

甲型、乙型流感病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称: 甲型、乙型流感病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

50 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人口咽拭子样本中甲型流感病毒（IFA）或乙型流感病毒（IFB）核酸 RNA。
本试剂盒仅用于甲型流感病毒或乙型流感病毒感染的辅助诊断。

流行性感冒，简称流感，是一种由流感病毒（influenza virus）感染引起的急性呼吸道传染病，具有高度的传染性，它的流行特点是在短期内突然发生，迅速蔓延，造成不同程度的流行，发病率高并伴有一定的死亡率。甲型流感病毒和乙型流感病毒所引起的症状基本一致，最明显的特征是急性高烧及咳嗽，其他症状还有畏寒、头疼、肌肉酸痛、疲劳、鼻塞流涕等。甲型流感病毒抗原变异性最强，常引起世界性大流行。乙型流感病毒变异性较弱，一般引起轻微的疾病，主要侵袭儿童，可引起局部爆发。丙型流感病毒抗原性比较稳定，仅引起婴幼儿感染和成人散发病例。根据流感病毒包膜上血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）两种糖蛋白抗原性的差异，将甲型流感病毒分成不同的亚型。到目前为止，甲型流感病毒 HA 有 17 个亚型，NA 有 10 个亚型。乙型流感病毒和丙型流感病毒的抗原很稳定，很少发生变异。乙型流感病毒分 Yamagata 及 Victoria 两个型别。目前临床使用的检测方法主要有：病毒分离鉴定、免疫学检测和核酸检测等。

检验人员应具备 PCR 检测操作资质。由于流感病毒的危害程度属于第三类，因此在保证安全的前提下，对临床和现场的未知样本检测操作在生物安全 II 级或以上防护级别的实验室进行。

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。

【检验原理】

本试剂盒是采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 荧光探针技术对人口咽拭子等样本中甲型流感病毒（IFA）或乙型流感病毒（IFB）的鉴别检测。基于流感病毒中 M1 基质蛋白及 NS1 蛋白具有高度的保守性，但二者在甲型流感病毒和乙型流感病毒中存在差异，因而，针对 M1 基质基因设计引物探针，采用 FAM 荧光标记，用于检测甲型流感病毒；针对 NS1 基因设计引物探针，采用 HEX 荧光标记，用于检测乙型流感病毒。同时，为避免假阴性结果的产生，本试剂盒在抽提样本时添加外源内标（CY5 荧光标记），实现样本抽提及核酸扩增的全程监测。

【主要组成成分】

序号	标签	成分	数量（50 测试/盒）
1	检测缓冲液（IFAB）	含 Tris 缓冲体系的溶液	1 管（700μL/管）
2	引物探针（IFAB）	含特异性引物和探针的溶液	1 管（350μL/管）
3	混合酶液（IFAB）	含 DNA 聚合酶和逆转录酶的溶液	1 管（55μL/管）
4	强阳性质控品（IFAB）	含流感病毒基因片段的假病毒颗粒	1 管（500μL/管）
5	弱阳性质控品（IFAB）	含流感病毒基因片段的假病毒颗粒	1 管（500μL/管）
6	内标（IFAB）	含特异基因片段的假病毒颗粒	1 管（300μL/管）

其他相关试剂: 江苏默乐生物科技股份有限公司的核酸提取纯化试剂(备案号: 苏泰械备 20140015 号)。

注：不同批号试剂盒中各组分不能互换。

【储存条件及有效期】

包装后的试剂盒贮存在-（20±5）℃冰箱内，保存期限是 12 个月；试剂盒采用泡沫盒加冰袋和/或干冰密封进行运输，温度范围-74.79℃～14.27℃，10 天内稳定性良好；试剂盒在（2~8）℃条件下存放 6 天稳定性良好，超过 6 天效果未验证；在 37℃条件下存放 5 天稳定性良好，超过 5 天效果未验证；反复冻融 6 次稳定性良好，超过 6 次效果未验证；将检测缓冲液、引物探针和混合酶液按照比例混合配制成 PCR 反应液

后在（2~8）℃条件下存放不宜超过 3 天。

生产日期和失效日期见试剂盒外标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI 7500、Bio-Rad CFX96 和上海宏石 SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

样本采集的对象是流行性感冒、发热等患者或疑似患者。样本采集过程中注意无菌操作。采集的样本为人口咽拭子。在病人发病 3 日内采集，咽拭子采集时用专用拭子适度拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，采集后迅速将拭子放于盛有 3mL 生理盐水或友康恒业生物科技（北京）有限公司生产的《病毒采样试剂盒》（京械注准 20182400236）中，盖紧管盖密封。

样本采集后应及时检测，在（2~8）℃条件下存放不宜超过 6 天；在-（20±5）℃条件下保存 5 个月稳定性良好，超过 5 个月效果未验证；-70℃可以长期保存。冻融 6 次稳定性良好，超过 6 次效果未验证。冷藏或冷冻样本检测前需恢复室温。

样本的运输和保存过程中要附有必要的信息，如标本编号、发病日期和标本采集日期。

【检验方法】

1 扩增试剂准备（PCR 前准备期）

根据用户选用的病毒 RNA 核酸抽提试剂盒说明书提取病毒核酸，推荐使用江苏默乐生物科技股份有限公司的核酸提取纯化试剂（备案号：苏泰械备 20140015 号）。需要加入 5.0μL 内标（IFAB），进行核酸提取的样本种类包括：

- 1.1 临床样本：待检测的临床样本；
- 1.2 阳性质控品：试剂盒中的强阳性质控品（IFAB）、弱阳性质控品（IFAB）；
- 1.3 阴性质控品：与实际检测样本具有相同或相似性状的基质溶液（自备）。

2 PCR 检测

2.1 扩增试剂准备（PCR I 室）

从试剂盒中取出检测缓冲液（IFAB）和引物探针（IFAB），在冰上或（2~8）℃融化后，取出混合酶液（IFAB），将所有组分轻轻摇晃混匀并低速简短离心。每一反应按照以下比例配制反应体系：

试剂	检测缓冲液（IFAB）	引物探针（IFAB）	混合酶液（IFAB）
用量（μL）	12.5	6.5	1.0

计算好各试剂使用量，加入一适当体积离心管中，充分混匀，简短离心。PCR 反应液的总量应满足的测试数包括：临床样本的个数、1 管强阳性质控品、1 管弱阳性质控品、1 管阴性质控品和 1 管 PCR 阴性对照。

PCR 反应液配置完毕，进行 PCR 反应液的分装，在每一个 PCR 反应孔加入 20.0μL PCR 反应液，分装完毕，转移至 PCR II 室。

2.2 加样（PCR II 室）

在装有 PCR 反应液的 PCR 反应孔中加入“扩增试剂准备（PCR 前准备期）”步骤制备的核酸，每一份核酸的添加量是 5.0μL/孔，PCR 阴性对照孔中不添加任何样本或核酸。

2.3 RT-PCR 反应（检测区）

将反应管放入荧光 PCR 检测仪中，循环参数设定如下：

步骤	循环数	温度（℃）	反应时间（min:sec）
1	1	45	15:00
2	1	94	02:00
		94	00:10
3	5	54	00:15
		72	00:20
4	40	94	00:10

荧光信号的收集定为 FAM (IFA)、VIC/ HEX (IFB)、CY5 (内标)，数据的采集定在步骤 4 中的 58℃。采用 ABI7500 仪器时，请将“Quencher”一栏设置为“none”，“passive reference”一栏选为“none”。

【阳性判断值】

将本试剂盒检测结果与临床诊断信息进行比较，利用 ROC 曲线分析本试剂检测结果，结合各切点的灵敏度和特异度，选择 Youden 指数较大的切点为最佳临界点，以此确定本试剂盒 FAM 荧光的阳性判断值是 31.28, VIC/HEX 荧光的阳性判断值是 31.17。通过梯度稀释法确定本试剂盒内标 CY5 的阳性判断值为 35.00。

【检验结果的解释】

反应结束后，仪器自动保存结果，分析图像后调节 Baseline 的 Start 值、End 值和 Threshold 值（可自行调节，Start 值可以在 3-15 之间，End 值位于 5-20 之间）。调整 PCR 阴性对照的扩增曲线，使其平直或低于阈值线。

PCR 阴性对照 Ct 值应为阴性；阴性质控品的 CY5 荧光 Ct 值 $\leq$ 35.00，FAM、VIC/HEX 荧光 Ct 值应为阴性；强阳性质控品的 CY5 荧光 Ct 值 $\leq$ 35.00，FAM、VIC/HEX 荧光 Ct 值均 $\leq$ 25.00；弱阳性质控品的 CY5 荧光 Ct 值 $\leq$ 35.00，FAM、VIC/HEX 荧光 Ct 值均 $\leq$ 31.00。以上条件需要同时满足，否则认为 PCR 反应无效，需要重新进行检测。具体如下：

1 一般情况下，内标的 Ct 值 $\leq$ 35.00；对具有典型 S 扩增曲线但因靶基因浓度过高而导致内标没有扩增的样本，可直接报告为阳性样本，也可将样本进行十倍梯度稀释重新测定。

2 具体结果判定如下表：

荧光	FAM		VIC/HEX	
Ct 值	$\leq$ 31.28	$>$ 31.28 或 no Ct	$\leq$ 31.17	$>$ 31.17 或 no Ct
结果	甲型流感病毒阳性	甲型流感病毒阴性	乙型流感病毒阳性	乙型流感病毒阴性

3 试剂盒检测扩增图及分析示例。

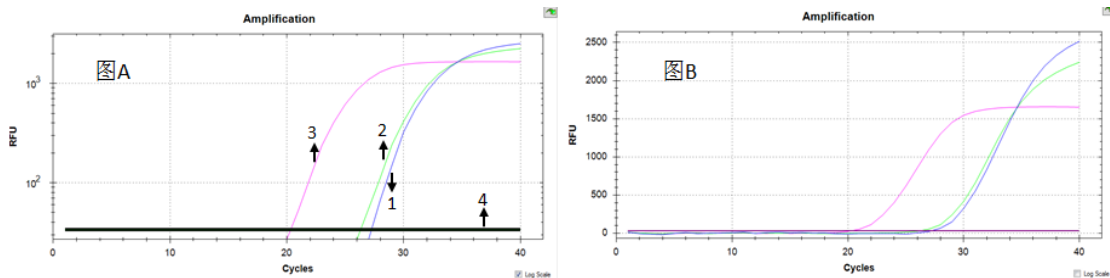


图 A 为指数扩增图，其中“1”和“2”分别为甲流病毒样本和乙流病毒样本的扩增曲线；“3”为内标扩增曲线；“4”为阈值线；图 B 为线性扩增图。

【检验方法的局限性】

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、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。阴性检测结果仅仅表明样本中病毒滴度低于本试剂盒的最低检出限，不能排除甲型、乙型流感病毒感染的可能性。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。流感病毒待靶序列的变异或其它原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。对于突发的新型甲型流感病毒，其最适样本类型及感染后的最佳采样时间未经验证，因此，对同一患者分次、多部位采集样本进行检测有利于降低假阴性结果的发生概率。

【产品性能指标】

1 用本试剂盒测定甲/乙型流感病毒核酸检测试剂国家参考品或经标化的企业参考品，检测结果均符合相关要求。

2 最低检出限：将已知滴度和型别的甲型、乙型流感病毒培养液分别进行 10 倍梯度稀释，选择其中 3 个梯度作为待测样本，每个浓度的样本分别用 3 批试剂重复检测至少 20 次，将阳性检出率 $\geq$ 90%的病毒浓度水平作为最低检测限，其中乙型 Yamagata 流感病毒的最低检测限是 2.0×10^3 TCID₅₀/L；乙型 Victoria 流

感病毒的最低检测限是 $2.1 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}/\text{L}$ ；季节性 H1N1 流感病毒的最低检测限是 $2.5 \times 10^1 \text{ TCID}_{50}/\text{L}$ ；季节性 H3N2 流感病毒的最低检测限是 $1.0 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}/\text{L}$ ；甲型 H1N1(2009) 流感病毒浓度为 $1.8 \times 10^3 \text{ copies/mL}$ ；甲型 H5N1 流感病毒浓度为 $1.99 \times 10^3 \text{ copies/mL}$ ；甲型 H7N9 流感病毒浓度为 $6.28 \times 10^3 \text{ copies/mL}$ 。

3 企业阳性参考品 IFAB WR2 PC1~PC7 为甲型、乙型流感病毒各亚型灭活临床样本或病毒培养物，其中 IFAB WR2 PC1~PC2 检测结果应为乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性，IFAB WR2 PC3~PC7 检测结果应为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性；企业阴性参考品 IFAB WR2 NC1~NC28 为呼吸道常见的 28 种非流感类的灭活病原体，其检测结果应均为阴性。

4 精密度：精密性参考品 IFAB WR2 CV1~CV5 各重复测定 10 次，要求：CV1 为阴性；CV2 和 CV3 均为乙型流感阳性、甲型流感阴性；CV4 和 CV5 均为甲型流感阳性、乙型流感阴性，且其 Ct 值的 CV 均不大于 5.0%。3 批试剂检测阴性样本、临界阳性样本、中等浓度阳性样本、部分企业参考品，由 2 人在 20 天内，不同仪器间（地点）合计进行 40 次测试，检测所用仪器为 ABI7500、Bio-Rad CFX96 和上海宏石 SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪，结果表明阴性样品的检测结果都为阴性，弱阳和中阳浓度水平的样品的批内 CV（%）均小于 5%。不同仪器间（地点）、不同操作者间、批间、日内 CV（%）均小于 5%，三批日间 CV（%）均不大于 7%。

5 分析特异性

5.1 交叉反应：本试剂盒与感染部位相似或者感染症状相似的其他病毒和细菌，如人腺病毒、呼吸道合胞病毒、人副流感病毒 1/2/3 型、柯萨奇病毒 6 型、鼻病毒、人巨细胞病毒、人偏肺病毒、人冠状病毒 OC43、EB 病毒、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、结核杆菌、肺炎支原体、脑膜炎奈瑟菌、百日咳杆菌、麻疹病毒、腺病毒 3 型（ADV-3）、腺病毒 7 型（ADV-7）、流行性腮腺炎病毒（MV）、肺炎衣原体（CP）、化脓链球菌（SP）、唾液链球菌（SS）等其它相关病原体均无交叉反应，且甲型和乙型流感之间也没有交叉反应（以上病毒浓度 $\geq 10^5 \text{ PFU/mL}$ ，细菌浓度 $\geq 10^6 \text{ CFU/mL}$ ）。

5.2 干扰物质：临床样本中添加 10% 的血液或 1mg/mL 的黏蛋白时，不会影响样本检测结果的判定；但考虑到在上述干扰物质中存在 RNA 酶，可能会对靶标产生影响，因此，在采样过程中，仍然应尽量避免上述物质。

5.3 药物影响：检验样本中添加以下浓度的药物，不会影响样本检测结果的判定：2mg/L 利巴韦林、40mg/L 头孢丙烯、0.5mg/mL 羟甲唑啉、0.15mg/L 地塞米松、480mg/L 西瓜霜润喉片、10μg/mL 妥布霉素、38nmol/L 盐酸组胺、25% 医用鼻舒冷敷凝露。

6 临床试验：共检测 615 例咽拭子样本，以国家有证试剂（上海之江生物科技股份有限公司的甲、乙型流感病毒核酸联合测定试剂盒（荧光 PCR 法））作为对照试剂，甲型流感病毒的阳性符合率为 97.93%（95%CI: 95.26~99.11%），阴性符合率为 98.66%（95%CI: 96.90~99.43%），总体一致率为 98.37%（95%CI: 97.03~99.11%），Kappa 值为 0.97；乙型流感病毒阳性符合率为 98.60%（95%CI: 95.04~99.62%），阴性符合率为 99.79%（95%CI: 98.81~99.96%），总体一致率为 99.51%（95%CI: 98.58~99.83%），Kappa 值为 0.99。

【注意事项】

1 整个检测过程应分三区进行，一区进行试剂准备；二区进行标本处理、反应体系的配制；三区进行扩增、荧光检测和结果分析。各区的仪器、设备和工作服独立使用，以防污染。

2 在操作中，应时刻注意避免 RNase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 200μL PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接触摸反应管。

3 处理标本时应使用生物安全柜，以保证操作人员安全和防止对环境的污染。实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中妥善处理。操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 1.0% 次氯酸钠及/或 75% 乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。

4 离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。配制反应体系时

应注意：所有液体的混匀尽量要在漩涡混合器上进行，不用移液器吹打，免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。

【参考文献】

[1] 《流行性感冒病毒核酸检测试剂注册申报资料指导原则》，（食药监办械函[2011]540 号），2011 年 12 月 23 日。

[2] WHO, Influenza(seasonal), Fact sheet N°211,March,2014.

[3] Suxiang Tong, Yan Li, Pierre Rivailier *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci USA. 2012, 109(11):4269-4274.

[4] E.J.A.Schrauwen,M.de Graaf, S.Herfst, *et al.* Determinants of virulence of influenza A virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014, 33(4): 479-490.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

住 所：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F-7F 东

联系方式：0523-86080606 邮编：225300

售后服务单位名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

联系方式：0523-86080606 邮编：225300

生产地址：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F、7F 东

生产许可证编号：苏药监械生产许 20080073 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20223400274

【说明书核准及修改日期】 2022.06.09