

人乳头瘤病毒（HPV）核酸分型检测试剂盒 （荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：人乳头瘤病毒（HPV）核酸分型检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 人份/盒、240 人份/盒、480 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用于对妇女宫颈脱落细胞中的人乳头瘤病毒（6、11、16、18、31、33、35、39、42、45、51、52、53、56、58、59、66、68、70、73、81、82、83）DNA 进行分型检测。

人乳头瘤病毒是一种双链闭环小 DNA 病毒，包含约 8000 个碱基对，呈球形，直径 52nm~55nm，20 面体立体对称，无包膜。具有嗜上皮性，人类是 HPV 的唯一宿主，具有高度的宿主特异亲和力。

本试剂盒用于人乳头瘤病毒感染的辅助诊断，可对各组中人乳头瘤病毒的具体型别进行鉴定；本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为确诊或排除的唯一依据。

由于未做相关的临床验证，本试剂不能用于 ASC-US 人群分流、宫颈癌筛查的预期用途。

【检验原理】

本试剂盒在 HPV 的 L1 基因上，针对 23 种型别的 L1 基因设计特异性引物探针，采用了 PCR 扩增结合分子信标熔解曲线技术对 HPV 进行分型检测。本试剂盒首先扩增 23 种型别 HPV 特异性片段，扩增产物与所设计的分子信标探针杂交，收集荧光信号，通过相应的 T_m 值判断 HPV 的型别。试剂盒分 A 体系和 B 体系，A 体系主要分型检测 13 种 HPV 型别（6、11、16、18、31、33、35、42、45、52、58、59、68），B 体系主要分型检测 10 种 HPV 型别（39、51、53、56、66、70、73、81、82、83）及内标，A 体系的荧光通道选择 FAM（465-510）、HEX（533-580）/VIC 和 CY5（618-660），B 体系的荧光通道选择 FAM（465-510）、HEX（533-580）/VIC、TXR（533-610）/ROX 和 CY5（618-660）。

【主要组成成分】

人乳头瘤病毒（HPV）核酸分型检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）所有试剂均在同一个盒子中，组成如表 1 所示：

表 1 试剂盒组成

序号	组分名称	组成成分	装量		
			48 人份/盒	240 人份/盒	480 人份/盒
1	HPV 阴性对照	含人基因组 DNA 溶液	1 管（1000 μ l/管）	1 管（3ml/管）	1 管（5ml/管）
2	HPV 阳性对照	含 HPV16 质粒和 HPV73 质粒的人基因组 DNA 溶液	1 管（1000 μ l/管）	1 管（3ml/管）	1 管（5ml/管）
3	HPV 弱阳性对照	含 HPV16 质粒和 HPV73 质粒的人基因组 DNA 溶液	1 管（1000 μ l/管）	1 管（3ml/管）	1 管（5ml/管）
4	HPV 反应液 A	含引物、探针、dNTPs、氯化镁和水等	1 管（730 μ l/管）	1 管（3650 μ l/管）	1 管（7300 μ l/管）
5	HPV 反应液 B	含引物、探针、dNTPs、氯化镁和水等	1 管（730 μ l/管）	1 管（3650 μ l/管）	1 管（7300 μ l/管）
6	HPV 混合酶液	含 Taq 酶和 UNG 酶	1 管（40 μ l/管）	1 管（230 μ l/管）	1 管（425 μ l/管）

备注：不同批号间的试剂不能互换。

本试剂盒配合使用杭州迪安生物技术有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：浙杭械备 20150019 号）；配合使用的样本保存液为上海透景生命科技股份有限公司生产的细胞保存液（备案号：沪浦械备 20140074 号）。

【储存条件及有效期】

包装后的试剂盒应避光密封保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，有效期为 11 个月。采用泡沫盒加干冰或冰袋密封进行运输。试剂盒反复冻融次数不能超过 5 次（超过 5 次未经验证）。开瓶后避光密封保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，有效期限为 1 个月。生产日期及有效期限见产品包装。

【适用仪器】

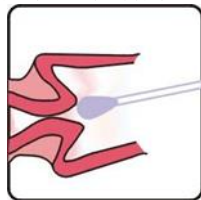
本品适用于 Roche LightCycler-480 II 实时荧光定量 PCR 仪、MC-1000 实时荧光定量 PCR 仪（杭州迪安生物技术有限公司）。

【样本要求】**1. 检查前准备**

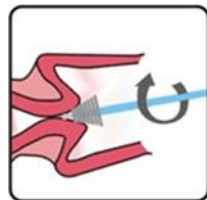
月经正常妇女，在月经来潮后 10~18 天为最佳检查时间；检查前三天内不要做阴道冲洗，检查前禁用阴道内用药物等；检查前 24 小时内不应有性行为；检查前不进行醋酸、碘液的涂抹。

2. 样本采集

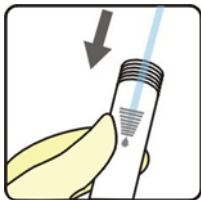
以专用宫颈脱落细胞采集器进行采样。医护人员先以窥阴器或阴道扩张器暴露宫颈，用生理盐水浸湿的棉拭子将宫颈口过多的分泌物擦去。取出宫颈刷置于宫颈口，在宫颈口顺时针旋转 4~5 周以获得足量的脱落细胞样本，然后将宫颈刷头部放入细胞保存液中，沿刷柄折痕处将宫颈刷柄折断，旋紧细胞保存液管盖，做好样本标示，并保持细胞保存液管直立放置。取样时尽量避免出血过多而影响检测结果可靠性。



医护人员以窥阴器暴露宫颈口，用棉拭子将宫颈口的分泌物擦去



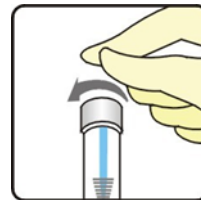
将宫颈刷伸入宫颈口处紧贴宫颈口顺时针轻柔转动 4~5 周。



慢慢抽出宫颈刷，将其放入装有细胞保存液的洗脱管中



在管口处沿刷柄折痕将宫颈刷折断，宫颈刷头留在洗脱管中



旋紧管盖，做好样本标识并保持洗脱管直立放置

3. 样本保存

标本一经采集，应尽快送检；标本室温保存不超过 48 小时， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 7 天； $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 6 个月，样本冻融次数不能超过 2 次 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 下可保存 15 个月，避免反复冻融。提取好的核酸室温保存不超过 48 小时， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 7 天， $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 以下保存不超过 5 个月，核酸冻融次数不超过 3 次（3 次以上未经验证）。

【检验方法】**1. 样本处理（样本处理区）**

本试剂盒应配合使用杭州迪安生物技术有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20150019 号），请根据该试剂盒的使用说明书的要求进行样本核酸提取；本试剂盒内对照品应与样本平行处理。

2. 扩增试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 HPV 反应液 A、HPV 反应液 B，在室温下融化后取出 HPV 混合酶液，根据样本数量和对照品数量分别配制 PCR 工作液 A、B（各反应数=待检样本 N 个+阴性对照 1 个+阳性对照 1 个+弱阳性对照 1 个），各试剂比例如表 2 所示：

表 2 试剂盒各组分比例表

组分	HPV 反应液 A/B	HPV 混合酶液
用量	14.6 μ L $\times$ （N+3）	0.4 μ L $\times$ （N+3）

按上述配置好 PCR 工作液后进行加样，每个反应中 PCR 工作液加 15 μ L，扩增模板加 25 μ L。

3. 荧光 PCR 检测（检测区）

将反应管放入荧光 PCR 检测仪中，扩增阶段循环参数设定如表 3：

表 3 扩增参数设定表

步骤	循环数	温度（℃）	反应时间（min:sec）	Roche LightCycler-480 II 升降温速率（℃/s）	MC-1000 升降温速率（℃/s）
1	1	50	05:00	4.4	2.9
2	1	95	10:00	4.4	3.0
3	55	94	00:15	2.2	2.2
		45	00:30	2.2	2.2
		68	00:20	4.4	3.0

检测阶段参数设置如表 4：

表 4 检测参数设定表

步骤	温度（℃）	反应时间（min:sec）	Roche LightCycler-480 II			MC-1000	
			收集模式	升降温速率（℃/s）	收集频率（per ℃）	升降温速率（℃/s）	信号采集
1	95	05:00	None	4.4	—	3.0	—
2	37	05:00	None	2.2	—	2.2	—
3	75	—	Continuous	0.04	4	0.04	√
4	37	00:01	None	2.2	—	—	—

Roche LightCycler-480 II：荧光通道选择 FAM（465-510）、HEX（533-580）、TXR（533-610）和 CY5（618-660），熔解因子设置为 1.2，定量因子设置为 10，最大整合时间设置为 2；

MC-1000：荧光通道选择 FAM、VIC、ROX 和 CY5；反应体系设置均为 40 μ L。

【阳性判断值】

- 通过检测每种型别在各自荧光通道的 T_m 值，用统计学方法计算双侧 95% 的百分位数，确定了本试剂盒检测范围内各型别的阳性判断值，具体如表 5 所列，根据熔解峰的 T_m 值判定 HPV 的型别。
- 本试剂盒只对检测对象进行定性分析，以相应荧光通道出现熔解峰的 T_m 值进行判断，峰的高低不能作为定量的依据。

表 5 T_m 值与 HPV 型别的对应关系表

组别	通道	T _m 值	HPV 型别	组别	通道	T _m 值	HPV 型别
A	FAM（465-510）	64.44~67.22	6	B	TXR（533-610）/ROX	69~73	内标
		57.93~59.79	11		FAM（465-510）	52.84~54.35	56
		52.33~57.45	16			57.03~58.18	82
		49.82~52.00	45			58.46~60.20	51
	HEX（533-580）/VIC	61.77~63.89	58			50.65~52.50	81
		57.11~59.13	52		HEX（533-580）/VIC	64.98~66.49	66
		54.69~55.90	33			57.79~59.75	83
		47.09~48.63	68			63.72~65.41	73
		52.40~54.00	18		CY5（618-660）	45.35~47.35	39
	CY5（618-660）	57.93~64.00	31			54.63~56.33	70
		55.16~56.91	35			60.46~66.92	53
		51.17~53.13	59		/	/	/
		47.49~49.24	42		/	/	/

【检测结果的解释】

检测过程结束后，选择“analysis（分析）”按钮，点击“T_m calling（T_m 值分析）”功能并“calculate（计算）”，进行结果分析；在分析熔解曲线时，手动调整并固定曲线图纵坐标最低值至-0.3，最高值至 0.3（若存在高于 0.3 或低于-0.3 的结果，则不进行调整），再观察熔解曲线并作如下分析：

本试剂盒检测结果应满足以下条件：

- 阴性对照孔中 A 反应检测无 T_m 值；B 反应检测在 TXR（533-610）/ROX 通道的相应位置均应有内标 T_m 值。
- 阳/弱阳性对照孔中 A 反应检测和 B 反应检测均呈现 HPV16 和 HPV73 型别相应的 T_m 值。
- 上述条件应同时满足，可进行如下判断：
- 存在明显熔解峰，则读取各通道 T_m 值并依据表 5 进行型别判定；不存在 T_m 值范围内的熔解峰且有内标峰，则判为 HPV 阴性；熔解峰图示例如本条目 7 所示。
- 难以判定是否为阳性的熔解峰则通过计算峰高来判定，具体峰高判定值如表 6 所示，若检测结果的峰高低于但接近峰高判定值，建议结合临床情况用其他方法进一步确认。

表 6 峰高与 HPV 型别的对应关系表

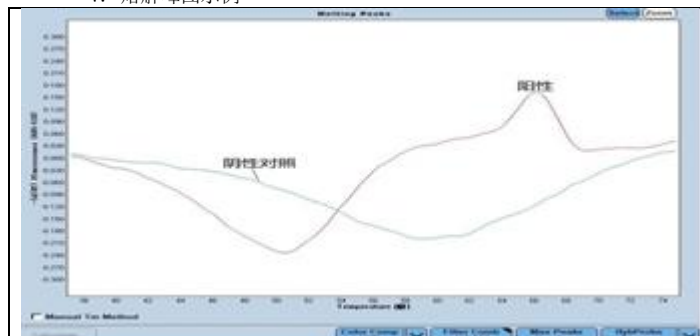
组别	通道	峰高判定值	HPV 型别	组别	通道	峰高判定值	HPV 型别
----	----	-------	--------	----	----	-------	--------

A	FAM (465-510)	0.025	6	B	TXR (533-610) /ROX	/	内标
		0.025	11		FAM (465-510)	0.014	56
		0.055	16			0.015	82
		0.032	45			0.014	51
	HEX (533-580)/VIC	0.040	58			0.020	81
		0.025	52			0.021	66
		0.024	33		HEX (533-580)/VIC	0.010	83
		0.030	68			0.011	73
		0.026	18			0.011	39
	CY5 (618-660)	0.021	31		CY5 (618-660)	0.015	70
		0.036	35			0.015	53
		0.015	59			/	/
		0.010	42		/	/	/

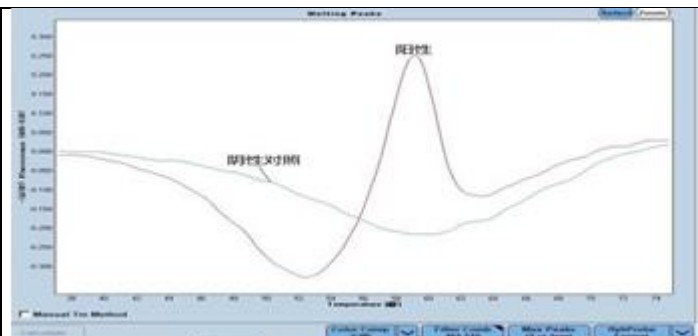
5. 样本孔所有检测通道只有一个阳性熔解峰（内标峰除外），则为单一 HPV 型别感染；

6. 样本孔所有检测通道有两个及以上阳性熔解峰（内标峰除外），则为多重 HPV 型别感染；

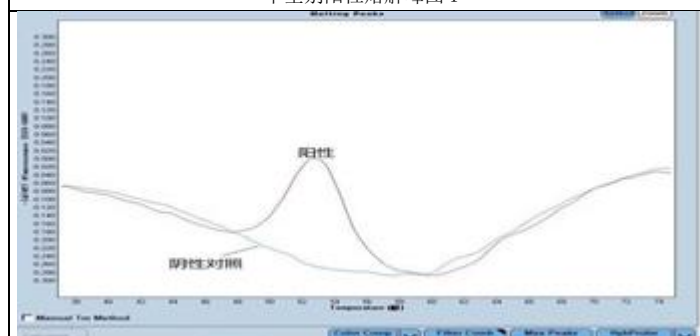
7. 熔解峰图示例



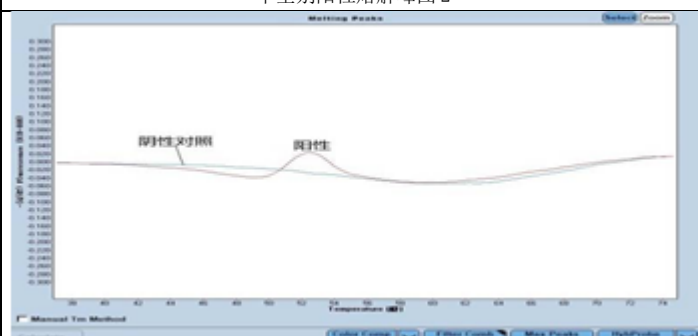
单型别阳性熔解峰图 1



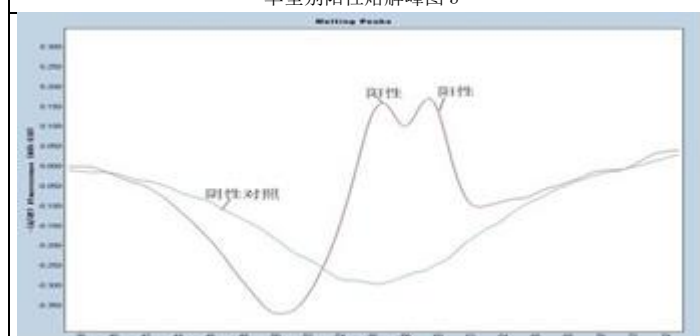
单型别阳性熔解峰图 2



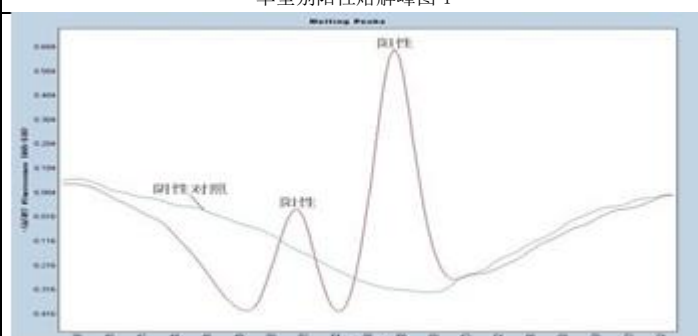
单型别阳性熔解峰图 3



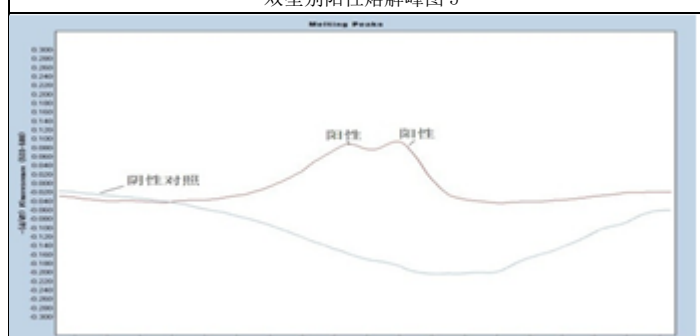
单型别阳性熔解峰图 4



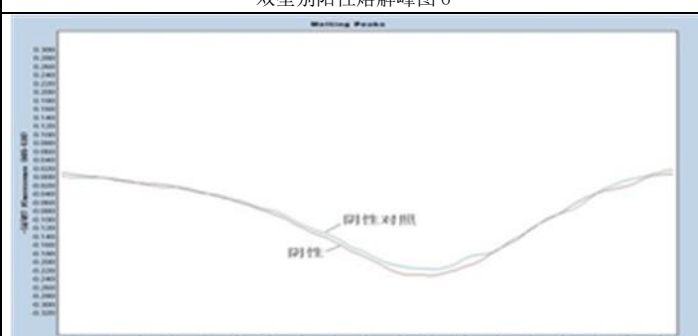
双型别阳性熔解峰图 5



双型别阳性熔解峰图 6



双型别阳性熔解峰图 7



阴性熔解峰图 8

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒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。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时可能造成假阴性结果。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。
2. 本试剂盒检测结果依赖于对熔解峰的判读，当样本中靶基因浓度过低时熔解峰较低，可能造成假阴性结果。
3. 本试剂盒检测范围内的 HPV68 为 HPV68b 亚型，而 HPV68a 亚型无法用本试剂盒检测。

【产品性能指标】

1. 国家参考品检测情况

使用人乳头瘤病毒 L1 基因分型参考品和人乳头瘤病毒全基因组分型参考品中 N1-N5 阴性参考品及 HPV67、HPV69、HPV71、HPV82 型参考品，对产品的外观、阳性符合率、阴性符合率、重复性、检测限的检测结果均符合规定。

2. 阳性符合率 检测经标化的企业阳性参考品（浓度 10^5 copies/反应），结果为相应型别阳性。

3. 阴性符合率

3.1 检测企业阴性参考品，检测结果应均为阴性；

3.2 检测试剂盒检测范围外人乳头瘤病毒型的国家参考品，交叉反应率应不大于 15.0%；

4. 重复性

检测重复性参考品（HPV16 和 HPV73 参考品，浓度为 5×10^3 copies/反应）10 次，反应结果应一致且均为阳性；

5. 检测限

本试剂盒检测范围内 23 型的 HPV6、HPV11、HPV16、HPV58、HPV52、HPV33、HPV68、HPV18、HPV35、HPV56、HPV81、HPV73、HPV70 的最低检测限为 100 copies/反应；HPV31、HPV66、HPV83、HPV53 的最低检测限为 10^2 copies/反应；HPV59、HPV42、HPV82、HPV51、HPV39 的最低检测限为 10^4 copies/反应；HPV45 的最低检测限为 50 copies/反应。

6. 分析特异性

下列物质经验证对检测没有干扰。

表 7 分析特异性结果汇总表

交叉反应（最高测试浓度）	干扰物质（最高测试浓度）
HPV26、40、43、44、55、61（显著阳性）	白细胞（ 10^6 细胞/mL）
单纯疱疹病毒 II 型（ 1.22×10^7 copies/mL）	全血（5%）
解脲支原体（ 6.77×10^7 copies/mL）	阴道润滑剂（10%）
人型支原体（显著阳性）	洁尔阴草本抑菌洗液（5%）
淋球菌（ 2.09×10^7 copies/mL）	外用避孕药壬苯醇醚栓（浓度为 0.25g/mL）
沙眼衣原体（ 8.83×10^7 copies/mL）	
阴道毛滴虫（显著阳性）	
梅毒螺旋体（显著阳性）	
巨细胞病毒（ 2.45×10^7 copies/mL）	
白色念珠菌（ 10^7 CFU/mL）	

阴道抗真菌药克霉唑阴道片（浓度为 0.3g/mL）对检测结果有影响。

7. 临床试验

临床试验中，对比试剂为人乳头瘤病毒核酸分型检测试剂盒（流式荧光杂交法）及 Sanger 测序法，与对比试剂比较，检测阳性的一致率为 99.20%，阴性一致率为 95.97%，总一致率为 98.57%，Kappa 值为 0.954。

【注意事项】

1. 本品仅限于体外诊断试剂使用。
2. 实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格。
3. 在运输过程中会有试剂附着在管壁/盖上，因此请在使用前先离心，以保证 PCR 反应体系的体积及防止潜在的污染；
4. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行；所有废弃物必须按照当地法规进行处置。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州迪安生物技术有限公司

住所：浙江省杭州市余杭区仓前街道永乐村后木桥 118 号 1 幢 2 层 201 室，3 层 303 室，5 层 503 室

联系方式：0571-56092700；传真：0571-56092701

售后服务单位名称：杭州迪安生物技术有限公司

联系方式：0571-56092700；传真：0571-56092701

生产地址：浙江省杭州市余杭区仓前街道永乐村后木桥 118 号 1 幢 2 层 201 室，3 层 303 室，5 层 503 室

生产许可证编号：浙食药监械生产许 20140144 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20183400427

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019 年 09 月 09 日

修改日期：2022 年 03 月 07 日