

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒（HPV）核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测女性宫颈脱落上皮细胞样本中的高危型人乳头瘤病毒（HPV）16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82（基因型）核酸，并对 16、18 型进行分型鉴定。检验结果不作为人乳头瘤病毒（HPV）感染的判断依据。

本公司开发的试剂盒适用于女性感染 HPV 病毒的辅助诊断，检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他检测方法对病情进行综合分析。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】

本试剂盒选用高危型人乳头瘤病毒（HPV）基因保守区段设计特异引物 Taqman 探针，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人乳头瘤病毒 HPV（16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82）核酸实行定性检测。

试剂盒中的内标选用一对管家基因特异性引物，结合特异性探针，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，内标选用 CY5 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组成	主要成分	规格
核酸提取液	Tris、EDTA、NaCl、NaOH、NP-40、Triton-100、Chelex-100	1.8mL×1
人乳头瘤病毒主反应液	Tris-HCl(pH8.9)、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP、dCTP	1.2mL×1
人乳头瘤病毒荧光探针	引物、荧光探针	70μL×1
Taq 酶	DNA 聚合酶及其抗体	28μL×1
人乳头瘤病毒阳性对照	主要成分为 HPV16、18 及 35 型基因组 DNA(重组克隆)	100μL×1
阴性对照	主要成分为 NaCl	100μL×1

注：本试剂盒采用煮沸法提取核酸，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℃保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复冻融不得超过三次；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明，运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为 ABI7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：女性宫颈脱落上皮细胞样本。
2. 采集：采样前先用棉拭子将宫颈口过多的分泌物轻轻擦拭干净。推荐采用潮州凯普生物化学有限公司生产的一次性宫颈细胞采样器（货号：KPCJ1，包含细胞保存液）。采集样本时毛刷紧贴宫颈口粘膜，顺时针转动 3~5 周，以取得宫颈脱落细胞。慢慢取出毛刷，将其放入相应的细胞保存液中，在样品管上标记样本名称及类型。
3. 存放：标本可立即检测；标本 2-8℃保存应不超过 48 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。
4. 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】

标本试管中加入 1mL 无菌生理盐水（冻存标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。

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】

从试剂盒中取出人乳头瘤病毒主反应液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数[n=样本数+2（对照品数）]。每人份反应体系配制如下：

试 剂	人乳头瘤病毒主反应液	人乳头瘤病毒荧光探针	人乳头瘤病毒酶混合液
用 量	33.2μL	2μL	0.8μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，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. 加样【样本处理区】

按一定顺序向反应液中分别加入 4μL 的阴性对照、阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 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℃	10 分钟
2	40	94℃	15 秒
		60℃	30 秒（收集荧光）

检测荧光选择：FAM 检测样本 HPV（26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82）；ROX 检测样本 HPV（16）；VIC 检测样本 HPV（18）；内标（CY5）。

【阳性判断值】

ROX 通道检测 Ct≤38 时，则判断该样本为 HPV16 型阳性。

VIC 通道检测 Ct≤38 时，则判断该样本为 HPV18 型阳性。

FAM 通道检测 Ct≤38 时，则判断该样本为 HPV26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 型其中一种或一种以上检测为阳性。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。阳性对照 FAM、ROX、VIC 通道 Ct 值应小于 38，阴性对照 Ct 值无数值。

1. 检测样本 FAM 通道 Ct 值 ≤ 38.0 者判为 HPV（26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82）其中一种或一种以上检测阳性，Ct 值 >38.0 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 <40 者为该通道检测 HPV 型别一种或一种以上型别阳性，否则为检测阴性。
2. 检测样本 ROX 通道 Ct 值 ≤ 38.0 者判为 HPV（16）检测阳性，Ct 值 >38.0 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 <40 者为 HPV（16）型别阳性，否则为检测阴性。
3. 检测样本 VIC 通道 Ct 值 ≤ 38.0 者判为 HPV（18）检测阳性，Ct 值 >38.0 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 <40 者为 HPV（18）型别阳性，否则为检测阴性。
4. 检测样本 FAM、ROX 以及 VIC 通道 Ct 无数值，需要查看内标 Ct 值（CY5 通道），如果内标 Ct 值 <40 的标本为阴性标本，内标 Ct 值无数值则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

【检验方法的局限性】

1. 检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医生参考使用。
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、以及不当实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
3. 由于本试剂盒不含 UNG 酶，请勿在 PCR 结束后开盖处理扩增产物，增加污染的风险。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管无破损，标签完好。
2. 本试剂盒可以检出 HPV 国家参考品中 HPV16、HPV18、HPV26、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68、HPV73、HPV82 型别。对于 HPV6、HPV11、HPV40、HPV42、HPV43、HPV44、HPV54、HPV61、HPV70、HPV72、HPV81、HPV83、CP8304 均不能检出。
3. 阳性符合率：21 份阳性参考品，检验结果均应为阳性，符合率（+ / +）为 21/21。
4. 阴性符合率：17 份阴参考品，检验结果均应为阴性，符合率（- / -）为 17/17。
5. 分析特异性：本试剂盒与 HPV6、HPV11、HPV40、HPV42、HPV43、HPV44、HPV54、HPV61、HPV70、HPV72、HPV81、HPV83、沙眼衣原体（CT）、解脲支原体（UU）、淋球菌（NG）无交叉反应；500mg/mL 的游离血红蛋白、300 个/HPF（高倍视野）的白细胞对结果无明显影响。
6. 检测限：检测限参考品 L1-L21，检测结果均达到 500copies/mL。
7. 精密度：精密度参考品重复测试 10 次，Ct 值的变异系数（CV，%） $\leq 5.0\%$ 。

【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。
3. 实验请严格分区操作：
第一区：试剂准备区-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：PCR 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。
4. 本产品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. 每次实验应设置阴性对照和阳性对照，不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
7. 待测样本尽可能新鲜，提取过程严防 DNA 酶污染及操作不当导致的 DNA 降解。
8. -70°C 保存的样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
9. 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。
10. 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。
11. 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，避免泄露污染仪器。
12. 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。
13. 实验中用过的枪头请直接打入盛有 1%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同丢弃。
14. 工作台及各种实验用物品经常用 1%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。
15. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板孔。
16. 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. 《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. 《微生物标本采集手册》
5. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
6. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
7. 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：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋（NW-07）501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋（NW-06）504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163401513

【说明书核准日期及修改日期】2021.06.28