



甲型流感病毒、乙型流感病毒及腺病毒核酸检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：甲型流感病毒、乙型流感病毒及腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

48 人份/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（IFVA）、乙型流感病毒（IFVB）、腺病毒（ADV）核酸。

甲型流感病毒、乙型流感病毒和腺病毒均可引起呼吸道感染，临床症状相似，主要为发热、咳嗽、鼻塞、咽喉不适、乏力、头痛、肌肉酸痛等症状，部分病人伴有呼吸局促、支气管炎或肺炎发生。通过对有呼吸道感染体征和症状的个体检测和鉴别特异性病毒核酸，联合其他临床和实验室结果以辅助诊断呼吸道感染。

阴性结果不能排除呼吸道病毒感染，不能用作诊断、治疗或其他管理决策的唯一依据。

阳性结果不能排除检测指标外细菌感染或其他病毒混合感染情况。

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】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 检测技术，以甲型流感病毒、乙型流感病毒和腺病毒基因中的高度保守序列为靶区域，设计特异性引物和 Taqman 荧光探针，采用多重荧光 PCR 技术，在一个扩增体系内实现对口咽拭子样本中的甲型流感病毒/乙型流感病毒/腺病毒的快速多重检测，并通过外源性内标和外标质控品（阳性对照和阴性对照），对检测过程进行全程质量控制。

【主要组成成分】

序号	组成	规格/数量	主要成分
1	IFVA/IFVB/ADV/内标扩增反应液	1.0 mL/支×1	引物、探针、脱氧三磷酸核苷、PCR 缓冲液
2	Taq DNA 聚合酶	15 μL/支×1	Taq DNA 聚合酶
3	M-MLV 反转录酶	10 μL/支×1	M-MLV 反转录酶
4	IFVA/IFVB/ADV 阳性对照	200 μL/支×1	灭活的 IFVA、IFVB、ADV 病毒培养物
5	阴性对照（NC）	200 μL/支×1	灭菌生理盐水
6	RNA 内标（EC）	300 μL/支×1	MS2 噬菌体

试剂盒不提供但需准备的仪器和耗材：

- 1) 0.6mL 或 1.5mL 离心管（推荐 AXYGEN）；
- 2) 八排管或 96 孔板（推荐 AXYGEN）；
- 3) 移液器（10μL、100μL、200μL、1000μL）；
- 4) Tip 头（10μL、100μL、200μL、1000μL）；
- 5) 离心机（手掌型离心机：高速离心机，转速≥13000rpm）等；
- 6) 自备试剂：灭菌生理盐水。

备注：

- 1) 不同批次核酸扩增试剂和质控品不得混用；
- 2) 核酸提取试剂需自备，需使用广东和信健康科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20150194 号）。
- 3) 质控品说明：阴性对照为生理盐水；阳性对照为灭活的 IFVA、IFVB、ADV 病毒培养物；内标为 MS2 噬菌体。以上质控品均需核酸提取过程处理。

【储存条件及有效期】

试剂盒未开封情况下于-20±5℃ 避光保存，有效期为 18 个月。

开封后于-20±5℃ 避光保存，有效期为 6 个月。

试剂盒采用泡沫盒加冰袋或干冰封装运输（冰袋的数量以试剂盒上下左右前后完全覆盖试剂盒为标准），运输温度控制在-80℃～30℃。并在该条件下密封暂存不超过 7 天。

尽量避免反复冻融，冻融 5 次及以内对检测结果没有影响（冻融 5 次以上检测效果未验证）。

生产日期及失效日期：见标签。

【适用仪器】

实时荧光定量PCR仪Real-Time PCR Instrument（ABI 7500）；上海宏石医疗科技有限公司全自动医用PCR分析系统（SLAN-96P）；西安天隆科技有限公司的实时荧光定量PCR仪（TL988）

【样本要求】

1. 样本类型：口咽拭子样本。
2. 样本采集对象：流感、上呼吸道感染等患者或疑似患者。样本采集时间不受用药影响。
3. 样本采集器材：

- 1) 拭子：应使用头部为合成纤维（如聚酯纤维）的塑料杆蓬松拭子。不推荐棉拭子和木杆拭子。
- 2) 采集管：推荐使用外螺旋口、耐-70℃ 冻存的塑料管。
- 3) 采样液：推荐使用生理盐水或运输培养基（非灭活型，含有蛋白质稳定剂，阻止细菌和真菌生长的抗生素，缓冲液），如广州阳普医疗科技股份有限公司生产的样本保存液（粤穗械备 20150192 号）。
4. 样本采集部位及步骤：用压舌板辅助，将拭子越过被采样者舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处，反复擦拭 3~5 次，收集粘膜细胞，避免触及舌、口腔粘膜和唾液。将拭子头浸入含 3mL 采样液的螺口塑料管中，弃去尾部，旋紧管盖。
5. 样本的保存和运输：
保存：待测样本在 2~8℃ 保存应不超过 72 小时；-20℃ 保存不超过 3 个月；-70℃ 长期保存。应避免反复冻融，冻融次数应不超过 5 次。核酸样本在 2~8℃ 保存应不超过 6 小时；-20℃ 保存不超过 2 个月；-70℃ 保存不超过 3 个月；应避免反复冻融，冻融次数应不超过 3 次。
运输：建议采用冰壶加冰或泡沫箱加冰袋密封运输。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

取出 IFVA/IFVB/ADV/内标扩增反应液，在室温下融化并振荡混匀，将 IFVA/IFVB/ADV/内标扩增反应液、Taq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶短暂离心数秒。计算需准备反应试剂人份数 N=样本数+2（阳性对照、阴性对照）。每人份反应体系配制如下：

试剂	IFVA/IFVB/ADV/内标扩增反应液	Taq DNA 聚合酶	M-MLV 反转录酶
用量（n 人份）	20μL×n	0.3μL×n	0.2μL×n

计算上述各试剂用量，加入适当体积于 1 支离心管中，充分混匀，短暂离心，按 20μL/管分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

2. 样本处理（样本处理区）

1) 核酸提取

取 50μL 待测样本、阳性对照和阴性对照，分别将 5μL 内标对照加入其中。需使用广东和信健康科技有限公司的核酸提取或纯化试剂进行样本的提取，操作过程需严格按照说明书进行。

2) 加样

在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入处理好的待测样本核酸、阴性对照核酸和阳性对照核酸各 5μL，终体积为 25μL/管，盖紧管盖，短暂离心。

注：加样完成，若不立即上机测试，可在 2~8℃ 保存 6 小时。

3. PCR 检测（核酸扩增区）

- 1) 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。
- 2) 按照仪器操作说明进行操作，按照下表程序进行 PCR 扩增：

步骤	温度（℃）	时间	循环数
1	48	5min	1 cycle
2	94	2min	1 cycle
3	94	10s	40 cycles
	55	35s	
步骤 3 反应结束时（55℃，35s）收集荧光：IFVA（Texas Red），IFVB（FAM），ADV（VIC），内标（CY5）。			

备注：如使用 ABI 7500 Real-Time PCR System，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择 “none”。

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（即，阴性对照）的扩增曲线平直或低于阈值线），记录仪器自动分析计算出的样本 Ct 值。

4. 质量控制

每一个检测批次均需设置阴性对照和阳性对照以进行质量控制。以下要求需在同一实验中同时满足，否则当次实验无效。

1) **阴性对照**：在 FAM、Texas Red、VIC 荧光通道荧光信号均无明显增长，且无明显 S 型扩增曲线；在 CY5 荧光通道荧光信号有明显的增长，呈典型的 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤30.0。

2) **阳性对照**：在 FAM、Texas Red、VIC 荧光通道荧光信号均有明显增长，且均呈典型的 S 型曲线，Ct 值≤30.00；在 CY5 荧光通道荧光信号有明显的增长，呈典型的 S 型曲线，且 Ct 值≤30.00。

【阳性判断值】

采用检测限浓度样本及 ROC 曲线进行研究，本试剂盒甲型流感病毒的阳性判断值为 36.00，Ct 值≤36.00 为甲型流感病毒阳性；乙型流感病毒的阳性判断值为 34.00，Ct 值≤34.00 为乙型流感病毒阳性；腺病毒的阳性判断值为 35.00，Ct 值≤35.00 为腺病毒阳性。

【检验结果的解释】

在阳性对照、阴性对照和内标对照结果均正常的情况下进行结果分析（Texas Red 荧光通道为甲型流感病毒，FAM 荧光通道为乙型流感病毒，VIC 荧光通道为腺病毒，CY5 荧光通道为内标对照）。

1. 按照下表进行待测样本的结果判定：

荧光通道				结果判读
IFVA（Texas Red）	IFVB（FAM）	ADV（VIC）	CY5	
Ct≤36.00	Ct>34.00 或 undet.	Ct>35.00 或 undet.	任何	甲型流感病毒阳性
Ct>36.00 或 undet.	Ct≤34.00	Ct>35.00 或 undet.	任何	乙型流感病毒阳性
Ct>36.00 或 undet.	Ct>34.00 或 undet.	Ct≤35.00	任何	腺病毒阳性
Ct≤36.00	Ct≤34.00	Ct>35.00 或 undet.	任何	甲型流感病毒及乙型流感病毒阳性
Ct≤36.00	Ct>34.00 或 undet.	Ct≤35.00	任何	甲型流感病毒及腺病毒阳性
Ct>36.00 或 undet.	Ct≤34.00	Ct≤35.00	任何	乙型流感病毒及腺病毒阳性
Ct≤36.00	Ct≤34.00	Ct≤35.00	任何	甲型流感病毒及乙型流感病毒及腺病毒阳性
Ct>36.00 或 undet.	Ct>34.00 或 undet.	Ct>35.00 或 undet.	Ct≤35.00	甲型流感病毒及乙型流感病毒及腺病毒阴性
Ct>36.00 或 undet.	Ct>34.00 或 undet.	Ct>35.00 或 undet.	Ct>35.00 或 undet.	试验不成立，需对该样本做重复试验或重新采样

备注：待测样本扩增曲线呈典型 S 型曲线，但浓度过高而导致内标对照无扩增，待测样本可直接判为阳性。也可将待测样本进行 10 倍稀释重新检测。

2. 结果报告建议采用以下形式：

阴性结果：样本中未检测到甲型流感病毒、乙型流感病毒和腺病毒核酸，或样本中被检测物浓度低于试剂盒最低检测限。

阳性结果：样本中检测到甲型流感病毒或（和）乙型流感病毒或（和）腺病毒核酸。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。
2. 检验的病毒核酸出现序列变异时会存在假阴性风险。
3. 不合理的样本采集、转运及处理以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
4. 取标本期间，接种减毒活疫苗的患者可能会导致检测试剂检测结果呈阳性。
5. 待检核酸序列可能长时间出现在体内，而与病毒活性无关。核酸检测阳性不一定意味着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. 阳性符合率
检测国家阳性参考品和企业阳性参考品，检测结果均为阳性。
2. 阴性符合率
检测国家阴性参考品和企业阴性参考品，检测结果均为阴性。
3. 精密度
检测国家精密度参考品和企业精密度参考品各 10 次，各参考品均为相应病原体阳性，且 Ct 值的变异系数（CV，%）均≤5%。进行为期 20 天的连续检测，结果表明，阴性样本的结果均为阴性，阴性检出率为 100%；临界阳性样本阳性检出率为 100%；强阳性样本的阳性检出率为 100%且 CV≤5%。本试剂盒的批内/批间、日间以及不同操作者之间的精密度良好。
4. 最低检出限
采用各病毒的不同亚型进行研究：甲型流感病毒（H1N1、季节性 H1N1、H3N2、H5N1、H7N9）、乙型流感病毒（Yamagata、Victoria）、腺病毒（1、2、3、4、5、7、55），本试剂盒检测甲型流感病毒的最低检测限为 1.5×10³TCID₅₀/L（1.5 TCID₅₀/mL），检测乙型流感病毒的最低检测限为 2.0×10³TCID₅₀/L（2.0 TCID₅₀/mL），检测腺病毒的最低检测限为 1.0×10³TCID₅₀/L（1.0 TCID₅₀/mL）。对甲/乙型流感病毒核酸检测试剂国家参考品中的检测限参考品均能正确检出。
5. 分析特异性

（1）交叉反应：本试剂盒与下列常见病原体、细胞不发生交叉反应：风疹病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、呼吸道合胞病毒 A 型、副流感病毒 1 型、MDCK 细胞、Hep-2 细胞、呼吸道合胞病毒 B 型、巨细胞病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、流感嗜血杆菌、副流感病毒 2 型、副流感病毒 3 型、脑膜炎奈瑟菌、干酪乳杆菌、肺炎链球菌、肠炎沙门氏菌、乙型溶血性链球菌、普通变形杆菌、EB 病毒、嗜肺军团菌、表皮葡萄球菌、淋球菌、博卡病毒、单纯疱疹病毒 1 型、水痘带状疱疹病毒、百日咳杆菌、棒状杆菌属、卡他莫拉菌、结核分枝杆菌减毒株、化脓性链球菌、粘质沙雷菌、白念珠菌、口腔链球菌、肺炎克雷伯菌、冠状病毒（OC43）、冠状病毒（229E）、偏肺病毒，肺孢子菌、唾液链球菌，乳酸杆菌。

（2）内源/外源物质干扰试验：以下物质对本试剂盒的检测结果无干扰：1%粘蛋白、5%人血液、0.4mg/mL 苯福林、0.3mg/mL 羟甲唑啉、36mg/mL 氯化钠（含防腐剂）、0.2mg/mL 倍氯美松、0.2mg/mL 地塞米松、0.1mg/mL 氟尼缩松、0.22mg/mL 曲安奈德、0.128mg/mL 布地奈德、0.2mg/mL 莫米松（莫美他松）、0.2mg/mL 氟替卡松、30mg/mL 硫磺、0.09mg/mL 金英、0.18mg/L 盐酸组胺、0.51mg/mL 苯佐卡因、2mg/mL 薄荷脑、10mg/mL 扎那米韦、6.42mg/L 利巴韦林、2.14mg/L 奥司他韦、4.29mg/L 帕拉米韦、20mg/mL 莫匹罗星、4.38mg/L 妥布霉素、11.4mg/L 穿琥宁、13.14mg/L 阿司匹林、11.4mg/L 布洛芬、55.71mg/L 对乙酰氨基酚、5.7mg/L 尼美舒利。本产品对鼻内活流感病毒疫苗检测呈甲型流感病毒阳性和乙型流感病毒阳性。

（3）竞争性干扰：本试剂盒对甲型流感病毒、乙型流感病毒、腺病毒以外的病原体均不检出，且高浓度的甲型流感病毒、乙型流感病毒、腺病毒、鼻病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、博卡病毒、肠道病毒、肺炎支原体和肺炎衣原体干扰样本对低浓度样本的检测无竞争性干扰。

6. 临床性能：在三家临床单位共进行 734 例的临床样本检测，与同类获证的 PCR-荧光探针法的试剂盒相比，临床试验结果结果总结如下：

符合率 病原体	阳性符合率	阴性符合率	总符合率	Kappa 值
IFVA	96.17% (95%CI: 93.40~98.95%)	99.09% (95%CI: 98.30~99.88%)	98.37% (95%CI: 97.45%~99.28%)	0.9562
IFVB	99.27% (95%CI: 97.84%~100%)	99.50% (95%CI: 98.93%~100%)	99.46% (95%CI: 98.92%~99.99%)	0.9822
ADV	98.91% (95%CI: 97.41%~100%)	99.82% (95%CI: 99.46%~100%)	99.59% (95%CI: 99.13%~100%)	0.9891

注：IFVA 为“甲型流感病毒”、IFVB 为“乙型流感病毒”、ADV 为“腺病毒”。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
2. 操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
3. 本试剂盒组分使用前应在室温充分融化，混匀并短暂离心。
4. 每次实验应设置阴性对照和阳性对照，不同批号的试剂请勿混用，须在有效期内使用试剂盒。
5. 待测样本尽可能保持新鲜，提取过程严防 RNA 酶污染及操作不当而导致 RNA 降解的情况发生。
6. -70℃保存的 RNA 样本，加样前应在室温充分融化、混匀并短暂离心后使用。
7. 加样时应使样本完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
8. 反应液分装过程中应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染仪器。
9. 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》（卫办医政发〔2010〕194 号或现行有效版本）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。
10. 本产品性能仅针对口咽拭子及【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法（包括样本采集液等）进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。

【标识的解释】



避免日晒



避免雨淋



体外诊断试剂



参考使用说明



向上

【参考文献】

1. 彭文伟，《传染病学》，第五版，人民卫生出版社，2001.
2. 李金明，《实时荧光 PCR 技术》，第一版，人民军医出版社，2007.
3. 刘艳芳、张勇建、苏明，临床病毒学检验，军事医学科学出版社，2009.
4. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), MM3-A2, Vol26 No.8, ISBN 1-56238-596-8.
5. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. NCCLS, MM6-A, Vol. 23 No.28. ISBN 1-56238-508-9.
6. Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Influenza Viruses, CDRH, FDA, USA, February 15, 2008.

【基本信息】

注册人/生产企业：广东和信健康科技有限公司

住所：广州市黄埔区瑞发路 1 号 1 栋 401 房（部位：瑞发路 1 号自编（1）栋四层 001-014 房）

邮政编码：510530

电话号码：020-82512529

传真号码：020-82514208-177

公司网址：http://www.hecin-scientific.cn

售后服务单位名称：广东和信健康科技有限公司

服务热线：020-82512529

传真号码：020-82514208-177

生产地址：广州市黄埔区瑞发路 1 号自编（1）栋四层 015 号房；广州市黄埔区瑞发路 1 号自编（2）栋四层

生产企业许可证编号：粤食药监械生产许 20193323 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20223400204

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2022 年 2 月 15 日