

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】

32 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人咽拭子样本中的甲型和乙型流感病毒核酸（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^[1,2]，在世界范围内引起暴发和流行，主要以人为传染源，可通过飞沫传播，呼吸道分泌物、体液及被污染的物品也可引起传播。根据核蛋白抗原性的不同，流感病毒可分为甲、乙、丙三型，其中甲型和乙型流感病毒会引起大面积或局部的爆发流行^[3]。目前流感的实验室诊断方法有病毒的分离与鉴定、血清学诊断、免疫荧光法、PCR 法等。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒选取甲型和乙型流感病毒基因保守区域，分别设计特异性引物与荧光探针，探针标记不同的荧光基团。探针的 5'端标记报告基团，3'端标记淬灭基团。当探针保持完整序列时，报告基团的荧光会被淬灭基团吸收而不产生荧光，当探针与模板结合时，探针会被 Taq 酶（5'→3'外切酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离后，荧光不能被淬灭基团吸收而产生荧光信号。荧光 PCR 仪根据检测到的荧光信号绘制出荧光曲线。同时引入内参 RNaseP 基因，质控整个提取和检测过程。

【主要组成成分】

货号		BSJ04S1	BSJ04M1	主要组成成分
包装规格		32 人份/盒	48 人份/盒	
扩增试剂	2×RT-PCR 反应液	400μL×1	600μL×1	核苷酸混合液，氯化镁，三羟甲基氨基甲烷
	酶混合液	38.4μL×1	57.6μL×1	逆转录酶，DNA 聚合酶
	甲型/乙型流感引物 探针	201.6μL×1	302.4μL×1	甲型、乙型流感病毒、内参基因的特异性引物及 荧光探针
对照品	阳性对照品	1000μL×1	1000μL×1	含甲型与乙型流感病毒基因的假病毒溶液
	阴性对照品	1000μL×1	1000μL×1	含内参基因质粒的溶液

注：不同批号试剂盒中各组分不可混用。

需配套杭州博日科技股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20200872 号）使用。

【储存条件及有效期】

1. 试剂保存于-25~-15℃避光环境，有效期 12 个月。
2. 试剂开瓶后在 2~8℃冰箱保存不超过 5 天；试剂反复冻融应不超过 5 次。
3. 生产日期、有效期至见包装盒。

【适用机型】

杭州博日科技股份有限公司的实时荧光定量 PCR 分析仪，型号 FQD-96C；荧光定量聚合酶链反应（PCR）检测系统，型号 FQD-96A；全自动核酸提纯及实时荧光 PCR 分析系统，型号 FQD-A1600。

【样本要求】

1. 样本类型：咽拭子样本。
2. 采样拭子：棉拭子、植绒头或海绵头材质的无菌咽拭子。
3. 保存液：生理盐水、PBS 缓冲液、杭州博日科技股份有限公司的样本保存液（浙杭械备 20200052 号、浙杭械备 20200833 号、浙杭械备 20200977 号）、重庆中元汇吉生物技术股份有限公司的一次性采样病毒采样管（渝械备 20200108 号）和杭州创新生物检控技术有限公司的样本稀释液（浙杭械备 20180019 号）。
4. 样本采集：根据《国家流感中心标准操作规程》，推荐采样人员左手用压舌板压住患者的舌头，右手持无菌咽拭

子擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，采样后迅速将拭子浸入到保存液中，用力折断拭子尾部，弃去拭子尾部，旋紧管盖。

5. 样本运输：样本采集后，应按照国家流感中心标准操作规程的要求进行包装及运输。

6. 样本保存：样本采集后及时检测，或在 2~8℃稳定保存 7 天；-25~-15℃稳定保存 6 个月；-70℃及以下可保存 12 个月；样本应尽量避免反复冻融，冻融不超过 5 次；样本提取后的核酸 2~8℃可稳定保存 24 小时。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

将试剂盒中的各组分取出，在室温环境解冻，振荡混匀后离心，按照 N 个检测数配制（N=待测样本数+阴性对照品+阳性对照品+预估损耗人份数）如下表：

反应液组分名称	每检测加样量（μL）	N 检测加样量（μL）
2×RT-PCR 反应液	12.5	12.5×N
酶混合液	1.2	1.2×N
甲型/乙型流感引物探针	6.3	6.3×N

注：由于反应液配制时会有损耗，因此需预估损耗人份数，适当增加反应液的配制量。

试剂配制完成后，混匀并短暂离心，按每检测 20μL 分装至专用的荧光 PCR 检测管中，转移至样本处理区。

2. 样本提取及加样（样本处理区）

取 300μL 的待检样本、阳性对照品、阴性对照品，使用杭州博日科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20200872 号），配合本公司的全自动核酸提取纯化仪进行提取，核酸洗脱体积为 70μL，具体操作步骤见提取试剂盒说明书。

提取结束后，分别取待检样本、阴性对照品、阳性对照品的提取产物各 5μL 加入到配制好的检测试剂中，盖紧管盖，离心去除气泡，转移至扩增分析区。

3. PCR 扩增（扩增分析区）

将加完样的 PCR 检测管放入扩增仪中。检测通道设置：荧光通道选择 FAM（甲型流感病毒）、HEX（乙型流感病毒）和 CY5（内参基因），检测程序如下：

程序	阶段	温度	时间	循环数
1	逆转录	50℃	5 min	1
2	预变性	95℃	1 min	1
3	变性	95℃	5 sec	45
	退火、延伸及荧光检测	60℃	10 sec（采集荧光）	

程序 3 中 60℃荧光检测时，勾选采集荧光；反应体系设为 25μL。

【阳性判断值】

根据 168 例年龄在 4 岁~72 岁之间的临床样本的检测结果，绘制 ROC 受试者工作曲线，确定本试剂盒甲型流感病毒阳性判断值为 41.16；乙型流感病毒阳性判断值为 40.69；内参基因参考值为 40.12。

【质量控制】

	检测样本	FAM（甲型流感病毒）	HEX（乙型流感病毒）	CY5（内参）	检测结果
1	阳性对照品	Ct≤30，扩增曲线 S 型	Ct≤30，扩增曲线 S 型	Ct≤30，扩增曲线 S 型	同次实验，同时满足，否则结果无效
2	阴性对照品	无 Ct 值	无 Ct 值	Ct≤30，扩增曲线 S 型	

【检测结果的解释】

	FAM（甲型流感病毒）	HEX（乙型流感病毒）	CY5（内参）	结果判定
1	Ct 值≤41.16，扩增曲线 S 型	无 Ct 值	有或无 Ct 值	甲型流感病毒核酸阳性
2	无 Ct 值	Ct 值≤40.69，扩增曲线 S 型	有或无 Ct 值	乙型流感病毒核酸阳性
3	Ct 值≤41.16，扩增曲线 S 型	Ct 值≤40.69，扩增曲线 S 型	有或无 Ct 值	甲型、乙型流感病毒核酸均为阳性

4	无 Ct 值	无 Ct 值	Ct 值≤40.12	甲型、乙型流感病毒核酸均为阴性
5	无 Ct 值	无 Ct 值	Ct 值>40.12 或无 Ct	检测异常，建议重新采样、抽提核酸。

若 FAM 和/或 HEX 有 Ct 值，且扩增曲线呈 S 型，但大于对应的阳性判断值，应重新检测，重新检测的结果仍然有 Ct 值，且扩增曲线呈 S 型，则判定为对应的病毒核酸阳性，否则判定为对应的病毒核酸阴性。

【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. 有关假阴性结果的可能性分析

① 不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低。

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。

③ 对于突发的新型流感病毒，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。

④ 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子。

3. 有关假阳性结果的可能性分析

① 如果样本在运输、处理过程中发生交叉污染。

② 实验环境有 PCR 产物等气溶胶污染。

③ 实验过程中使用的耗材、设备等受污染。

④ 取标本期间，患者接种减毒活疫苗。

⑤ 未经验证的其他交叉反应物质。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：200copies/mL。

2. 阴/阳性符合率：检测甲/乙型流感病毒核酸检测试剂盒国家阴性参考品或企业阴性参考品，检测结果均为阴性，检测甲/乙型流感病毒核酸检测试剂盒国家阳性参考品或企业阳性参考品，检测结果均为阳性。

3. 交叉反应：与呼吸道合胞病毒 A 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、呼吸道合胞病毒 B 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、单纯疱疹病毒 1 型（ 1×10^6 copies/mL）、单纯疱疹病毒 2 型（ 1×10^6 copies/mL）、肠道病毒 EV71（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、腺病毒 1 型（ 1.0×10^5 TCID₅₀/mL）、腺病毒 3 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、腺病毒 7 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、SARS 冠状病毒假病毒（ 1×10^6 copies/mL）、肺炎链球菌（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、嗜肺军团菌（ 1×10^6 CFU/mL）、百日咳杆菌（ 1×10^6 CFU/mL）、脑膜炎奈瑟菌（ 1×10^6 CFU/mL）、烟曲霉（ 1×10^6 copies/mL）、卡他莫拉菌（ 1×10^6 CFU/mL）、鼻病毒 A2（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、副流感病毒 1 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、副流感病毒 2 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、副流感病毒 3 型（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、水痘带状疱疹病毒（ 1×10^6 copies/mL）、麻疹病毒（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、人类冠状病毒 OC43（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、人类冠状病毒 NL63（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、人类冠状病毒 229E（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、MERS 冠状病毒假病毒（ 1×10^6 copies/mL）、肺炎衣原体（ 1×10^4 TCID₅₀/mL）、肺炎克雷伯菌（ 1×10^5 CFU/mL）、金黄色葡萄球菌（ 1×10^6 CFU/mL）、白色念珠菌（ 1×10^6 CFU/mL）、新生隐球菌（ 1×10^6 CFU/mL）、嗜酸乳杆菌（ 1×10^6 copies/mL）、巨细胞病毒（ 1×10^6 copies/mL）、腮腺炎病毒（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、人偏肺病毒（ 1×10^5 TCID₅₀/mL）、新型冠状病毒 2019-nCoV（ 1×10^6 copies/mL）、肺炎支原体（ 1×10^6 copies/mL）、化脓性链球菌（ 1×10^6 copies/mL）、流感嗜血杆菌（ 1×10^6 CFU/mL）、光滑念珠菌（ 1×10^6 CFU/mL）、口腔链球菌（ 1×10^6 CFU/mL）、EB 病毒（ 1×10^6 copies/mL）、人基因组 DNA、大肠杆菌（ 1×10^6 copies/mL）、铜绿假单胞菌（ 1×10^6 copies/mL）、博卡病毒（ 1×10^6 copies/mL）均无交叉反应。

4. 干扰物质：血液（10%）、黏蛋白（0.2mg/mL）、苯福林（0.5mg/mL）、羟甲唑啉（0.5mg/L）、氯化钠（0.09%）、倍氯美松（0.2mg/L）、地塞米松（0.1mg/L）、氟尼缩松（1mg/mL）、曲安奈德（105ng/mL）、布地奈德（0.3mg/L）、莫米松（0.15mg/L）、氟替卡松（0.5ng/mL）、苯佐卡因（0.15mg/L）、薄荷脑（0.1mg/L）、盐酸组胺（1mg/mL）、扎那米韦（142ng/mL）、利巴韦林（3680ng/mL）、奥司他韦（1275μg/L）、帕拉米韦（100μg/mL）、莫匹罗星（45μg/mL）、

妥布霉素（3.7μg/mL）、阿比多尔（614.1ng/mL）、头孢曲松（80μg/mL）、洛匹那韦（25μg/mL），对检测结果均无影响。

5. 精密度：检测国家重复性参考品结果均为阳性，且 Ct 值的变异系数（CV，%）均不大于 5.0%；检测企业精密度参考品 CV1~CV4 结果均为阳性，CV5 结果均为阴性，且 CV1~CV4 的 Ct 值的 CV 均不大于 5.0%。批内/批间、日内/日间、室内/室间、不同操作者间、不同地点和不同设备间精密度，Ct 值的 CV 均不大于 5.0%。

6. 临床评价：在 3 家临床检测机构完成 645 例样本的临床试验，与已批准上市的同类试剂相比，甲型流感阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.76%，总符合率为 99.84%；乙型流感阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%。

【注意事项】

1. 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。

2. 试剂保存运输及使用过程中多种因素可能导致性能变化，如保存运输不当、样本采集、样本处理及检测过程操作不规范等，请严格按照说明书操作。因拭子等样本采集过程及病毒感染过程本身的特点，可能存在采集到的样本量不足等原因带来的假阴性结果，应结合临床其他诊疗信息综合判断，必要时复测。

3. 实验过程应分区进行，试剂准备区配制反应液，样本处理区处理样本及加样，扩增分析区进行检测及结果分析。季节性流感病毒应在生物安全二级实验室操作，疑似高致病禽流感病例标本需在 BSL-2 级实验室操作，采取 BSL-3 级防护；核酸提取及加 RNA 模板可在 BSL-2 级实验室生物安全柜内操作，以确保操作员安全并避免环境污染；实验室和工作台需要在每次实验后及定期用 75%乙醇、紫外线处理。使用无荧光物质的一次性手套，一次性专用离心管等。

4. 本产品使用前试剂各组分必须平衡温度至室温，振荡混匀并瞬时低速离心，反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管管盖是否盖紧，以免污染仪器。

5. 扩增完毕立即取出反应管，检测样本及阴阳性对照应视为潜在传染源，操作和处理均需符合《病原微生物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] 陈则, 方芳. A、B、C 三型流感病毒病毒学、流行病学、临床特征和流感疫苗[J]. 生命科学研究, 2000, 4(3): 189-196.

[2] Blair RH, Dawson ED, Taylor AW, et al. Clinical validation of the FluChip-8G Influenza A+B Assay for influenza type and subtype identification[J]. Journal of Clinical Virology, 2019, 118:20-27.

[3] Kakar A, Gogia A, Gangwani A. Risk factors associated with severe outcomes in adult hospitalized patients according to influenza type and subtype[J]. Current Medicine Research and Practice, 2019, 9(4):162-163.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州博日科技股份有限公司

地址：浙江省杭州市高新技术产业开发区滨安路 1192 号

联系方式：0571-87774567

邮编：310053

网址：www.bioer.com.cn

售后服务单位名称：杭州博日科技股份有限公司

联系方式：0571-87774567

生产地址：浙江省杭州市高新技术产业开发区滨安路 1192 号

【生产许可证编号】 浙药监械生产许 20150033 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准 20253400948

【说明书核准及修改日期】 2025 年 05 月 16 日