

甲型/乙型流感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/乙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、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的甲型流感病毒(*Influenza A virus*, Influa)和乙型流感病毒(*Influenza B virus*, Influb)。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。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。

流行性感冒(*Influenza*)是由流感病毒(*Influenza virus*)引起的急性呼吸道感染，主要通过空气中的飞沫、人与人之间的接触或与被污染物品的接触传播。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暴发流行，丙型极少引起流行。根据 HA 及 NA 抗原性的不同，甲型流感病毒又分为 17 个 HA 亚型和 10 个 NA 亚型，抗原不仅变异较快，不同亚型的新发组合也不断出现。乙型流感病毒存在着 Victoria 和 Yamagata 两个抗原不同的种系。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，分别以甲型流感病毒及乙型流感病毒基因组的保守区为靶区域设计引物和探针。提取的病毒 RNA 经反转录，产生 cDNA，进入 PCR 循环。PCR 扩增过程中，探针与模板结合，其 5'端报告基团被 Taq 酶(5'→3'外切核酸酶活性)切断，远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)。通过分别使用 FAM 和 VIC 荧光基团标记甲型流感病毒和乙型流感病毒探针，在同一反应体系中可同时进行甲型流感病毒和乙型流感病毒核酸的定性检测。

本试剂盒设置有内标对照，为流感病毒基因组非相关的基因片段，采用 CY5 荧光基团标记。

【主要组成成分】

序号	组分名称	主要成分	规格及装量	
			24 人份/盒	48 人份/盒
1	无核酸酶水	焦碳酸二乙酯、水	1000μL	1000μL
2	2×核酸扩增反应液	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液、热启动 DNA 聚合酶	240μL	480μL
3	20×逆转录酶	逆转录酶、RNA 酶抑制剂	24μL	48μL
4	10×甲型和乙型流感病毒反应液	引物、探针	48μL	96μL
5	内标对照	含非目标基因片段的假病毒	240μL	480μL
6	阳性对照	含甲型流感病毒和乙型流感病毒基因片段的假病毒	400μL	400μL
7	阴性对照	生理盐水	400μL	400μL

【储存条件及有效期】

试剂盒在-30℃至-15℃避光储存，有效期为 12 个月。

开盖后置于 2-8℃保存，有效期 15 天。避免反复冻融(冻融次数不得超过 7 次)。

生产日期和失效日期见试剂盒标签。

【适用仪器】

ABI 7500、上海宏石 SLAN-96P、ROCHE LightCycler 480 II 和 ROCHE cobas z480。

【样本要求】

一、适用样本类型：口咽拭子

二、样本采集

按照《国家流感中心标准操作流程》中关于咽拭子采集法进行采集。

左手用压舌板轻压患者舌部，右手持无菌拭子擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子浸入采样液中，在采样液中挤压拭子头部数次，用力折断拭子的尾部，弃去尾部。

采样管的要求：外螺旋口、耐-80℃冻存。

采样液的要求：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 等培养液加入抗生素和 0.5% BSA)。

三、样本保存和运送

样本在 2-8℃条件下可保存 7 天，超过 7 天应保存在-90℃至-70℃条件下，且不超过 6 个月，避免反复冻融(冻融次数不超过 4 次，超过 4 次未验证)。

【检验方法】

一、核酸提取(样本处理区)

取 200μL 待测样本、阳性对照和阴性对照，分别加入 10μL 内标对照。推荐使用天根生化科技有限公司病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(备案号：京昌械备 20200006 号)，具体操作请参照提取试剂盒说明书。

二、PCR 试剂配制(试剂准备区)

1. 体系配制：从试剂盒中取出试剂，待试剂完全解冻，颠倒混匀后瞬时离心。按 N 个(N=待测样本数+阳性对照+阳性对照+1)反应配制体系，反应体系配制如下表。

试剂名称	加量/反应	加量/N 个反应
2×核酸扩增反应液	10μL	10μL×N
10×甲型和乙型流感病毒反应液	2μL	2μL×N
20×逆转录酶	1μL	1μL×N
无核酸酶水	2μL	2μL×N

2. 体系分装：将上述反应液混匀离心后，按照每管 15μL 分装于荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

三、加样(样本处理区)

在分装好试剂的 PCR 反应管中分别加入 5μL 提取的待测样本 RNA、阳性对照 RNA 和阴性对照 RNA，总反应体积为 20μL。扣紧管盖，离心数秒后移至扩增检测区。

四、PCR 扩增检测(扩增检测区)

1. 将 PCR 反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测，检测通道分别设置为 FAM(483~533nm)、VIC(523~568nm)、CY5(615~670nm)，分别对应甲型流感病毒、乙型流感病毒和内标对照。

2. ABI 7500 仪器中“Quencher Dye”和“Passive Reference”均设置为 None。按照样本对应顺序设置阳性对照(Positive Control)、阴性对照(Negative Control)和样本(Unknown)，并设置样本名称。

循环数	温度	反应时间
1	45℃	10min
1	95℃	5min
45	95℃	15sec
	60℃	45sec
		采集荧光

3. Roche Light Cycler480II、Roche Cobas z 480 仪器中选择 New Experiment，在 setup 设置面板 Detection format 下拉菜单中选择样本检测的靶通道 FAM、VIC、CY5，设置 Reaction Volume 为 20。仪器参数设置如下(没有列出的参数，选仪器默认值)：

Progr am	Cyc les	Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Aquisition Mode	Analysis Mode
1	1	45℃	10min	None	None
2	1	95℃	5min	None	None
3	45	95℃	15sec	None	Quantificat ion
		60℃	45sec	Single	

五、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。

六、质控标准

试剂盒各对照品须达到以下要求，否则实验视为无效。

受控

质控品	FAM 通道 (Influ A)	VIC 通道 (Influ B)	CY5 通道 (内标对照)
阳性对照	Ct≤36	Ct≤36	Ct≤36 或无 Ct 值
阴性对照	无 Ct 值	无 Ct 值	Ct≤36

注：以上两项需在一次实验中同时满足，否则，本次实验无效。

七、试验结果的计算

荧光定量 PCR 仪自动分析计算出样本 Ct 值。

【阳性判断值】

根据临床试验结果，利用 ROC 曲线法确定本试剂盒甲型流感病毒参考值为 Ct 值 36、乙型流感病毒参考值为 Ct 值 36。

【检验结果的解释】

1. 在仪器正常，阳性对照、阴性对照和内标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. 阳性结果判定：待测样本扩增曲线呈典型的 S 型曲线，并具备如下条件，判为阳性。

编号	通道			结果判读
	FAM	VIC	CY5	
1	Ct≤36	无 Ct 值	Ct≤36 或无 Ct 值	甲型流感病毒阳性
2	无 Ct 值	Ct≤36	Ct≤36 或无 Ct 值	乙型流感病毒阳性
3	Ct≤36	Ct≤36	Ct≤36 或无 Ct 值	甲型/乙型流感病毒阳性

3. 实验灰区：如果甲型流感病毒（FAM 通道）或乙型流感病毒（VIC 通道） $36 < Ct \leq 40$ 且内标 $Ct \leq 36$ ，则判定样本落于实验灰区，对样本进行复检。若复检结果 $36 < Ct \leq 40$ 且内标 $Ct \leq 36$ ，有明显对数增长期，则判定结果为阳性；若无明显对数增长期，内标 $Ct \leq 36$ ，则判定结果为阴性。
4. 阴性结果判定：甲型流感病毒（FAM 通道） $Ct > 40$ 、内标 $Ct \leq 36$ ，扩增曲线无明显对数增长期，样本低于检测限，判为甲型流感病毒阴性；乙型流感病毒（VIC 通道） $Ct > 40$ 、内标 $Ct \leq 36$ ，扩增曲线无明显对数增长期，样本低于检测限，判为乙型流感病毒阴性。
5. 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没有扩增，待测样本可直接判为阳性。也可将待测样本进行稀释重新检测。

【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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 本试剂盒检测的靶序列为流感病毒基因的保守区域，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. 不合理的样本采集、运送与保存条件，样本中病毒含量过低，均可能导致假阴性结果。
5. 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子，可能会导致假阴性结果。
6. 样本处理时如未控制交叉污染，其他病原体如含有靶核酸序列，均可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 国家参考品符合情况：阳性符合率（+/+）为 10/10；阴性符合率（-/-）为 10/10；精密度参考品 Ct 值的 CV 均不大于 5.0%；最低检出限参考品 S1~S5 检测符合国家参考品规定。
2. 最低检出限：对不同梯度水平的病毒稀释液进行 20 次的重复检测， 1×10^3 PFU/mL 浓度水平阳性检出率不低于 90%。
3. 精密度：每天由 2 人在不同仪器上分别完成对精密性参考重复检测 10 次检测，经 20 天的连续检测，批内、批间、日间检测 Ct 值的 CV 均小于 5%。
4. 交叉反应：针对可能与流感样本产生交叉的其他病原体（副流感病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、人冠状病毒、巨细胞病毒、百日咳杆菌、人偏肺病毒、肠道病毒、肺炎衣原体、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎支原体、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、唾液链球菌）均无交叉反应。
5. 干扰物质：针对血液、鼻咽分泌物在样本浓度分别为 25% 时进行验证，未对检测结果产生显著影响；针对治疗感冒或其他呼吸道症状的患者外用或内服常见药物：如扎那米韦、肾上腺素、布地奈德、地塞米松、薄

荷脑、莫匹罗星、妥布霉素进行验证，未对检测结果产生显著影响。

6. 临床试验结果：跟市售试剂盒比较，甲型流感病毒的阳性符合率为 99.34%，阴性符合率为 98.52%，总符合率为 98.87%；乙型流感病毒的阳性符合率为 98.08%，阴性符合率为 99.20%，总符合率为 98.87%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测；请在有效期内使用本试剂盒。
2. 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。
3. 实验过程应分区进行（试剂准备区、样本处理区、扩增检测区），各区用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染。
4. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。
5. 试剂盒阳性对照为含目的基因片段的假病毒，内标对照为含非目的基因片段的假病毒，均无潜在传染性，但操作时以上组分仍应视为传染性物质处理。
6. 每次实验应设置阳性对照和阴性对照。
7. 建议使用新鲜待测样本。
8. 核酸提取过程严防 RNase 污染；完成核酸提取后，建议立即进行检测；选用合格的一次性使用的无 DNase 和 RNase 的实验耗材，如 PCR 管、离心管、枪头等。
9. 试剂盒各组分使用前请充分融化，长时间放置建议放置在冰上，混匀并瞬时离心后使用，避免反复冻融。
10. 使用已校准的移液器；因吸量液体时存在损耗，建议富余配制。
11. 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是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。
12. 扩增完毕取出反应管，密封在塑料袋内，丢弃于指定地点，避免污染环境。
13. 实验中用过的枪头应直接打入盛有 10% 次氯酸钠的废物缸内，与其他废弃物一同丢弃。
14. 实验完毕用 500~2000ppm 的次氯酸钠或 75% 酒精及紫外线灯处理工作台和移液器。
15. 实时荧光 PCR 仪需定期校正和清洁。应使用与仪器配套的 PCR 反应管。

【参考文献】

1. 《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》（WS 233-2002）
2. 《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
3. 《医疗废物管理条例》中华人民共和国国务院令（第 380 号）

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司
住所：北京市昌平区生命科学园科学园路 37 号院 1 号楼 C 座 101 室
联系方式：400-6500-984
售后服务单位名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司
联系方式：400-6500-984
生产地址：北京市昌平区沙河镇昌平路 97 号 5 幢 C 门 101.6 幢 504.7 幢 304
生产许可证编号：京药监械生产许 20190018 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注准 20193400251

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019 年 04 月 16 日

修改日期：2023 年 06 月 26 日