

人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名：人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测女性宫颈脱落上皮细胞样本中的人乳头瘤病毒（HPV）6 型、11 型、16 型、18 型、26 型、31 型、33 型、35 型、39 型、42 型、43 型、45 型、51 型、52 型、53 型、56 型、59 型、66 型、68 型、73 型、81 型、82 型这 23 种型别的核酸 DNA，并鉴别基因型。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。

人乳头瘤病毒是一类分子量较小的无包膜的双链环状 DNA 病毒，专性侵染和寄生人体生殖器官及其它组织器官的上皮细胞。在临床上，根据人乳头瘤病毒不同亚型致病力大小或致癌危险性大小不同可将人乳头瘤病毒分为高危型和低危型两大类。低危型人乳头瘤病毒主要引起肛门皮肤及男性外生殖器、女性大小阴唇、尿道口、阴道下段的外生性疣类病变和低度子宫颈上皮内瘤。高危型人乳头瘤病毒除可引起外生殖器疣外，更重要的是引起外生殖器癌，宫颈癌及高度子宫颈上皮内瘤变。

【检验原理】

本试剂盒采用人乳头瘤病毒 23 种型别的特异性引物及荧光探针，应用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，分成 6 个反应管分别对人乳头瘤病毒 23 种型的特异性 DNA 片段进行分型检测。

PCR 检测体系含有 UDG 酶+dUTP 防污染措施，将可能的产物污染充分降解，避免假阳性结果。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测人表皮细胞中的β-球蛋白来评定采集的样本是否适用于扩增反应，监测待测样本中是否具有 PCR 抑制物及评价核酸提取的质量，避免 PCR 假阴性。

【主要组成成分】

| 序号 | 试剂名称                         | 规格与装量        |              | 主要成分                                      |
|----|------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------------------|
|    |                              | 24人份/盒       | 48人份/盒       |                                           |
| 1  | 人乳头瘤病毒分型-酶混合液                | 288μL /管×1管  | 288μL /管×2管  | Taq DNA聚合酶、UDG酶                           |
| 2  | 人乳头瘤病毒（16、18、33、39型）PCR反应液   | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 3  | 人乳头瘤病毒（45、59、35、66型）PCR反应液   | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 4  | 人乳头瘤病毒（51、52、53、68型）PCR反应液   | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 5  | 人乳头瘤病毒（31、56、58、β-球蛋白）PCR反应液 | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 6  | 人乳头瘤病毒（6、26、81、82型）PCR反应液    | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 7  | 人乳头瘤病毒（11、42、43、73型）PCR反应液   | 912μL /管×1管  | 912μL /管×2管  | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer |
| 8  | 人乳头瘤病毒分型-阴性对照                | 1000μL /管×1管 | 1000μL /管×1管 | 生理盐水                                      |
| 9  | 人乳头瘤病毒分型-阳性对照                | 200μL /管×1管  | 200μL /管×1管  | 含目的基因片段的克隆质粒                              |

备注：

- 1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 2) 推荐使用本公司核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）或样本释放剂（湘长械备 20150022 号）进行核酸提取。
- 3) 样本收集及保存采用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）。

【储存条件及有效期】

-20±5℃避光密闭储存，有效期 12 个月。

生产日期，失效日期请见外包装盒。

1 试剂盒在开盖后可于-20+5℃稳定存放。一旦使用，试剂盒反复冻融应不超过 5 次。

2 泡沫箱加冰袋运输 5 天，温度不高于 15℃不会影响产品效期。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1 适用样本类型：宫颈脱落细胞

2 样本采集

2.1 检查前要求：

2.1.1 检查应在非月经期内进行。

2.1.2 被采集对象 48 小时内不应有性行为。

2.1.3 检查 3 天内不应进行阴道冲洗或使用避孕药膏等阴道内用药物。

2.2 使用一次性无菌宫颈采样器（包含宫颈刷及细胞保存液）进行样本采集，具体操作步骤如下：

对于妇女宫颈可疑感染患者，采集宫颈口脱落细胞。采样前用棉拭子拭去宫颈口过多的分泌物，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 4 圈。慢慢取出宫颈刷，将其放入装有细胞保存液的样本收集管中。在管口处将多余的刷柄折断，密闭送检。

3 样本保存和运送：上述采集的样本可立即用于检测，室温(20℃)放置不超过 24 小时，2-8℃保存不超过 120 小时，-20±5℃保存不超过 7 个月，-70℃以下保存不超过 24 个月，反复冻融不超过 7 次。标本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输（不超过 5 天）。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1 取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，混匀后备用；

1.2 取 6 种人乳头瘤病毒 PCR 反应液 n×38μL 分别与 6 份 n×2μL 酶混合液(n=待检样本数+质控品 2 个),充分混匀成 PCR-混合液，2000rpm 离心 10 秒，置于 2-8℃保存待用。

2. 样本前处理（在样本处理区进行，阴性对照需与样本同步操作参与提取）

从样本收集管中吸取 1mL 样本至 1.5mL 离心管，作为待测样本备用，按如下方式处理：

2.1 处理方法 1：推荐使用圣湘生物科技股份有限公司的样本释放剂按其说明书操作进行核酸提取（样本用量为 500μL）。

2.2 处理方法 2：推荐使用圣湘生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂按其说明书操作进行核酸提取（样本用量为 200μL）。

3. 加样（在样本处理区进行）

3.1 待测样本及阴性对照：在 PCR 反应管中分别加入经上述前处理的待测样本核酸及阴性对照 10μL（避免取到细胞碎片等杂质）,需重复 6 次（即每个样本分别取 10μL 核酸提取液加入 6 个反应管中，注意不要混淆！）。

3.2 阳性对照：在 PCR 反应管中加入阳性对照 10μL，需重复 6 次（阳性对照无需进行前处理）。

3.3 各待测样本、阴性对照、阳性对照的 6 个反应管分别加入 40μL 上述已配制好的 6 种 PCR-混合液，盖上管盖（如有气泡，可用手指弹击，去除气泡），2000rpm 离心 10 秒或用手动轻甩至管壁无明显液珠。

4. PCR 扩增（请参照各仪器使用说明书进行设置）

4.1 将PCR反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照以及未知样本，并设置样本名称。

4.2 荧光检测通道选择：

- 1) 选择 FAM 通道，检测人乳头瘤病毒 6、11、16、45、51、56-DNA；
- 2) 选择 HEX 或 VIC 通道检测人乳头瘤病毒 18、43、53、58、59、82-DNA；
- 3) 选择 ROX 通道，检测人乳头瘤病毒 26、35、39、42、68-DNA 及β-球蛋白；
- 4) 选择 CY5 通道，检测人乳头瘤病毒 31、33、52、66、73、81-DNA。

4.3 循环参数设定：

| 步骤 |             | 温度  | 时间   | 循环数 |
|----|-------------|-----|------|-----|
| 1  | UDG 酶反应     | 50℃ | 2 分钟 | 1   |
| 2  | Taq 酶活化     | 94℃ | 5 分钟 | 1   |
| 3  | 变性          | 94℃ | 15 秒 | 45  |
|    | 退火，延伸，及荧光采集 | 57℃ | 30 秒 |     |
| 4  | 仪器冷却（可选）    | 25℃ | 10 秒 | 1   |

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

5. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节Baseline的Start值、End值以及Threshold值（用户可根据实际情况自行调整，Start值可以在3~15、End值可设在5~20，调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线），使各项参数符合下述“6. 质量控制”中的要求，然后记录Ct值。

6. 质量控制

6.1 人乳头瘤病毒分型-阴性对照：FAM、HEX/VIC、ROX、CY5 通道 Ct 值无显示。

6.2 人乳头瘤病毒分型-阳性对照：FAM、HEX/VIC、ROX、CY5 通道均有典型的 S 型扩增曲线且检测 Ct 值在 24-30 之间。

6.3 以上要求需在同一实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【阳性判断值】

通过参考值的研究（ROC 曲线法）确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 39，检测内标的 Ct 阳性判断值为 40。

【检验结果的解释】

1 阴阳性判断：

待检样本按照下表进行结果判断

| 序号 | 人乳头瘤病毒 PCR-混合液 | 若 FAM 通道≤39，则结果判断为 | 若 HEX 通道≤39，则结果判断为 | 若 ROX 通道≤39，则结果判断为 | 若 CY5 通道≤39，则结果判断为 |
|----|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1  | 16、18、33、39 型  | 人乳头瘤病毒 16 型        | 人乳头瘤病毒 18 型        | 人乳头瘤病毒 39 型        | 人乳头瘤病毒 33 型        |
| 2  | 45、59、35、66 型  | 人乳头瘤病毒 45 型        | 人乳头瘤病毒 59 型        | 人乳头瘤病毒 35 型        | 人乳头瘤病毒 66 型        |
| 3  | 51、52、53、68 型  | 人乳头瘤病毒 51 型        | 人乳头瘤病毒 53 型        | 人乳头瘤病毒 68 型        | 人乳头瘤病毒 52 型        |
| 4  | 31、56、58、β-球蛋白 | 人乳头瘤病毒 56 型        | 人乳头瘤病毒 58 型        | β-球蛋白              | 人乳头瘤病毒 31 型        |
| 5  | 6、26、81、82 型   | 人乳头瘤病毒 6 型         | 人乳头瘤病毒 82 型        | 人乳头瘤病毒 26 型        | 人乳头瘤病毒 81 型        |
| 6  | 11、42、43、73 型  | 人乳头瘤病毒 11 型        | 人乳头瘤病毒 43 型        | 人乳头瘤病毒 42 型        | 人乳头瘤病毒 73 型        |

- 1.1 对以上 1-6 种人乳头瘤病毒 PCR-混合液 FAM、HEX、ROX、CY5 通道，有通道测定 Ct 值≤39，且β-球蛋白检测为阳性（Ct 值≤40）的样本，报告相对应的人乳头瘤病毒型别阳性。
- 1.2 对以上 1-6 种人乳头瘤病毒 PCR-混合液 FAM、HEX、ROX、CY5 通道，有通道测定 Ct 值≤39，但是β-球蛋白检测为阴性（Ct 值> 40 或无显示）的样本，表明标本内没有宫颈上皮细胞，但该患者近期接触过人乳头瘤病毒，病人是否感染人乳头瘤病毒不能确定。建议对此样本进行重新取样再进行实验，如重复此现象，则报告相对应的人乳头瘤病毒型别阳性。
- 1.3 对以上 1-6 种检测混合液 FAM、HEX、ROX、CY5 通道，测定 Ct 值都>39，且β-球蛋白检测为阳性（Ct 值≤40）的样本，报告人乳头瘤病毒阴性。
- 1.4 对以上 1-6 种检测混合液 FAM、HEX、ROX、CY5 通道，测定 Ct 值都>39，若β-球蛋白检测 Ct 值> 40 或无显示，则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重新取样再进行实验（若重复试验的检测结果仍无效，请与本公司联系）。

【检测方法的局限性】

- 1 本试剂盒仅用于检测以下 23 种人乳头瘤病毒：人乳头瘤病毒 6 型、11 型、16 型、18 型、26 型、31 型、33 型、35 型、39 型、42 型、43 型、45 型、51 型、52 型、53 型、56 型、58 型、59 型、66 型、68 型、73 型、81 型、82 型
- 2 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 3 有关假阴性结果的可能性分析
- ①不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。
- ②高危型人乳头瘤病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。
- ③不合理的试剂保存可能会导致假阴性结果。
- ④未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子，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。

【产品性能指标】

1 准确性

检测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，无交叉反应。

2 特异性

经验证的其他 HPV 基因型、相关病原体等的交叉反应性及其验证浓度水平如下（经本试剂盒检测均为阴性）：

| 微生物名称          | 交叉反应浓度             | 微生物名称       | 交叉反应浓度             |
|----------------|--------------------|-------------|--------------------|
| 相关病原体          |                    |             |                    |
| 沙眼衣原体          | 1.00E+06 IFU/mL    | 淋球菌         | 1.00E+06 CFU/mL    |
| 解脲支原体          | 1.00E+06 CCU/mL    | 白色念珠菌       | 1.00E+06 CFU/mL    |
| 人型支原体          | 1.00E+06 CCU/mL    | 阴道毛滴虫       | 1.00E+06 cells/mL  |
| 单纯疱疹病毒 2 型     | 1.00E+06 PFU /mL   | 梅毒螺旋体       | 1.00E+06 copies/mL |
| 试剂盒检测范围外人乳头瘤病毒 |                    |             |                    |
| 人乳头瘤病毒 40 型    | 1.00E+06 copies/mL | 人乳头瘤病毒 44 型 | 1.00E+06 copies/mL |
| 人乳头瘤病毒 54 型    | 1.00E+06 copies/mL | 人乳头瘤病毒 61 型 | 1.00E+06 copies/mL |
| 人乳头瘤病毒 67 型    | 1.00E+06 copies/mL | 人乳头瘤病毒 69 型 | 1.00E+06 copies/mL |
| 人乳头瘤病毒 70 型    | 1.00E+06 copies/mL | 人乳头瘤病毒 71 型 | 1.00E+06 copies/mL |
| 人乳头瘤病毒 72 型    | 1.00E+06 copies/mL | 人乳头瘤病毒 83 型 | 1.00E+06 copies/mL |

3 精密度

各型别批间、日间、不同操作者间 Ct 值的变异系数（CV,%）均不大于 5%。

4 最低检出限

对 23 种人乳头瘤病毒基因型进行最低检出限研究，每种基因型确定最低检出限为 400copies/mL。

5 干扰物质

经验证的干扰物质的评价浓度水平及干扰情况如下：

| 干扰物质          | 浓度水平              | 是否存在干扰 |
|---------------|-------------------|--------|
| 血红蛋白          | 2g/L              | 否      |
| 白细胞           | 1.00E+07 cells/mL | 否      |
| 宫颈粘液          | 10%               | 否      |
| 避孕胶           | 0.5%              | 否      |
| 阴道灌洗液         | 0.5%              | 否      |
| 抗真菌软膏，含 2%克霉唑 | 0.5%              | 否      |
| 抗真菌软膏，含 4%咪康唑 | 0.5%              | 否      |
| 阴道润滑剂         | 10%               | 否      |

6 临床性能

与已上市同类产品对 909 例样本进行对比试验，18 种 HPV 高危型别（HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、26、53、66、73、82 型）的阳性符合率为 99.86%，阴性符合率为 93.27%，总符合率为 98.35%；3 种 HPV 低危型别（HPV6、11、81 型）的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.35%，总符合率为 99.45%。将 21 种型别单独进行分析，阳性符合率在 98.08%~100%之间，阴性符合率在 99.41%~100%之间，总符合率在 99.45%~100%之间。HPV42、43 型与测序结果进行对比分析，HPV 42 型的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%；HPV 43 型的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.89%，总符合率为 99.89%。

针对 HPV42 和 43 型，与已上市同类产品对 251 例样本进行对比试验，HPV42 型的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%；HPV43 型的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
4. 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常更换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求；卫生部《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》和《医疗废物管理条例》。
5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] Agorastos T,Diinas K, Lloveras B, et al.Human papilloma virus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer The Green experience[J].Gynecol Oncol,2005,96(3): 714-720.
- [3] Cuschieri KS, Cubie HA., The role of human papillomavirus testing in cervical screening. J Clin Virol, 2005;32: S34-42.
- [4] 李晴, 乌兰娜, 胡尚英, 吴瑞芳, 刘植华, 谢建生, 李瑞珍, 陈汶, 赵方辉, 乔友林 多重核酸扩增荧光检测技术在宫颈筛查中的效果评价, 中国肿瘤 2009; 8（4）：315-319。
- [5] Belinson SE, Wulan N, Li R, Zhang W, Rong X, Zhu Y, Wu R, Belinson JL. SNIPER: a novel assay for human papillomavirus testing among women in Guizhou, China. Int J Gynecol Cancer. 2010 Aug;20(6):1006-1010。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司  
住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号  
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876  
售后服务单位名称：圣湘生物科技股份有限公司  
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876  
生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号  
生产许可证编号：湘食药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223401003

【说明书核准日期及修改日期】2022 年 08 月 02 日