



人乳头瘤病毒(23个型)基因分型检测试剂盒 (PCR-反向点杂交法)说明书

【产品名称】

通用名称:人乳头瘤病毒(23个型)基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)

【包装规格】

10人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测尿道分泌物、宫颈脱落细胞、疣体细胞等样本中人乳头瘤病毒(HPV)基因型别,包括HPV11、42、43、44等5种低危型,以及HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、C8304等18种高危型^[1],并且可以分型检测。

检测结果仅供临床参考,不能单独作为确诊或排除疾病的依据。对于未充分验证的检测结果,本产品不得用于宫颈筛查的预期用途。

【检验原理】

设计特异的PCR引物且其5'端用生物素进行标记,从而获得HPV基因型别。PCR扩增后,将扩增产物与生物素标记的探针(11区),根据检测位点碱基差异,按照碱基配对原则,进行特异性杂交。探针长度为15~25bp,探针5'端用氨基标记,通过化学键作用固定在尼龙膜的特定位点上,探针符合探针杂交的条件。

将带有生物素(Biotin)标记的PCR扩增产物与膜上的探针在一定的温度下进行杂交。杂交后,用链霉亲和素-过氧化物酶(POD)结合,在过氧化物酶(H₂O₂)的催化下,使显色底物TMB发生显色反应。通过观察特定位置显色(蓝色)与否来判断HPV的基因型别。检测结果通过分析软件、自动分析系统。

【主要组成成分】

表1、试剂盒组成表(10人份/盒)

组分名称		规格	数量	主要成分	
试剂盒 I	核酸提取试剂	HPV DNA提取液	1mL/管	1	chelex 100, Tris HCl, NaOH, Triton-100, NP-40, EDTA
	PCR反应试剂	HPV23PCR反应管	45μL/管	10	引物、dNTPs、Taq DNA聚合酶/UNG酶系、缓冲体系
		HPV23阳性质粒	30μL/管	1	灭活HPV16型阳性样本
		HPV23阴性质粒	30μL/管	1	灭活HPV23个型阴性样本
试剂盒 II	杂交试剂	A液 (5×)	20mL/瓶	1	SSC、SDS
		B液 (5×)	40mL/瓶	1	SSC、SDS
		C液	5mL/瓶	1	POD
		D液 (5×)	40mL/瓶	1	柠檬酸钠
		E液	5mL/瓶	1	TMB、无水乙醇
		F液	5mL/瓶	1	H ₂ O ₂
		HPV23膜条	10张/袋	1	尼龙膜、探针

需自备的试剂和耗材:灭菌1.5mL离心管, 15mL和50mL离心管若干(手动杂交用)

质控品说明: HPV分型阳性和阴性质控品分别来源于临床收集的HPV16阳性或HPV阴性宫颈脱落细胞或分泌物样本, 经生理盐水处理, 离心沉淀, 再用蒸馏水悬浮所得液体。以上质控品均经过灭活处理。

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

【储存条件及有效期】

1. 储存条件: 试剂盒I(核酸提取和PCR试剂)保存于-20±5℃, 应避免反复冻融; 试剂盒II(杂交试剂)保存于2~8℃。
2. 有效期: 本试剂盒在以上所述相应储存条件下的有效期为6个月。

生产日期和有效期见产品标签。

- (注: 1. 开瓶复融稳定性: 试剂盒在开瓶8h后仍然合格, 但长时间开瓶溶液易蒸发, 应尽量避免;
2. 运输稳定性: 试剂盒在密封冰盒泡沫箱中7天检测合格。能够满足国内长途运输试剂的性能要求;
3. 反复冻融稳定性: 反复冻融6次仍合格, 但临床应用应尽量避免试剂的反复冻融。)

【适用仪器】

普通PCR仪如Takara TP600; 杂交仪器[自动杂交仪器: 自动杂交仪(泰普生物科学(中国)有限公司生产, 型号: TIB 3000) 或者手动杂交仪器: 普通电热恒温水浴槽]。

【样本要求】

1. 标本采集:

- (1)尿道分泌物: 在无菌条件下, 用棉拭子伸入尿道内, 旋转数周并停留片刻后取出;
- (2)宫颈脱落细胞: 在无菌条件下, 用宫颈刷伸入宫颈管内2cm, 旋转数周并停留片刻后取出;
- (3)疣体细胞: 用无菌棉拭子在疣体部位刮取上皮组织。

2. 保存: 当检测或模拟样本置于含有1mL生理盐水的无菌离心管中, 振荡并挤干, 留取样本待检测。标本可立即用于测试, 或-20℃保存待测, 保存期为6个月。

3. 运送: 标本运送在0℃左右条件下进行。

(注: 经干扰试验验证, 少量血液及外用药物不影响试剂盒的性能, 但临床取样应尽量避免)

【检验方法】

1. 标本处理

- (1)将样本管中样本液均匀加入200μL离心管, 10,000rpm离心5分钟, 弃上清, 留沉淀(若样本有其他杂质如血液或激素等, 可以使用生理盐水洗涤1~2次);
- (2)阳性和阴性质粒解冻混匀, 各取10μL, 分别加入1.5mL的离心管;
- (3)样本沉淀及质粒品, 分别加50μLDNA提取液混匀, 煮沸10分钟, 10,000 rpm离心5分钟, 上清备用。

2. PCR扩增

- (1)取HPV23 PCR反应管, 分别加入样本提取液或质粒品提取液上清5μL;
- (2)PCR扩增: PCR反应管液6,000rpm离心, 放入PCR仪, 按下程序条件扩增:
[50℃ 3分钟, 93℃ 40秒—55℃ 40秒—72℃ 40秒]×40个循环; 72℃ 7分钟]; [95℃ 5分钟, 4℃ 5分钟]
“注意! 下划线程序为PCR产物变性程序, 程序结束后, PCR产物需要立即放于冰上用于杂交, 如不及时杂交, 在杂交前需将PCR产物放入PCR仪再补充这个程序。

3. 杂交反应

杂交用各试剂准备按表2:

试剂名称	数量规格	配制方式	备注
A液(5×)	20mL/瓶	加80mL纯水稀释	在低温出现结晶时需先预热溶解再稀释
B液(5×)	40mL/瓶	加160mL纯水稀释	在低温出现结晶时需先预热溶解再稀释
D液(5×)	40mL/瓶	加160mL纯水稀释	在低温出现结晶时需先预热溶解再稀释

将待检样本及质粒品的编号标注在HPV23膜条上。

(1) 自动杂交程序(选用泰普生物科学(中国)有限公司生产的自动杂交仪, 型号: xxxxx):

- 1) 将A、B、D稀释液倒入仪器的对应编号的瓶中, 将C、E、F瓶推入仪器对应编号的导管接口;
- 2) 打开仪器开关, 选择“出仓”, 在每个杂交槽放入膜条1张(正面朝上), 加PCR产物40μL(液体均匀滴加在膜条上), 选择“进仓”, 选择“HPV基因分型”杂交程序, 并选择所使用的杂交槽的编号; 选择“开始”; 杂交结束后, 选择“出仓”, 取出膜条, 选择“进仓”关机。

(2) 手动杂交程序:

1) 杂交:

取15mL离心管, 放入标记膜条1张, 加5~8mL预热的A液, 对应的40μL PCR产物, 盖紧管盖, 放入振荡水槽, 46℃轻摇(100~150转/分), 60分钟, 弃去液体。

2) 洗膜:(每次可同时处理5张膜条)

取50mL离心管, 加A液20mL, C液1mL, 混匀, 放入杂交膜条, 46℃轻摇(40~50转/分)10分钟, 弃去液体; 加B液40mL, 46℃轻摇3分钟, 弃去液体, 重复1次;

加D液40mL, 46℃轻摇3分钟, 弃去液体。

3) 显色:(每次可同时处理5~10张膜条)

取50mL离心管, 加D液20mL, E液1mL, F液1mL, 混匀即为显色液, 放入膜条在室温避光静置8分钟, 弃去液体。(注: 显色液根据实际用量按上述比例配制, 现配现用, 如出现配制后已经变蓝, 请重新配制, 如果显色反应控制点(CC)颜色较浅, 可以适当延长显色时间3~5分钟, 至充分显色。)

加D液40mL, 轻摇3分钟, 弃去液体。

加水40mL, 轻摇3分钟, 弃去液体。取出杂交膜条, 杂交完成。

4. 膜条扫描

用吸水纸吸去膜条表面水分, 在扫描仪上尽快扫描(若不能立即进行扫描, 密封保存于-20℃)。

5. 结果分析

按照自动点杂交分析软件(泰普生物科学(中国)有限公司所制)操作说明书的要求, 倒入膜条扫描图, 选择“HPV23基因分型”程序, 设定相应的参数并进行数据分析, 导出检测结果报告单。详见软件使用操作说明书。

6. 质控标准

显色反应控制点CC: 信号值应≥cutoff值, 表示杂交显色过程正常。

PCR反应体系控制点PC: 信号值应≥cutoff值, 表示PCR体系正常。

HPV23阳性质粒品: 杂交膜条上PC、CC、A3点呈阳性, 其它位点为阴性。

HPV23阴性质粒品: 杂交膜条上PC、CC点呈阳性, 其它点为阴性。

在以上各项同时满足的条件下, 本次检测实验可信、有效, 否则实验应重新进行。

【阳性判断值】

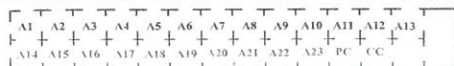
所有结果判断以膜条分析软件计算结果或通过肉眼根据显色位点判断。

杂交点信号值反映的是杂交点的积分光密度(IOD), 显色控制点(CC)IOD≥cutoff值为显色正常, 当低于这个数值时将显示“ERROR”, 原因是可能没有正确的斑点区域选取, 或者杂交过程出现异常。

PC、CC点及各型别检测点cutoff值根据统计学方法计算得出，已预设分析软件中。

【检测结果解释】

HPV 基因分型杂交荧光共设置25个探针点，包括CC、PC控制点，A1-A23型别检测点。线条探针阵列排列示意图如下：



1. 结果判定：CC点、PC点及各型别检测点cutoff值已预设分析软件中，分析结束后软件自动生成各位点信息，包括实验可信性、样本HPV基因型别。

2. 成功检测试验显色点组合及结果解释的对应关系如下表3：

序号	控制和指示点	型别检测点	结果解释（HPV基因型别）
1	CC、PC	A1	6
2	CC、PC	A2	11
3	CC、PC	A3	16
4	CC、PC	A4	18
5	CC、PC	A5	31
6	CC、PC	A6	33
7	CC、PC	A7	35
8	CC、PC	A8	39
9	CC、PC	A9	42
10	CC、PC	A10	43
11	CC、PC	A11	44
12	CC、PC	A12	45
13	CC、PC	A13	51
14	CC、PC	A14	52
15	CC、PC	A15	53
16	CC、PC	A16	56
17	CC、PC	A17	58
18	CC、PC	A18	59
19	CC、PC	A19	66
20	CC、PC	A20	68
21	CC、PC	A21	82
22	CC、PC	A22	84
23	CC、PC	A23	89
24	CC、PC	多个点组合阳性	混合感染
25	CC、PC	A1-A23均阴性	1. 样本无HPV感染或感染低于本试剂盒检测下限 2. 可能存在非HPV感染性炎症以外的其他原因 3. 存在其他检测序列交叉

3. 杂交后膜条显色示意图示例如下：



【检验方法的局限性】

- 浓度低于本试剂盒最低检出量的样本无法确保分型结果。
- 本试剂盒可以检测HPV高危型18种，包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、CP8304和HPV低危型5种，包括HPV6、11、42、43、44，对HPV其它型别无法检测。
- 未在本试剂盒设计范围内的某些核酸序列随机突变可能导致检测失败。

【产品性能指标】

- 最低检出量：本试剂盒对23种型别的HPV标本的最低检出量为 1×10^3 拷贝/mL。
- 特异性：
干扰验证表明，试剂盒对半排入的尿液、血液样本以及对混入少量阴道外用药品可定阴道菌群、磷酸肌酸、核酸的样本检测结果无影响。
交叉特异性及型间交叉验证情况：试剂盒对于泌尿生殖道病原体包括梅毒螺旋体（TP）、人型支原体（MH）、淋球菌（NG）、沙眼衣原体（CT）、解脲支原体（UU）和其他亚型HPV（包括HPV 3、4、10、27、28、41、49等常见型别阳性样本）无交叉反应。

3. 精密度：本试剂盒对同一样本多次检测的精密度一致。

【注意事项】

- 本品仅用于体外诊断。
- 实验前请仔细阅读本说明书。
- 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质。避免接触到皮肤和粘膜，样本的处理建议在可防止气溶胶外泄的生物安全柜中进行。操作中使用的所有试剂、耗材等均应符合国家法规要求。《生物安全实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 试剂盒内阳性对照品和阴性对照品经检测证明已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保人源性物质不含传染性物质。所有人源性物质都可能具有潜在的传染性，操作时应视为传染性物质进行处理。
- 实验人员必须进行专业培训。PCR实验室应与杂交室分开。PCR实验室应分别在样品处理区、PCR扩增区、扩增区和杂交室分别进行。各区应相对分隔。人和实验用物品应从样品处理区 → PCR扩增区 → 扩增区 → 杂交室单向流动。PCR试剂盒不可存放于杂交室。
- 为试剂和标本准备阶段提供负压净工作台。实验过程中请穿工作服，PCR室和杂交室工作版应分开，带一次性手套，使用自前管移液器。
- 对每次实验进行质量控制。
- 标本处理：加入浓缩液后去上清液需小心操作，浓缩液应尽量吸去，不碰及沉淀；沉淀加入50μL DNA提取液时，因DNA提取液内含不溶于水的颗粒物，吸取时需加样器充分混匀。如出现因吸头顶部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用无齿剪刀将吸头顶部剪去一截。
- PCR反应使用0.15mL离心管。吸头应远离离心管并一次性使用；杂交操作时，仔细核对DNA扩增产物的编号，使之相符。
- 杂交室过程需避免用手接触膜条，并用镊子吸取膜条边角进行操作，避免划破膜条，并用铅笔在边角标记。油性笔标记会影响信号分析的准确性。
- 本实验需在室温20~30℃的环境下进行，若环境温度过低，实验结果可能不准确。
- A液和B液易结晶析出，浓缩液稀释前需温浴（40~50℃）使之溶解。
- 反应结束后，膜条进行扫描时务必先用吸水纸吸干表面水分，并且平整地放到扫描仪上。在图片预览时膜条上不出现在水渍和褶皱现象，否则会影响信号分析结果的准确性。
- 标本制备区所用过的吸头请打入含有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭活后方可丢弃。
- 实验完毕用10%次氯酸或70%酒精或紫外线灯处理工作台面和移液器。

【参考文献】

- 人乳头瘤病毒检测及其临床应用，赵建群，王旭波主编，人民卫生出版社，2009.11第一版，160-161页。
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, et al. Epidemiologic evidence that human papillomavirus causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst. 1993;85:958-64.
- Rush FK, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst. 1995;87:796-802.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999;189:12-9.
- Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol. 2000;19:1-5.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：泰普生物科学（中国）有限公司
住所：厦门市同安区西洲路2043号11层
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
售后服务单位：泰普生物科学（中国）有限公司
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
生产地址：厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元；2045号101、201、501单元
生产许可证编号：闽药监械生产许20110184号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准20163401198

【说明书核准及修改日期】 2016年06月29日批准；2017年10月27日修改；2018年03月15日修改；
2020年03月18日修改；2020年12月10日修改；2022年06月08日修改。