病毒，基因组长约 8000 碱基对（bp），包含早期转录区（E 区）、晚期转录区（L 区）和非转录区（长控制区，LCR）。HPV 通过直接或间接接触污染物品或性传播感染人类，该病毒只能感染人的皮肤和粘膜上皮细胞，能引起人类皮肤的多种乳头状瘤或疣及粘膜生殖道上皮增生性损伤。根据 HPV 各型别致病力大小或致癌危险性大小不同可将感染生殖道和肛门的 HPV 分为低危型和高危型两大类。持续性的高危型 HPV 感染则是导致宫颈癌及宫颈上皮内瘤变的主要原因。高危型 HPV 感染被视为几乎所有宫颈癌发生的必要条件，全球范围的研究结果显示，在 99.7%的宫颈癌患者体内检测到高危型 HPV DNA 的存在，其中 HPV16 型、18 型、45 型和 31 型感染占 80%。本试剂盒主要对高危型 HPV DNA 进行检测，同时分型鉴定 HPV16、HPV18 型，由于未做相关临床验证，本产品不能用于宫颈癌筛查的相关用途。

【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。

本试剂盒采用两管 PCR 反应液进行检测，临床样本 DNA 需同时在 PCR 反应混合液 A、B 中检测。 HPV 反应混合液 A 检测 HPV31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68 型及内标，检测时选取 FAM、Cy5 荧光通道；HPV 反应混合液 B 检测 HPV16、18 型及内标，检测时选取 FAM、VIC、Cy5 荧光通道。同时本

试剂盒设置了阴、阳对照，阴性对照为人基因组 DNA 稀释液，阳性对照为人基因组 DNA 稀释的 HPV16、35 型基因组 DNA。

【主要组成成分】

- 1.核酸提取液：含 0.2M NaCl、5%Chelex-100。
 - 2.HPV 反应混合液 A：含 Tris-HCl、KCl、MgCl₂、dNTP、HPV31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68 型引物和 FAM 荧光探针及 β-globin 的引物和 Cy5 荧光探针。
 - 3.HPV 反应混合液 B：含 Tris-HCl、KCl、MgCl₂、dNTP、HPV16、18 型及 β-globin 的引物，HPV16 型 FAM 荧光探针和 HPV18 型 VIC 荧光探针及 β-globin Cy5 荧光探针。
 - 4.Taq 酶：含 Taq DNA 酶及抗体。
 - 5.HPV 阳性对照：含 HPV 高危型 16、35 型基因组 DNA(重组克隆)及人基因组 DNA。
 - 6.阴性对照：含 5ng/μL 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】

试剂盒在-20±5℃环境下避光储存，有效期为 12 个月。

反复冻融 3 次内有效；模拟运输 7 天内有效；2-8℃开瓶 7 天内有效。

生产日期使用期限详见产品标签及外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500。注意：使用 ABI 仪器时探针模式设置，Reporter Dye: FAM、VIC；Quencher Dye: None；Passive Reference: None。

【样本要求】

1. 样本类型：女性宫颈脱落上皮细胞样本
2. 采集容器：

一次性使用宫颈采样拭子：由刷头（分刷毛部分、连接部分）及刷杆组成。刷头采用低密度聚乙烯（LDPE）材料制成，刷杆采用高密度聚乙烯（HDPE）材料制成。刷头与刷杆的连接处应能承受 1N 历时 1min 的拉力，无脱开现象；刷头无轻微细胞毒性，对粘膜应无刺激反应及致敏反应。

3. 样本采集：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。

4. 样本存放：2-8℃保存，不超过 72 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。

5. 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)

(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 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（如样本裂解产物当天不使用，请于-20℃及以下保存）。

(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 HPV 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	HPV 反应混合液 A	Taq 酶
用 量	35.6μL	0.4μL

试 剂	HPV 反应混合液 B	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	95℃	3min
2	40	94℃	15sec
		64℃	31sec*

检测荧光选择：HPV 反应混合液 A 请选择 FAM、Cy5 荧光；HPV 反应混合液 B 请选择 FAM、VIC、Cy5 荧光。

5.质量控制

每次试验均设置阴阳对照组，检测试剂性能。

【阳性判断值】

本试剂盒采用模拟梯度稀释参比品，以荧光扩增起线 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，本试剂盒的

阳性判断值范围为 Ct 值≤38。

【检验结果的解释】

- 1.阳性对照在 HPV 反应混合液 A、B 中 FAM 及 Cy5 通道均起线，FAM、Cy5 通道 Ct 值均小于 32。
- 2.阴性对照在 HPV 反应混合液 A、B 中仅 Cy5 通道均起线，Cy5 通道 Ct 值均小于 32。
- 3.实验结果判断：HPV 反应混合液 A 双通道及 HPV 反应混合液 B 三通道的对应检测指标及判断，如下表所示：

编号	荧光染料设置	检测型别	Ct 值及结果判断
HPV 反应液 A	FAM	HPV13种 高危型	Ct≤38，表示对应检测型别阳性
	Cy5	β-globin 内标	Ct≤38，进行结果判断，否则实验失败，建议重新提取 DNA
HPV 反应液 B	FAM	HPV16型	Ct≤38，表示对应检测型别阳性
	VIC	HPV18型	Ct≤38，表示对应检测型别阳性
	Cy5	β-globin 内标	Ct≤38，进行结果判断，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 2~15 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。

4.部分临床样本在检测中出现内标起线 Ct 值在 >38 或者不起线，分两种情况：a.样本内标起线 Ct 值在 38-40 之间，该样本提取 DNA 重复检测，如内标起线 Ct 值在 38-40 之间，则判断该样本中人基因组含量较低，为正常结果。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】

- 1.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。
- 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亦可造成阴性结果。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。

【产品性能指标】

1.HPV 全基因组国家参考品符合率：本试剂盒检测人乳头瘤病毒全基因组国家参考品，在本试剂盒检测范围内型别均检测为阳性；不在本试剂盒检测范围内型别均检测为阴性。
2.检测限：针对不同的 HPV 基因型分别配制系列稀释的样品，通过测算适当检出率水平的浓度（95%(n≥20)或者 100%检出率）作为最低检测限确定的标准，本试剂盒的产品检测下限为 1000copies/mL。
3.企业内部阳性/阴性参考品符合率：本试剂盒检测企业内部阳性参考品结果均为阳性；检测企业内部阴性参考品均为阴性。以下为参考品具体信息：

参考品	组成	组成成分	评价标准
阳性参考品	P1-P15, 依次为 HPV16.18.31.33.35.3.9.45.51.52.53.56.58.5.9.66.68	基因克隆对应型别基因组	检测结果为阳性
检测限参考品	L1-L15, 依次为 HPV16.18.31.33.35.3.9.45.51.52.53.56.58.5.9.66.68	基因克隆对应型别基因组	检测结果为阳性
阴性参考品 N1	N1	含沙眼衣原体阳性分泌物样本	检测结果为阴性
阴性参考品 N2	N2	含腺支原体阳性分泌物样本	检测结果为阴性
阴性参考品 N3	N3	含淋球菌阳性分泌物样本	检测结果为阴性
阴性参考品 N4	N4	含单纯疱疹病毒 II 型阳性分泌物样本	检测结果为阴性
阴性参考品 N5	N5	含 HPV42、43、44 型混合阳性分泌物样本	检测结果为阴性
阴性参考品 N6-N15	N6-N15, 依次为 6.11.26.61.67.69.71.73.81.82	基因克隆对应型别基因组	检测结果为阴性

4.精密度:本试剂盒对不同来源（克隆质粒和临床样本）在低、中、高浓度水平上的测试结果 Ct 值的 CV 均小于 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 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/uL
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，HPV13 种高危型阳性符合率 95.84%，阴性符合率 95.88%，总体符合率 95.87%。HPV16、18 型阳性符合率 100%，阴性符合率 100%，总体符合率 100%。

【注意事项】

- 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。
- 本试剂盒仅用于体外检测。
- 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。
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。
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。
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。
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。
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。
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，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
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。
PCR 反应混合液应避免光低温保存。
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】

- 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
- 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
- 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
- Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
- Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology 11:1026-1030.
- 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
注册人/生产企业联系方式：
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

售后服务单位联系方式：

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 20163401443

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2021.05.19

修改日期：2022.04.25