

甲、乙型流感病毒核酸联合测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：甲、乙型流感病毒核酸联合测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 25 人份 / 盒、50 人份 / 盒。

【预期用途】 本试剂盒对人口咽拭子的甲、乙型流感病毒（influenza virus A&B）RNA 核酸片段进行荧光 PCR 分型定性检测。

流感病毒是 RNA 病毒，外观形态呈直径约 100nm 的球状、或长达数千 nm 的丝状。病毒颗粒的表面有两种形态不一，长度均为 10~20nm 的糖蛋白突起，即血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA），均具有抗原性。根据病毒核蛋白和膜基质蛋白抗原性不同，将流感病毒分为甲（A）、乙（B）和丙（C）3 个型，按照 HA 和 NA 抗原特性的不同又将同型病毒分为若干亚型。目前甲型流感病毒共有 16 个 H 亚型（H1-H16）和 9 个 N 亚型（N1-N9）。小儿患流感时其临床症状常因年龄不同而各具特点，年长儿症状与成人相似，多表现为普通感冒型，起病急骤，有高热、畏寒、头痛、背痛、四肢酸痛、疲乏等，不久即出现咽痛、干咳、流鼻涕、眼结膜充血、流泪，以及局部淋巴结肿大。婴幼儿则临床表现每与其他呼吸道病毒感染相似，不易区分，炎症涉及上呼吸道、喉部、气管、支气管、毛细支气管及肺部，病情较严重。幼小婴儿可有严重的喉、气管、支气管炎伴粘稠痰液，甚至发生呼吸道梗阻现象。乙型流感临床表现与甲型相似，但较多见鼻、眼部症状体征，以及由急性良性肌炎引起的肌痛，主要见于下肢，尤以小腿腓肠肌疼痛为甚，而全身中毒表现如头昏、疲乏等则较轻。本试剂盒的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。本产品可用于临床对甲型流感和乙型流感的辅助诊断。

【检验原理】 本试剂盒应用一步法 RT-PCR 与 Taqman 技术结合，采用甲、乙型流感病毒特异性引物探针，实现对甲、乙型流感病毒 RNA 核酸片段的荧光 PCR 分型检测。本试剂盒应用一步法 RT-PCR 与 Taqman 技术结合，分别针对甲型和乙型流感病毒设计特异性引物和探针，甲型流感病毒探针标记 FAM 荧光素，乙型流感病毒探针标记 VIC 荧光素，内标探针标记 Cal red610 荧光素，通过 PCR 变性、退火、延伸，将样本中病毒核酸特异性扩增，并通过不同荧光素标记的探针发出的光信号被 PCR 仪采集，在仪器上呈现出扩增曲线，通过对扩增曲线以及 Ct 值的判断，实现试剂盒同时对甲型流感病毒和乙型流感病毒的检测，内标可以监控假阴性。

【主要组成成分】

序号	组分	包装规格		体 积 / 人份	主要成分
		25 人份	50 人份		
1	甲乙型流感病毒核酸荧光 PCR 检测混合液	513μL×1	988μL×1	19μL	2 对引物、3 条探针及 RT-PCR Mix
2	RT-PCR 酶	27μL×1	52μL×1	1μL	逆转录酶、Taq DNA 聚合酶
3	甲乙型流感病毒内标	30μL×1	60μL×1	1μL	含目的基因相似片段的缺陷性病毒
4	甲乙型流感病毒阴性对照品	150μL×1	150μL×1		0.9%氯化钠溶液
5	甲乙型流感病毒阳性对照品	150μL×1	150μL×1		含目的基因片段的缺陷性病毒

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】 本试剂盒应在 -20±5℃ 避光保存，有效期 12 个月。

荧光 PCR 检测混合液反复冻融不宜超过 3 次，开瓶后请于 2 个月内使用。生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】 本试剂盒适用于 ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；上海宏石医疗科技有限公司 Slan 荧光 PCR 检测系统。

【样本要求】 样本应使用头部为合成纤维的拭子（例如，聚酯纤维），用铝或塑料做柄（不推荐棉拭子和木柄）。样本采集管中应含有 3ml 无菌病毒采样液（含蛋白质稳定剂，阻止细菌和真菌生长的抗生素，缓冲液）。

样本采集方法：口咽拭子：用拭子适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将拭子浸入样本采集管中，尾部弃去，旋紧管盖并密封，以防干燥。

样本取样前，将采集管（含拭子）漩涡震荡 1 分钟后，再吸取样本进行后续 RNA 提取。

运输及保存：采集好的样本应立即用冰块或冰排保存或置于 4℃（冰箱），低温密闭送检，若不立即检测则保存在 4℃（不能超过 4 天）或者 -70℃或 -70℃以下，避免反复冻融。

【检验方法】

1. 样本、对照品的 RNA 提取处理

本试剂盒不含提取试剂，可选以下三种经过验证的商业化提取试剂盒进行提取：

A. QIAGEN-- QIAamp Viral RNA Mini Kit（50）--货号 52904，提取按照生产厂商的说明书操作步骤进行 RNA 抽提，需要注意提取时将甲乙型流感病毒内标 1μL 加入到 Buffer AVL 中，后续操作按照说明书。

B. 上海之江—核糖核酸（RNA）抽提试剂盒（磁珠柱提取法）--货号 ME-0010，提取按照生产厂商的说明书操作步骤进行 RNA 抽提，需要注意提取时将甲乙型流感病毒内标 1μL 加入到结合缓冲液中，后续操作按照说明书。

C. 上海之江—核糖核酸（RNA）抽提试剂盒（磁珠法）--货号 ME-0001，提取按照生产厂商的说明书操作步骤进行 RNA

抽提，需要注意提取时将甲乙型流感病毒内标 1μL 加入到结合缓冲液中，后续操作按照说明书。
试剂盒的阴、阳性对照品需要经过提取，提取程序和样本一致。

2. 试剂配制

取 n×19μL 甲、乙型流感病毒核酸荧光 PCR 检测混合液与 n×1μL RT-PCR 酶(n 为反应管数)，振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。

3. 加样 取上述混合液 20μL 置于 PCR 管中，然后将样本、阳性对照品、阴性对照品的核酸提取产物各 5μL 分别加入 PCR 管中，盖好管盖，立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增 反应管置于荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

45°C×10min; 95°C×15min; 再按 95°C×15sec→60°C×60sec，循环 45 次；单点荧光检测在 60°C，反应体系为 25μL。

荧光通道检测选择如下：

机型 \ 通道	1	2	3
ABI7500	FAM	VIC	TEXAS RED
CFX96	FAM	VIC	Cal Red 610
SLAN	通道 1	通道 2	通道 3

备注：如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

5. 基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

6. 质量控制

阴、阳性对照品检测结果应符合下表要求，否则实验视为无效。

	质控品	FAM 通道（甲流）	VIC 通道（乙流）	610 通道（内标）
1	阳性对照品	Ct 值≤35，且具有明显 S 型扩增曲线	Ct 值≤35，且具有明显 S 型扩增曲线	——（见注 1）
2	阴性对照品	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线

注 1：对于 FAM 通道或 VIC 通道具有明显 S 型扩增曲线（Ct≤42）的样本，其 610 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线（Ct≤42），也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或 No Ct。

【阳性判断值】根据临床试验数据绘制 ROC 曲线，确定本试剂盒的阳性判断值为 Ct=42。。

【检验结果的解释】

在质控品正常的情况下，结果判断如下：

	FAM 通道	VIC 通道	610 通道	结果判断
1	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线	甲、乙型流感病毒阴性
2	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	——（见注 1）	甲型流感病毒阳性
3	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线	——（见注 1）	乙型流感病毒阳性
4	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线	Ct 值≤42，且具有明显 S 型扩增曲线	——（见注 1）	甲、乙型流感病毒均阳性
5	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	表明 PCR 反应受到抑制或提取不当，应重新提取样本进行检测。

待检样本无论在 FAM 还是 VIC 通道，Ct 值在 42~45 之间，则需对核酸提取产物进行重复检测，如仍在 42~45 之间，则判为低于检测限，报告为阴性。

【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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会发生假阴性的结果；不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果。实验室环境污染，试剂污染，样本交叉污染会出现假阳性结果。试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性的结果。

【产品性能指标】

- 最低检测限：1×10³copies/mL，0.1TCID₅₀/mL。
- 阳性参考品：企业阳性参考品：用甲型流感病毒阳性参考品 P1~P5 进行检测，检测结果应均为甲型流感病毒阳性且乙型流感病毒阴性（阳性符合率 5/5）；用乙型流感病毒阳性参考品 P1~P5 进行检测，检测结果应均为乙型流感病毒阳性且甲型流感病毒阴性（阳性符合率 5/5）。国家阳性参考品：对 PC01~PC06 进行检测，符合相关要求；
- 阴性参考品：企业阴性参考品：用阴性参考品 N1~N7 进行检测，检测结果应均为甲、乙型流感病毒全为阴性（阴性符合率 7/7）。国家阴性参考品：对 NC01~NC06 进行检测，符合相关要求；
- 最低检出限参考品：企业最低检出限参考品：甲型流感病毒最低检出限参考品 IFVA-1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释，检测结果均应为甲型流感病毒阳性；乙型流感病毒最低检出限参考品 IFVB-1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释，检测结果均应为乙型流感病毒阳性。国家最低检出限参考品：对 S1~S5 进行检测，符合相关要求。
- 精密性：企业参考品精密性：本试剂盒对甲型流感病毒和乙型流感病毒检测的批内不精密性均≤5%。国家参考品精密性：对精密性参考品 CV1 和 CV2 重复测定 10 次，CV1 均为乙型流感阳性、甲型流感阴性，CV2 均为甲型流感阳性、乙型流感阴性，Ct 值的 CV 均不大于 5.0%，符合相关要求；
- 分析特异性：
 - 交叉反应：经验证本试剂盒与肠道病毒 71 型（Ct=23）、腺病毒（2×10⁶PFU/mL）、呼吸道合胞病毒（8×10⁴ PFU/mL）、副流

感病毒 (Ct=27)、流感嗜血杆菌 (3.6×10^6 CFU/mL)、结核分枝杆菌 (Ct=20)、肺炎支原体 (Ct=24)、肺炎衣原体 (Ct=28)、金黄色葡萄球菌 (9.1×10^7 CFU/mL)、肺炎链球菌 (10^6 CFU/mL)、巨细胞病毒 (Ct=25)、人偏肺病毒 (2×10^5 PFU/mL)、流行性腮腺炎病毒 (Ct=27)、人冠状病毒 (Ct=28)、麻疹病毒 (2.4×10^5 PFU/mL)、鼻病毒 (1.1×10^5 PFU/mL)、化脓链球菌 (2×10^6 CFU/mL)、唾液链球菌 (3.1×10^7 CFU/mL)、脑膜炎奈瑟菌 (1.6×10^7 CFU/mL)、百日咳杆菌 (5×10^6 CFU/mL) 均不会发生交叉。且甲型流感病毒和乙型流感病毒之间不会发生交叉。

- B. 干扰物质研究：常用药物，如达菲 (≤ 0.019 mg/mL)、氢化可的松 (≤ 0.025 mg/mL)、头孢拉定 (≤ 1 mg/mL)、依替米星 (≤ 0.02 mg/mL)、莫匹罗星 ($\leq 0.2\%$)、盐酸肾上腺素 (≤ 1 mg/mL)、地塞米松 (≤ 0.3 mg/mL)、妥布霉素 (≤ 0.014 mg/mL) 均不会干扰本试剂盒检测；含粘蛋白 (≤ 0.9 mg/mL) 标本或含 5% 血液标本不会干扰本试剂盒检测。
7. 临床试验：共检测 536 例咽拭子样本，以国家有证试剂（广州华银公司的甲型流感病毒核酸诊断试剂盒和乙型流感病毒核酸诊断试剂盒）作为参比方法，本试剂盒对甲型流感的阳性符合率为 92.63% (226/244)，阴性符合率为 98.63% (288/292)，总符合率为 95.90% (514/536)；对乙型流感的阳性符合率为 92.25% (119/129)，阴性符合率为 98.53% (401/407)，总符合率为 97.04% (520/536)。

【注意事项】 开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

1. 整个检测过程应严格分在三区进行：PCR 反应体系的配制区；样本处理、加样区；PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台，并进行消毒。
2. 使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
3. 试剂准备和样本处理应使用超净工作台(负压式)或防污染罩，以防止对环境污染。
4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。
5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。
6. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
7. 实验中接触过标准品和对照品的废弃物品（如吸头）、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。
8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
9. PCR 反应混合液应避光保存。
10. 反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧，反应结束后严禁打开 PCR 反应管。
11. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

- [1] Musa Hindiyeh, Virginia Levy, Roberto Azar, Noemi Varsano Evaluation of a Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection and Differentiation of Influenza Viruses A and B during the 2001-2002 Influenza Season in Israel J. Clin. Microbiol., Feb 2005; 43: 589 - 595.
- [2] B. Schweiger, I. Zadaw, R. Heckler, H. Timm, and G. Pauli Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples J. Clin. Microbiol., Apr 2000; 38: 1552 - 1558.
- [3] Guy Boivin, Stéphanie Côté, Pierre Déry, Gaston De Serres Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Influenza and Human Respiratory Syncytial Viruses J. Clin. Microbiol., Jan 2004; 42: 45 - 51.
- [4] Annie Ruest, Sophie Michaud, Sylvie Deslandes, and Eric H. Frost Comparison of the Directigen Flu A+B Test, the QuickVue Influenza Test, and Clinical Case Definition to Viral Culture and Reverse Transcription-PCR for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Infection J. Clin. Microbiol., Aug 2003; 41: 3487 - 3493.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海之江生物科技股份有限公司

住所：上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号20幢乙号1层、21幢甲号1层

联系方式：021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn

售后服务单位名称：上海之江生物科技股份有限公司

联系方式：021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn

生产地址：上海市闵行区新骏环路588号26幢、上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号21幢甲号1层

医疗器械生产企业许可证编号：沪食药监械生产许20081591号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准 20173404656

【说明书批准及修改日期】 2017-12-15