

## 甲型流感病毒/乙型流感病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】甲型流感病毒/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

【货号】ZC-LG-201-2

【预期用途】

本品用于体外定性检测临床人口咽拭子样本中的甲型流感病毒（FLuA）和乙型流感病毒（FLuB）的核酸 RNA。

流行性感冒是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病，春冬季节高发，传播迅速，发病率高，流行期短，易引起暴发流行或大流行，控制难度较大。流感病毒包括甲、乙、丙三型，甲型最容易引起流行，乙型次之，丙型极少引起流行。流感病毒主要经空气飞沫传播，常引起发热、乏力、肌肉酸痛以及轻到中度的呼吸道症状，重者致肺炎、心肌炎和心衰。由于这些病毒引起的感染症状和流行特点相似，仅靠临床症状对病原进行区分非常不可靠，实验室诊断方法有病毒分离、抗原检测与核酸检测等。检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以甲型流感病毒 M 蛋白和乙型流感病毒 N 蛋白基因编码区的一段保守区作为靶区域，分别设计甲型流感病毒和乙型流感病毒的特异性引物和特异性 Taqman 荧光探针。通过 1 管检测，同时实现对 2 种病原体的快速检测。经过核酸提取后的临床样本，加入到试剂盒中提供的检测试剂配制成 PCR 反应管中，使用荧光定量 PCR 仪进行一步法 RT-PCR 扩增，并检测荧光信号，仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线。本试剂盒设置了内参对照，用于对样本采集、保存和运输以及核酸提取过程进行监控，避免假阴性结果的误判。

【主要组成成分】

| 组分名称             | 规格及数量     | 主要成分                                                                        |
|------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 核酸扩增反应液          | 600μL×1 管 | 镁离子、核苷酸混合液等                                                                 |
| 酶混合液             | 200μL×1 管 | DNA 聚合酶、逆转录酶、UNG 酶                                                          |
| 甲型流感病毒/乙型流感病毒反应液 | 200μL×1 管 | 甲型流感病毒、乙型流感病毒和内参 RnaseP 的引物、探针                                              |
| 阳性对照             | 500μL×1 管 | 含 $4 \times (10^6 \sim 10^7)$ copies/mL 甲型流感病毒、乙型流感病毒和 RnaseP 基因特异性片段的病毒样颗粒 |
| 弱阳性对照            | 500μL×1 管 | 含 $4 \times (10^3 \sim 10^4)$ copies/mL 甲型流感病毒、乙型流感病毒和 RnaseP 基因特异性片段的病毒样颗粒 |
| 阴性对照             | 500μL×1 管 | 0.9%氯化钠                                                                     |

说明：

① 不同批号的组分不可以互换使用。

② 自备试剂：核酸提取试剂盒，可采用上海伯杰医疗科技股份有限公司生产的核酸提取及纯化试剂（沪奉械备 20180202 号）。

【储存条件及有效期】

1. 避光-20±5℃储存，有效期 12 个月。

2. 开封后避光-20±5℃储存，对有效期没有影响。避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测结果。

3. 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】

1. 适用样本类型为口咽拭子样本。

2. 口咽拭子样本采集按照《临床护理实践指南》（2011 版）中关于口咽拭子标本的采集进行操作。操作步骤：用压舌板轻压舌部，迅速用拭子（推荐塑料柄的棉签拭子、塑料柄的聚酯纤维拭子、塑料柄的尼龙植绒拭子）擦拭患者口腔两侧腭弓及咽、扁桃体的分泌物，避免拭子触及其他部位；将拭子头浸入采样液中（3mL 含有阻止细菌和真菌生长的抗生素缓冲液、3mL Hank's 液、3mL 磷酸盐缓冲液），在采样液中压拭子头部

数次，弃去尾部，旋紧管盖，以防干燥。将采集好的样本注明：编号、样本类型、采集时间。样本提取前，将采集管（外螺旋扣、耐-80℃冻存）旋涡振荡 1 分钟后混合均匀，再进行核酸提取。

3. 样本采集后应及时检测，2℃~8℃保存 3 天内完成检测，超过 3 天应置于-40±5℃或以下保存 12 个月不影响检测结果。避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测结果。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸扩增反应液、酶混合液、甲型流感病毒/乙型流感病毒反应液，室温融化，充分振荡混匀后瞬间离心。

计算试剂使用份数 N（N=样本数+1 管阳性对照+1 管弱阳性对照+1 管阴性对照），根据下表配置反应体系，加入一适当体积离心管中，充分振荡混匀后瞬间离心，按 20μL 分装至 PCR 反应管中，并转移至样本处理区。

| 组分名称             | 加入体积（μL）/人份 |
|------------------|-------------|
| 核酸扩增反应液          | 12          |
| 酶混合液             | 4           |
| 甲型流感病毒/乙型流感病毒反应液 | 4           |
| 总体积              | 20          |

2. 样本处理（样本处理区）

① 核酸提取：待测样本、阳性对照、弱阳性对照及阴性对照按照核酸提取试剂盒说明书进行操作。

② 加样：在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入待测样本、阳性对照、弱阳性对照和阴性对照核酸各 5μL，终体积为 25μL/管，盖紧管盖，瞬时离心。

3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

① 将 PCR 反应管置荧光定量 PCR 仪扩增检测。

② 循环参数设定

| 步骤                 | 温度         | 时间         | 循环数      |
|--------------------|------------|------------|----------|
| 1 逆转录              | 50℃        | 15min      | 1cycle   |
| 2 预变性              | 95℃        | 5min       | 1cycle   |
| 3 变性<br>退火/延伸/检测荧光 | 95℃<br>55℃ | 15s<br>40s | 45cycles |

说明：

① 步骤 3 中 55℃时设置荧光检测。

② ABI7500 荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

4. 结果分析参数设定

阈值设定：根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 的 Value 值（Start 值建议设在 3~15、End 值建议设在 5~20，同时调整阴性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】

对 356 例已知样本进行检测，采用受试者工作特征（ROC）曲线确定甲型流感病毒阳性判断值为 CT 值等于 40，此时灵敏度为 100%，特异性为 99.0%；乙型流感病毒阳性判断值为 CT 值等于 39，此时灵敏度为 100%，特异性为 98.4%。

【检验结果的解释】

1. 质控标准

以下要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

| 荧光通道<br>对照名称 | FAM 通道<br>(FLuA) | VIC 通道<br>(FLuB) | ROX 通道<br>(内参) |
|--------------|------------------|------------------|----------------|
| 阴性对照         | UNDET            | UNDET            | UNDET          |
| 阳性对照         | CT≤30            | CT≤30            | CT≤30          |
| 弱阳性对照        | CT≤36            | CT≤36            | CT≤36          |

2. 结果判读

① 在仪器正常，阳性对照、弱阳性对照和阴性对照检测结果符合质控标准的情况下，进行待测样本检测结果的分析与判读。

② 阳性判读：以下结果判读成立的条件 ROX 通道 CT≤40。

- a: FAM 通道  $CT \leq 40$ , 甲型流感病毒阳性;  
b: VIC 通道  $CT \leq 39$ , 乙型流感病毒阳性;  
③ FAM 通道或 VIC 通道  $CT$  无数值, 内标  $C_t \leq 40$ , 样本低于检测限, 判为阴性。  
④ 复测: 如果 FAM 通道  $CT > 40$ , 内标  $C_t \leq 40$ , 则判定结果位于实验灰区, 应对样本进行复检。复检结果若一致, 结果为甲型流感病毒阳性; 若无数值, 内标  $C_t \leq 40$ , 则判定结果为甲型流感病毒阴性; 如果 VIC 通道  $CT > 39$ , 内标  $C_t \leq 40$ , 则判定结果位于实验灰区, 应对样本进行复检。复检结果若一致, 结果为乙型流感病毒阳性; 若无  $CT$  值, 内标  $C_t \leq 40$ , 则判定结果为乙型流感病毒阴性。

#### 【检验方法的局限性】

1. 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、其他实验室检测及治疗反应等情况综合考虑。
2. 有关假阴性结果的分析:
  - ① 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。
  - 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 对于突发的新型甲型流感病毒, 其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间可能尚未确认, 因此, 在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。
3. 待测核酸序列可能长时间出现在体内, 而与病毒活性无关。核酸检测阳性并不一定意味目前感染了相应病毒或其为临床症状的致病因子。

#### 【产品性能指标】

1. 最低检测限:  $1 \times 10^3$  copies/mL。
2. 甲型/乙型流感病毒国家参考品 (370006) 符合情况如下:
  - ① 6 份阳性参考品符合率为 100%;
  - ② 6 份阴性参考品符合率为 100%;
  - ③ 精密性参考品 CV1 和 CV2 分别重复 10 次, 其 CV 均不大于 5.0%;
  - ④ 最低检出限参考品;

| 编号 | 病毒滴度                                    | 检测结果              |
|----|-----------------------------------------|-------------------|
| S1 | $2.1 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub> /L | 乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性 |
| S2 | $2.0 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub> /L | 乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性 |
| S3 | $2.5$ TCID <sub>50</sub> /L             | 甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性 |
| S4 | $1.0 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub> /L | 甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性 |
| S5 | $9.8$ TCID <sub>50</sub> /L             | 甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性 |

3. 企业内部阳性/阴性参考品符合率: 6 份阳性参考品符合率为 100%; 6 份阴性参考品符合率为 100%。
4. 对同一份精密度参考品进行 20 天、2 人、3 个批号试剂检测, 批内、批间精密度; 日内、日间精密度; 操作者内、间精密度; 实验室内、间精密度的 CV 均不大于 5.0%。
5. 交叉反应: 针对可能与甲型流感病毒/乙型流感病毒的样本产生交叉反应的病毒 (腺病毒 3 型、腺病毒 7 型、人冠状病毒、巨细胞病毒、肠道病毒、人副流感病毒 1/2/3 型、麻疹病毒、人偏肺病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒) 和其他病原体 (百日咳杆菌、流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、嗜水气单胞菌、肺炎链球菌、化脓链球菌、唾液链球菌、肺炎衣原体、肺炎支原体) 均无交叉。
6. 干扰试验: 针对内源性干扰物质血红蛋白 500mg/dL、粘蛋白  $\leq 0.9$ mg/mL、白细胞  $1 \times 10^{10}$ /L、人血液 50% 和外源性干扰物质苯唑卡因 5μg/mL、肾上腺素 0.96mg/L、羟甲唑啉 0.345mg/L、

含防腐剂的氯化钠溶液 0.1mg/mL、倍氯米松 0.65mg/L、地塞米松 0.5mg/L、氟尼缩松 0.43mg/L、布地奈德 0.2mg/L、莫美他松 100μg/L、氟替卡松 200ng/mL、硫磺 0.5g/L、金英 0.2g/L、曲安西龙 45μg/mL、薄荷脑 32μg/L、扎那米韦 142 ng/mL、莫匹罗星 4.49 mg/L、妥布霉素 4μg/mL 进行验证, 对试剂盒的检测均无干扰。

7. 临床性能: 在四家临床机构完成 650 例样本的临床试验, 与已上市同类产品相比: 对甲型流感病毒的阳性符合率为 99.37%, 阴性符合率为 99.80%, 总符合率为 99.69%; 对乙型流感病毒的阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 99.60%, 总符合率为 99.69%。

#### 【注意事项】

1. 检测前必须仔细阅读本说明书, 并严格按照要求进行操作。
2. 本试剂盒为体外诊断试剂, 操作要求一定的专业性, 操作人员应当经过专业培训。
3. 本试剂盒检测的病原体核酸为 RNA, 操作过程中使用的所有耗材应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
4. 实验室操作按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行。实验操作必须严格分区, 各区域使用的仪器、设备、耗材和工作服必须专用, 不得交叉使用, 避免污染。
5. 试剂盒不同批号的组分不可以互换使用, 各组分使用前应室温融化, 充分振荡混匀, 瞬间离心后使用。
6. 反应液分装时应避免产生气泡, 上机前注意检查各反应管是否盖紧。
7. 实验结束后, 应及时清理台面, 并用 10% 次氯酸钠、75% 酒精和紫外灯等措施进行消毒。
8. 试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性, 实验室所有操作应符合《病原微生物实验室生物安全通用准则》; 医疗废弃物处理应按照《医疗废弃物管理条例》进行管理。

#### 【参考文献】

1. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发[2010]194 号)。
2. 《病原微生物实验室生物安全通用准则》(WS233-2017)。
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. K. H. Chan, N. MaLdeis, W. Pope, A. et al. Evaluation of the Directigen FLuA+B Test for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Type A and B Infections, J Clin Microbiol. 2002 May; 40(5): 1675-1680.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称: 上海伯杰医疗科技股份有限公司  
住所: 上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 1302、1303、1304、1305、1306、1307、1309 室  
联系方式: 4008603688 021-61984777  
售后服务单位名称: 上海伯杰医疗科技股份有限公司  
联系方式: 4008603688 021-61984777  
生产地址: 上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 502 室、1003 室、1302 室  
生产许可证编号: 沪药监械生产许 20202563 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20213400828

#### 【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2021 年 10 月 20 日  
修改日期: 2022 年 07 月 11 日