

【产品名称】通用名称：甲型/乙型流感病毒 RNA 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测人口咽拭子样本中的甲型流感病毒 RNA 和乙型流感病毒 RNA。

流感病毒包括甲、乙、丙三型，甲型最易引起流行，乙型次之，丙型极少引起流行。依据病毒颗粒外膜血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）蛋白抗原性的不同，甲型流感病毒可分为 16 个 H 亚型（H1~H16）和 9 个 N 亚型（N1~N9）。目前已有 H1、H2、H3、H5、H7 和 H9 等亚型感染人体的报道，乙型流感病毒不分型，但是主要有两大谱系——Yamagata 系（简称 Y 系）和 Victoria 系（简称 V 系）。流感病毒感染后人体出现头痛、发热、全身酸痛、鼻塞、咽痛等症状。

本试剂盒适用人群主要为具有流感病毒特征的患者，以及与流感患者密切接触的人群。本试剂盒在使用时操作人员必须经过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具有相关的实验操作资格，且其所在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】

本试剂盒选用甲型流感病毒 MP 基因和乙型流感病毒 NP 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。该探针能与引物扩增区域中间的一段核酸模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中 Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对甲型/乙型流感病毒核酸的自动化检测。

该试剂盒中的内标选用一对管家基因特异性引物，结合特异性探针。该探针能与引物扩增区域中间的一段核酸模板发生特异性结合，内标选用 TEXAS RED 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组 成	主要成分	规 格
Flu-A/Flu-B 主反应液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 及 dNTP	1ml×1
Flu-A/Flu-B 荧光探针	含引物、探针	70μl×1
Flu-A/Flu-B 酶混合液	含 DNA 聚合酶、逆转录酶及抗体	53μl×1
Flu-A/Flu-B 阳性对照	甲型/乙型流感病毒核酸片段（体外转录 RNA）	50μl×1
阴性对照	0.9%NaCl	50μl×1

注：1. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换

2. 核酸提取试剂盒需自备，使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒【苏苏械备 20151068 号】

【储存条件及有效期】

试剂-20℃±5℃，可保存 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存，不影响其稳定性，试剂反复冻融三次后在-20℃±5℃条件下可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置，不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光 PCR 扩增仪，天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪

【样本要求】

1. 标本：人口咽拭子样本。
2. 采集容器：应当选用国家批准生产的一次性使用的咽拭子采样器。
3. 保存液：推荐使用无菌的生理盐水。
4. 采集：样本采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。
5. 存放：样本 2~8℃保存，不超过 24 小时；样本-20℃以下保存，不超过 3 个月；样本-70℃以下可长期保存，但应避免反复冻融；样本提取产物 2~8℃保存，不超过 12 小时；样本提取产物-20℃以下保存，不超过 3 个月；样本提取产物-70℃以下至少可保存 7 个月，更长时间有待验证，但应避免反复冻融。
6. 运输：采用泡沫箱加冰袋密封，进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理（样本处理区）：建议使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒（磁珠法）进行提取，提取过程请严格按照说明书进行。

2. 试剂配制（试剂准备区）：从试剂盒中取出 Flu-A/Flu-B 主反应液、Flu-A/Flu-B 荧光探针和 Flu-A/Flu-B 酶混合液，在室温下融化并振荡混匀后 2000rpm 离心 10 秒，计算需准备反应试剂人份数 $n[n=样本数+2（对照品数）]$ 。

试 剂	Flu-A/Flu-B 主反应液	Flu-A/Flu-B 荧光探针	Flu-A/Flu-B 酶混合液
用量（μl）	28.5	2.0	1.5

每人份反应体系配制如下：计算上述各试剂的使用量，加入一适当体积的离心管中，充分混匀后按 32μl 分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

3. 加样（样本处理区）：分别加入 8μl 阴性对照、Flu-A/Flu-B 阳性对照（无需抽提）及样品处理上清液，终体积为 40μl/管，盖紧反应管进行瞬时低速离心，转移至扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测（扩增区）：将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，并按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循环数	温 度（℃）	反应时间
1	1	50	30 分钟
2	1	95	10 分钟
		94	15 秒
3	5	50	30 秒
		72	30 秒
		94	10 秒
4	40	58	30 秒（收集荧光）

检测荧光选择：Flu-A（FAM）、Flu-B（VIC）及内标（TEXAS RED）。

【阳性判断值】

1. 甲型流感病毒阳性判断：FAM 通道检测 Ct 值≤37.0 时，则判断该样本为甲型流感病毒 RNA 阳性。

2. 乙型流感病毒阳性判断：VIC 通道检测 Ct 值≤37.0 时，则判断该样本为乙型流感病毒 RNA 阳性。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点为准。阳性对照 Ct 值应<30.0，阴性对照 Ct 无数值；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂及扩增条件等方面的误差。

FAM 通道:

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者, 判断 Flu-A 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct \leq 40.0$ 的样本建议重做, 若重做后结果 Ct 值 < 40.0 者, 判断 Flu-A 为阳性, 否则为阴性。
3. 如果检测样本测定 Ct 值无数据, 需要查看内标 Ct 值。如果内标 Ct 值 < 40.0 的标本, 判断 Flu-A 为阴性; 内标 Ct 值无数据, 则怀疑有假阴性的情况, 应当重复实验。

VIC 通道:

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者, 判断 Flu-B 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct \leq 40.0$ 的样本建议重做, 若重做后结果 Ct 值 < 40.0 者, 判断 Flu-B 为阳性, 否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数据, 需要查看内标 Ct 值。如果内标 Ct 值 < 40.0 的标本, 判断 Flu-B 为阴性; 内标 Ct 值无数据, 则怀疑有假阴性的情况, 应当重复实验。

【检验方法的局限性】

1. 检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据, 仅供临床医生参考使用。同时, 当样本的采集、保存及运输条件不当, 流感病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变, 都可导致假阴性结果。
2. 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. 如在样本处理过程中发生交叉污染, 则可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 外观: 试剂盒包装完好, 盛装各试剂的冻存管及离心管无破损, 标签完好。
2. 阴性符合率: 8 份来自临床协议单位的阴性参考品样本, 即肠道病毒 71 型、人副流感病毒 1 型、人副流感病毒 2 型、人副流感病毒 3 型、腺病毒 3 型、腺病毒 7 型、RSV-B 及麻疹病毒样本各一份, 检验结果均应为阴性, 符合率 (-/-) 为 8/8。
3. 阳性符合率: 9 份来自临床协议单位的阳性参考品样本, 即季节性 H1N1 亚型、H3N2 亚型、2009 新型 H1N1 亚型、H5N1 亚型、H9N2 亚型、H7N9 亚型各一份, 乙型流感病毒 V 型与 Y 型各一份, 以及 H3N2 亚型与乙型流感病毒混合样本一份, 检验结果均应为阳性, 符合率 (+/+) 为 9/9。
4. 检测限: 浓度为 500copies/ml 的检测限参考品 L1~L3, 分别重复 20 次, 至少 17 次检测结果为阳性, 检测结果符合率 $\geq 17/20$ 。
5. 精密度: 选用两例高、低浓度样本作为精密度测试样本, 重复测试 10 次, Ct 值的变异系数 (CV, %) $\leq 5.0\%$ 。
6. 交叉反应: 本试剂盒与人 3 型/7 型腺病毒、呼吸道合胞病毒 B 型、人副流感病毒 1 型/2 型/3 型、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 16 型、肺炎支原体、肺炎衣原体、鼻病毒、人巨细胞病毒、人偏肺病毒、人冠状病毒 OC43/229E、人冠状病毒 NL63/HKU1、EB 病毒、麻疹病毒、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌、唾液链球菌、化脓链球菌、脑膜炎奈瑟菌、百日咳杆菌等其他相关病原体, 均无交叉反应 (以上病毒浓度为 10^5 pfu/ml 以上, 细菌为 10^6 cfu/ml 以上)。
7. 干扰物: 0.2mg/L 倍氯米松、0.15mg/L 地塞米松、12mg/L 曲安西龙、0.4mg/L 布地奈德、0.05mg/L 莫美达松、0.5mg/L 氟替卡松、75mg/L 苯佐卡因、5mg/L 扎那米韦、75mg/L 妥布霉素、75mg/L 硫磺、150mg/L 金英、0.125mg/L 肾上腺素、500mg/L 氟尼缩松、500mg/L 莫匹罗星及 10g/L 黏蛋白, 对本试剂盒检测结果无影响。
8. 在所规定检测范围内本试剂盒与对比试剂定量结果经 SPSS 差异显著性分析, 结果表明二者无显著差异。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外检测试剂, 操作人员应经过专业培训, 并具有一定经验。
2. 为保证实验结果的准确性和可靠性, 请使用已校准的移液器, 选用合格的一次性使用的 PCR 反应管、离心管及枪头等进行样本处理及配液等操作, 所有用具应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
3. 实验请严格分区操作:
第一区: 试剂准备区—准备扩增所需试剂。
第二区: 样本处理区—待检测样本和对照品的处理。
第三区: PCR 扩增区—PCR 扩增检测, 各区物品均为专用, 不得交换使用, 避免污染, 每次实验结束后立即清洁工作台。
4. 本产品使用前应在室温下充分融化, 混匀并进行瞬时低速离心。
5. 样本处理应在生物安全柜中进行, 以保护操作人员安全, 防止对环境的污染。
6. 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, 保证在有效期内使用试剂盒。
7. 待测样本应尽可能新鲜, 提取过程严防 RNA 酶污染及操作不当导致 RNA 降解。
8. -70°C 保存的 RNA 样本, 加样前应在室温下充分融化和混匀, 并瞬时低速离心后使用。
9. 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密封袋内, 再转移至样本处理区。
10. 加样时应使样品完全加入反应液中, 不应有样品黏附于管壁上, 加样后应尽快盖紧管盖。
11. 反应液分装时尽量避免产生气泡, 上机前注意检查各反应管是否盖紧, 避免泄露而污染仪器。
12. 扩增完毕取出反应管, 密封在专用塑料袋内, 丢弃于指定地点。
13. 实验中用过的枪头请直接打入盛有 10%次氯酸钠的废物缸内, 并与其他废弃物品一同丢弃。
14. 工作台及各种实验用物品经常使用 10%次氯酸钠、75%乙醇和紫外灯进行消毒。
15. 需经常校正实时荧光 PCR 仪, 清洁载样板的板孔。
16. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性的物质, 操作和处理时均需符合《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》(WS233—2002) 和《医疗废物管理条例》(第 380 号) 的相关要求。

【参考文献】

1. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams P.M. Real-time Quantitative PCR. Genome Res. 6, 986–994 (1996).
2. Russell Higuchi, Carita Fockler, Gavin Dollinger & Robert Watson. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reaction. Biotechnology, 1993, 11(9):1026–1030.
3. JF Williams. Optimization strategies for the Polymerase Chain Reaction. Biotechniques, 1989, 7(7):762–769.
4. 程小雯, 周丽, 赵锦, 等. 荧光定量 RT-PCR 在流感病毒检测上的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3):289-290.
5. Tsushima Y, Uno N, Sasaki D, et al. Quantitative RT-PCR Evaluation of a Rapid Influenza Antigen Test for Efficient Diagnosis of Influenza Virus Infection. Journal of Virological Methods, 2015, 212:76-79.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 苏州天隆生物科技有限公司
住所: 苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室
生产地址: 苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 (NW-07) 501 室, 苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋 (NW-06) 504 室
联系方式: 0512-62525631 传真号码: 0512-62956337 网址: www.medtl.cn
售后服务单位名称: 苏州天隆生物科技有限公司
联系方式: 0512-62525631 传真号码: 0512-62956337 网址: www.medtl.cn
生产许可证编号: 苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20193400033

【说明书核准日期及修改日期】 2019.01.14