

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】

甲型/乙型流感病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于咽拭子样本中，甲型/乙型流感病毒核酸的定性检测。

流感是由流感病毒引起急性呼吸道传染病，主要传播方式是空气飞沫传播。流感病毒分为甲型、乙型和丙型。甲型流感病毒根据表面血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）的不同分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型，甲型流感病毒最容易发生变异，容易引起爆发流行；乙型流感病毒变异较少，丙型流感病毒较稳定，多引起散发病例。流感是一种季节性疾病，在温带地区，流感会在整个冬季流行，在热带地区，流感病毒一年四季均存在，雨季流行多见。一般来说，仅约 50% 左右的感染病人会发展成典型流感临床症状。流感典型症状以突然发热、头晕头痛、肌痛为特点，同时可伴有喉咙痛和咳嗽、鼻塞、流涕、胸痛、眼痛、畏光等症状。发热体温可达 39~40℃，一般持续 2~3 天后渐退。甲型和乙型流感的临床症状相似，乙型流感通常有肌炎及胃肠道症状。实验室诊断方法目前主要有病毒分离、核酸检测等。

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，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以甲型流感 M 蛋白基因和乙型流感 N 蛋白基因编码区的保守区为靶区域，设计引物和探针。通过分别以 FAM、VIC 标记的流感病毒甲型、乙型探针，在同一反应体系中实现同时检测甲型和乙型流感病毒。探针为包括 5' 端报告基团和 3' 端淬灭基团的寡核苷酸，在 PCR 扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被 Taq 酶（5'→3' 外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对病毒在核酸水平上的定性检测。

本试剂盒设置有内标，内标为人核糖核酸酶 P（RNase P）采用 ROX 荧光素标记，通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程中进行监控，避免检测结果的假阴性。

【主要组成成分】

组份名称	规格及数量	主要成分
核酸扩增反应液	625μL×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液
酶混合液	50μL×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚合酶
甲型/乙型流感病毒反应液	200μL×1 管	含甲型流感病毒、乙型流感病毒及 RNase P 的引物、探针
甲型/乙型阳性对照	500μL×1 管	灭活的甲型 H ₃ N ₂ 和乙型流感病毒培养液及 RNase P 基因片段的病毒样颗粒
甲型/乙型弱阳性对照	500μL×1 管	灭活的甲型 H ₃ N ₂ 和乙型流感病毒培养液及 RNase P 基因片段的病毒样颗粒
去 RNA 酶水（空白对照）	500μL×1 管	经焦碳酸二乙酯处理的水

备注：不同批号间的试剂不能互换。

需要但未提供：Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit（货号：52904）或者 Roche 公司的高 Pure Viral Nucleic Acid Kit 提取试剂盒（货号：11858874001）提取试剂盒。

【储存条件及有效期】

避光-20℃贮存，有效期 6 个月。冰袋低温运输不能超过 4 天；开封后避光-20℃贮存，对有效期没有影响；反复冻融次数不能超过 5 次。生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

【样本要求】

适用样本类型为咽拭子样本。

咽拭子样本采集按照《临床护理实践指南》（2011 版）中关于咽拭子采集法进行采集。采集病人发病 3 日内的咽拭子样本，用专用采样棉签，棉签材质为脱脂棉和木棒。用压舌板轻压舌部，迅速用棉签擦拭患者口腔两侧腭弓及咽、扁桃体的分泌物，避免咽拭子触及其他部位；迅速将棉签放入装有 3~5mL 生理盐水的采集管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖密封，以防干燥。

样本采集后应及时检测，2℃-8℃保存 3 天内完成检测，-20℃保存期 4 个月，-70℃可以保存 12 个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过 5 次，采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

34 试剂准备（试剂准备区）

取 N 个（N=待测样本+阳性对照+弱阳性对照+空白对照）PCR 反应管，每管按照反应液配制表加量要求依次加入核酸扩增反应液、酶混合液、甲型/乙型流感病毒反应液、去 RNA 酶水：

反应液组份	加量 (μL)/每人份
核酸扩增反应液	12.5
酶混合液	1
甲型/乙型流感病毒反应液	4
去 RNA 酶水（空白对照）	2.5
总体积	20

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 核酸提取

各取 200μL 待测样本、阳性对照、弱阳性对照和空白对照用病毒核酸提取试剂盒提取核酸，按试剂盒说明书操作。本试剂盒的阳性对照、弱阳性对照、空白对照参与提取，用于对环境的监控和试剂的质控。

2.2 加样

在上述准备好的反应液（20μL/管）中分别加入处理好的待测样本、阳性对照、弱阳性对照和空白对照核酸各 5μL，终体积为 25μL/管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 循环参数设定（请参照各类仪器的操作说明进行设置）

步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录反应	50℃	30 min	1 cycle
2	预变性	95℃	5 min	1 cycle
3	变性	95℃	10 s	45 cycles
	退火、延伸及检测荧光	55℃	40 s	
步骤3中55℃时荧光检测，检测通道：FAM，VIC，ROX				

步骤 3 中 55℃ 时荧光检测，检测通道：FAM，VIC，ROX

*注：ABI 7500 荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

3.3 结果分析

反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（可以根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，调整空白对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在 Report 界面察看结果。

【阳性判断值】

根据临床试验结果，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的甲型流感参考值为 CT 值等于 34.7；乙型流感参考值为 CT 值等于 34.8。

【检验结果的解释】

质量控制

通道	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道
对照			
空白对照	UNDET	UNDET	UNDET
阳性对照	CT≤30.0	CT≤30.0	CT≤30.0
弱阳性对照	CT≤33.0	CT≤33.0	CT≤33.0

注：以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

结果判读

在仪器正常，空白对照、阳性对照均正常的情况下进行结果分析：FAM 通道代表甲型，VIC 通道代表乙型，ROX 通道代表内标。

	FAM通道	VIC通道	ROX通道	结果判读
1	CT≤34.7	CT>34.8或 UNDET	CT≤35.0或 CT>35.0	甲型流感病毒阳性
2	CT>34.7或 UNDET	CT≤34.8	CT≤35.0或 CT>35.0	乙型流感病毒阳性
3	CT≤34.7	CT≤34.8	CT≤35.0或 CT>35.0	甲型和乙型流感病毒阳性
4	CT>34.7或 UNDET	CT>34.8或 UNDET	CT≤35.0	甲型和乙型流感病毒阴性

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒用于体外定性检测人咽拭子样本中甲型流感、乙型流感核酸的检测，对于检测出的甲型或者乙型流感结果不能用于区分亚型。对于检测结果为阳性的情况，可提示所检样本中存在病毒；但是，如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。检测结果仅供临床参考，对患者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。

2. 检测结果和样本采样、运输及保存条件有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。对于临床高度怀疑的阴性结果，建议采用多种样本类型或多次采样进行检测，必要时可考虑采用其他试剂进行检测。

3. 有关假阴性结果的可能性分析

3.1 不正确的样本采集、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。

3.2 流感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。

3.3 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 灵敏度：使用 TCID₅₀ 标定法为 2.0 TCID₅₀/mL（甲型流感病毒株为 A/江苏/1/2009、乙型流感病毒株为 B/江苏/10/2003；A/江苏/1/2006(H1N1)、A/重庆/926/2005(H1N1)、A/山东/121/2007(H1N1)、A/江苏/S61/2009(H1N1)、A/青岛/375/2009(H1N1)、A/广东/09/2009(H1N1)、A/南京/1654/2010(H3N2)、A/山东/1194/2008(H3N2)、A/甘肃/316/2007(H3N2)、B/山东/115/2007、B/广东/91/2010、B/上海/N31/2008、B/上海/N32/2008、B/江苏/10/2003、B/上海/N05/2007)

2. 准确性：以国家阳性参考品PC03、PC04、PC05、PC06或经企业标化的阳性参考品P1、P2、P3、P4对试剂检测，甲型检测结果为阳性，乙型检测结果为阴性；以国家阳性参考品PC01、PC02或经企业标化的阳性参考品P5、P6、P7对试剂检测，甲型检测结果为阴性，乙型检测结果为阳性。

3. 特异性：与感染部位相同或感染症状相似的其他病毒（腺病毒3型、腺病毒7型、巨细胞病毒、麻疹病毒、人冠状病毒、人偏肺病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒B型、鼻病毒1A型病毒核酸病原体浓度均为2.0×10⁵ TCID₅₀/mL；肺炎衣原体、肺炎支原体、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、无芽孢杆菌病原浓度均为1.0×10⁶ CFU/mL）无交叉反应；

4. 干扰物质：10%血液、5%鼻分泌物、10%白细胞、5mg/mL润喉片、10mg/mL羟甲唑啉、5mg/mL扎那米韦、100mg/mL地塞米松、10mg/mL妥布霉素对流感甲型病毒（A/江苏/1/2006(H1N1)、A/江苏/2/2006(H1N1)、A/江苏/S61/2009(H1N1)、A/江苏/S62/2009(H1N1)、A/南京/1654/2010(H3N2)、A/南京/1655/2010(H3N2)）和乙型病毒（B/山东/115/2007、B/广东/91/2010、B/上海/N32/2008、B/江苏/10/2003）检测均没有影响；

5. 精密度：同一批次的产品具有良好的批内重复性，变异系数CV均小于5%。

【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应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 酶和 RNA 酶。

3. 实验需严格分区操作；各区物品、工作服、鞋等均应专用，实

验后应立即清洁工作台。

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. 标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. 每次实验应设置空白对照和阳性对照。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，提取过程应严防 RNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 降解。

8. -70℃保存的RNA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10%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10%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. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. J Clin Virol. 2004, 29(3):179-88
2. Muradrasoli S, Mohamed N, Belák S, et al. Broadly targeted triplex real-time PCR detection of influenza A, B and C viruses based on the nucleoprotein gene and a novel "MegaBeacon" probe strategy. J Virol Methods. 2010, 163(2):313-22.
3. Suresh B. Selvaraju and Rangaraj Selvarangan. Evaluation of Three Influenza A and B Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays and a New 2009 H1N1 Assay for Detection of Influenza Viruses. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(11): 3870-3875
4. Valle L, Amicizia D, Bacilieri S, et al. Performance testing of two new one-step real time PCR assays for detection of human influenza and avian influenza viruses isolated in humans and respiratory syncytial virus. J Prev Med Hyg. 2006 Dec;47(4):127-33.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

住所：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14四楼办研区）

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】