

【产品名称】

通用名称：甲型流感病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于定性检测人口咽拭子样本中甲型流感病毒（IVA）核糖核酸。

流行性感冒病毒（influenza virus）是正粘病毒科（Orthomyxoviridae）的代表种，简称流感病毒，流感病毒分为甲（A）、乙（B）、丙（C）三型，是引起流行性感冒（流感）的病原体。流感病毒会造成急性上呼吸道感染，并借由空气迅速的传播，在世界各地常有周期性流行。其中，甲型流感病毒较容易发生变异，流感大流行就是甲型流感病毒出现新亚型或旧亚型重现而引起的。流感的传染源主要是病人，其次是隐性感染者，动物亦可能成为重要贮存宿主或中间宿主。甲流感发病严重程度与个体免疫状况有关，一般说来，仅约 50% 的感染病人会发展成典型流感临床症状。

实验人员应接受过基因扩增及分子生物学检测的专业培训，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。

【检验原理】

本试剂盒利用一步法实时荧光 PCR 技术，以甲型流感病毒基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行一步法 RT-PCR 扩增，用于样本中甲型流感病毒核糖核酸的定性检测。另外，本试剂盒还带有内标物质，用于对核酸提取整个过程进行监控，减少假阴性结果的出现。

使用本试剂盒推荐的核酸提取试剂对临床样本进行处理和核酸提取，以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制 PCR 反应管，将样本核酸加入 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，根据阈循环值（CT 值）实现对未知样本的定性检测。

【主要组成成分】

	组分名称	规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂	IVA PCR 反应液 A	425μL/管	1	特异性引物探针、MgCl ₂ 、Tris 盐酸 Buffer
	IVA PCR 反应液 B	75μL/管	1	热启动 Taq 酶、逆转录酶、RNasin
	IVA 内标溶液	120μL/管	1	含内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
质控品	阴性质控品	200μL/管	1	生理盐水
	IVA 强阳性质控品	200μL/管	1	含甲型流感病毒目的片段的病毒样颗粒
	IVA 临界阳性质控品	200μL/管	1	含甲型流感病毒目的片段的病毒样颗粒

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

PCR 检测试剂、质控品：-20±5℃ 保存，试剂盒有效期 9 个月。

PCR 检测试剂反复冻融次数不应超过 7 次。PCR 检测试剂开瓶后，保存于 4℃，试剂盒各组分开瓶次数不应超过 7 次。试剂盒在 25℃ 时运输不应超过 3 天。

生产日期和有效日期见标签。

【适用仪器】ABI 7500、ABI 7300、LightCycler480 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：口咽拭子

2. 样本采集、保存和运送

2.1 采样器材要求

2.1.1 拭子：应使用头部为合成纤维的拭子（例如，聚酯纤维），用铝或塑料做杆。不推荐棉拭子和木杆。不能用海藻酸钙做的拭子收集标本。标本采集管应包含 3 毫升病毒运输液；

2.1.2 采样管：外螺旋口、耐-70℃冻存；

2.1.3 采样液：含有蛋白质稳定剂，阻止细菌和真菌生长的抗生素，缓冲液（可使用 Hank's 或 Eagle's 等培养液加入抗菌素和 0.5%BSA）。

2.2 样本采集

2.2.1 口咽拭子：用带有聚丙烯纤维头的拭子适度用力擦拭双侧扁桃体及咽后壁，应避免触及舌部。同样将拭子头浸入采样液中，弃去尾部。

2.3 标本的储存和运送

2.3.1 临床标本储存：所有采集的标本应在医院采集时立即分装，一式二份，其中一份单独保存，以备复核。所有呼吸道标本应保存在 4℃，并尽快放置在 -70℃，但不应超过 2 年。如果没有 -70℃度冰箱，标本应保存在 -20℃，但不应超过 4 个月；

2.3.2 临床标本运输：应按照 A 类包装要求进行样品的包装，所有标本应标示清楚。疑似高致病性流感（如高致病性禽流感 H5N1、甲型 H1N1 等）的病例标本运送应包含的信息请参照禽流感标本运输。

2.4 生物安全防护原则

标本的检测、储存、包装和运送应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》（国务院 424 号令）和《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（中华人民共和国卫生部第 45 号令）等有关规定执行。

【检验方法】

1. 建议取 200μL 液态样本进行核酸提取。核酸提取可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170583 号、粤穗械备 20170668 号、粤穗械备 20170669 号），本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若提取试剂盒中无说明内标的使用方法，则可按照样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。本试剂盒中的阴性质控品、IVA 临界阳性质控品和 IVA 强阳性质控品均参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2. PCR 扩增

2.1 试剂准备及加样

2.1.1 取适量 PCR 反应管，每管加入 IVA PCR 反应液 A 17μL、IVA PCR 反应液 B 3μL（也可根据 PCR 反应用量，计算各组分所需总量，混匀后分装 20μL 于单个 PCR 反应管中）；

2.1.2 于上述 PCR 反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测标本核酸、IVA 强阳性质控品、IVA 临界阳性质控品各 5μL，8,000rpm 离心数秒，放入 PCR 扩增仪。

2.2 ABI Prism 7500 仪器设置（ABI Prism 7300 仪器参照此操作，具体操作见说明书）

2.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: none, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: none, Passive Reference: NONE。

2.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

- 50℃ 15 分钟，1 个循环；
 - 95℃ 15 分钟，1 个循环；
 - 94℃ 15 秒→58℃ 45 秒（收集荧光），45 个循环。
- 设置完成后，保存文件，运行程序。

2.3 LightCycler480 仪器设置

2.3.1 点击软件主界面的“New Experiment”，进入程序设定界面。

2.3.2 检测模式设置：从 Detection Format 的下拉框中选择分析模式：Multi Color Hydrolysis Probe，“Customizes”模块中选择 FAM(483-533)和 VIC(523-568)滤片组合，“Block Type”为仪器自动检测，“Plate ID”可手工输入或扫描仪扫描，“Reaction Volume”设定为 50uL。

2.3.3 循环参数：定义 PCR 程序中每个步骤（Program Name）及循环数(Cycles)和分析模式(Analysis Mode),利用“+”和“-”增加或删除步骤，扩增参数如下：

- 50℃ 15 分钟，1 个循环；
- 95℃ 15 分钟，1 个循环；
- 94℃ 15 秒→58℃ 45 秒，45 个循环；（此步采集荧光信号：“Analysis Mode”选择“Quantification”，“Acquisition Mode”选择“Single”）
- 40℃ 10 秒，1 个循环；

2.3.4 填样品表：点击“Sample Editor”模块，进入样本信息编辑界面，在“Select Workflow”中选择“Abs Quant”，在“Sample Name”列中定义样本名称，在“Sample Type”栏中选定样品类型：阴性质控品选 NTC；未知样品选 Unknown。

2.3.5 运行程序：点击“Experiment”模块，回到程序设定界面，点击窗口右下方的“Start Run”，弹出结果保存窗口，输入文件名和路径后进入程序运行界面。

3. 结果分析

3.1 反应结束后保存检测数据文件。

3.2 分析条件设置：根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、stop 值以及 Threshold 的 Value 值（用户可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。

4. 质量控制

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阴性质控品	Undet 或 No Ct	Ct 值≤44.5	阴性
IVA 临界阳性质控品	Ct 值≤33.0	有或无扩增曲线	阳性
IVA 强阳性质控品	Ct 值≤26.0	有或无扩增曲线	阳性

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

5. 结果判定

- 1. 如果检测样品的反应体系在 FAM 检测通道无扩增曲线或 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值>39.7，VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤44.5，可判样品为甲型流感病毒阴性；
- 2. 如果检测样品的反应体系在 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤39.7，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为甲型流感病毒阳性。

【阳性判断值】

通过临床样本检测结果分析，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的参考值为 CT 值为 39.7。

【检验结果的解释】

1. 每次实验均需检测阴性质控品，IVA 临界阳性质控品和 IVA 强阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定；

2. 阳性结果判定标准：FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤39.7，VIC 检测通道有或无扩增曲线；由于竞争抑制，VIC 通道无扩增曲线属于正常情况；

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阳性结果判定	Ct 值≤39.7	有或无扩增曲线	甲型流感病毒阳性

3. 阴性结果判定标准：FAM 检测通道无扩增曲线或 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值>39.7，VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤44.5；

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阴性结果判定	Ct 值>39.7	Ct 值≤44.5	甲型流感病毒阴性

4. 报告建议采用以下格式：

阴性结果报告格式为：样本未检测到甲型流感病毒核酸，浓度低于试剂盒的灵敏度；

阳性结果报告格式为：样本检测到甲型流感病毒核酸；

5. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【检测方法的局限性】

- 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. 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 3. 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。
- 4. 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。
- 5. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

- 1. 阴阳性参考品的符合率：10 份企业阴性参考品（N₁~N₁₀）及 14 份国家阴性参考品（NC01~NC14）检测结果均为甲型流感病毒阴性；10 份企业阳性参考品（P₁~P₁₀）及 8 份国家阳性参考品（PC01~PC08）检测结果均为甲型流感病毒阳性。
- 2. 最低检出限：本试剂盒检测甲型流感病毒的最低检出限为 1.60×10² PFU/mL；4 份企业最低检出限参考品（S₁~S₄）检测结果为 S₁~S₄ 为甲型流感病毒阳性，S₅ 不作要求；3 份国家最低检出限参考品 S1~S3，S1 浓度为 8.0×10³ copies/mL（即 1:10⁴ 稀释）及以上时，检测结果应为甲型流感病毒阳性；S2 浓度为 1.2×10⁴ copies/mL（即 1:10³ 稀释）及以上时，检测结果应为甲型流感病毒阳性；S3 浓度为 1.8×10³ copies/mL（即 1:10⁴ 稀释）及以上时，检测结果应为甲型流感病毒阳性。
- 3. 分析特异性：
- 3.1 本试剂盒能够特异检出 H7N9 禽流感病毒、甲型流感病毒 H1N1 (2009)、甲型流感病毒 H5N1、甲型流感病毒 H3N2、季节性流感病毒 H1 亚型。
- 3.2 与以下浓度的病原体样本无交叉反应：

乙型流感病毒 (1×10 ⁵ pfu/mL)	呼吸道合胞病毒 A 型 (1.0×10 ⁵ pfu/mL)	人偏肺病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	化脓链球菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
副流感病毒 1 型 (1×10 ⁵ pfu/mL)	呼吸道合胞病毒 B 型 (1.0×10 ⁵ pfu/mL)	肺炎衣原体 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	唾液链球菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
副流感病毒 2 型 (1×10 ⁵ pfu/mL)	麻疹病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	巨细胞病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	淋球菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
副流感病毒 3 型 (1×10 ⁵ pfu/mL)	风疹病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	肠道病毒 71 型 (1.0×10 ⁵ pfu/mL)	大肠杆菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
流行性腮腺炎病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	登革热病毒 I 型 (1.0×10 ⁶ TCID ₅₀ /mL)	柯萨奇病毒 16 型 (1.0×10 ⁵ pfu/mL)	肺炎链球菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
人冠状病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	登革热病毒 II 型 (1.0×10 ⁶ TCID ₅₀ /mL)	柯萨奇病毒 6 型 (1.0×10 ⁵ pfu/mL)	百日咳杆菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
水痘病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	腺病毒 3 型 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	乙型脑炎病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	无毒结核分枝杆菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
肺炎支原体 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	腺病毒 7 型 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	流行性出血热病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	脑膜炎奈瑟菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
鼻病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	人类免疫缺陷病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	乙型肝炎病毒 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	金黄色葡萄杆菌 (1.0×10 ⁵ copies/mL)

- 3.3 干扰反应：粘蛋白（2mg/mL）、鼻分泌物（1mg/mL）等内源性物质不干扰试剂盒检测结果；样本中可能存在药峰浓度的肾上腺素（1mg/mL）、地塞米松（6mg/mL）、布地奈德（0.64nmol/L）、硫磺（0.142mg /mL）不干扰试剂盒检测结果。
- 4. 精密度：本试剂盒的批内精密度及批间精密度Ct值的CV%均小于5%；2份企业精密度参考品R₁、R₂重复检测10次，检测结果均为甲型流感病毒阳性且Ct值的变异系数（CV,%）均不大于5%；1份国家精密性参考品CV重复检测10次，检测结果均为甲型流感病毒阳性且Ct值的变异系数（CV,%）均不大于5%。
- 5. 临床研究共检测样本 753 例，本试剂盒检出阳性组样本 376 例，阴性组样本 377 例，标本类型为口咽拭子。与对照复核方法相比，本试剂盒的检测阳性符合率和阴性符合率均为 100%，kappa 值为 1.000。

【注意事项】

- 1. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 2. 为试剂和标本准备阶段提供生物安全柜，实验过程中穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器；

3. 试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用；
4. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
5. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器,然后用紫外线灯照射 20—30 分钟；
6. 本试剂盒内阳性质控品应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《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》。

【参考文献】

1. Fu G, Liu M,.Establishment of a multiplex RT-PCR assay to detect different Lineages of swine H1 and H3 influenza A viruses.Virus Genes. 2010 Oct;41(2):236-40. Epub 2010 Aug 11.
2. Jenny SL, Hu Y, Overduin P, Meijer A.Evaluation of the Xpert Flu A Panel nucleic acid amplification-based point-of-care test for influenza A virus detection and pandemic H1 subtyping.J Clin Virol. 2010 Oct;49(2):85-9. Epub 2010 Jul 31.
3. Qin M, Wang DY.Development of single-tube multiplex real-time PCR for simultaneous detection of novel influenza A H1N1 and human seasonal influenza A H1N1 and H3N2 virus.Bing Du Xue Bao. 2010 Mar;26(2):97-102.
4. Gao Q,Lowen AC.A nine-segment influenza a virus carrying subtype H1 and H3 hemagglutinins.J Virol. 2010 Aug;84(16):8062-71. Epub 2010 Jun 2.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：<http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称：

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；

广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；

广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 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】