

人感染 H7N9 禽流感病毒 RNA 检测试剂盒  
(荧光 PCR 法) 说明书

## 【产品名称】

通用名称：人感染 H7N9 禽流感病毒 RNA 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 50 人份/盒

## 【预期用途】

本试剂盒用于咽拭子、痰液样本中 H7N9 禽流感病毒核酸的定性检测。

人感染 H7N9 禽流感是由 H7N9 亚型禽流感病毒引起的急性呼吸道传染病，2013 年 2 月和 3 月，在上海和安徽两地率先发现新亚型 H7N9 型禽流感，国家卫计委已将其纳入法定乙类传染病。禽流感病毒属于甲型流感病毒，是一种单链 RNA 病毒，属正粘病毒科，此次人感染 H7N9 禽流感病毒是一种三元重组禽流感病毒。人感染 H7N9 禽流感潜伏期一般为 7 天以内，患者一般表现为流感样症状，如发热，咳嗽，少痰，可伴有头痛、肌肉酸痛和全身不适；重症患者病情发展迅速，表现为重症肺炎，体温大多持续在 39℃ 以上，出现呼吸困难，可伴有咯血痰，可快速进展出现急性呼吸窘迫综合征、纵隔气肿、脓毒症、休克、意识障碍及急性肾损伤等。主要传播方式为呼吸道传播及直接接触病毒或含有病毒的禽类分泌物或排泄物。实验室检测方法目前主要有病毒分离、核酸检测等。

## 【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以 H7N9 禽流感病毒 H7 亚型和 N9 亚型基因为靶基因设计特异性引物和探针。探针为包含 5' 端报告基团和 3' 端淬灭基团的寡核苷酸。在 PCR 扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被 Taq 酶（5' → 3' 外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现 H7N9 禽流感病毒在核酸水平上的定性检测。

## 【主要组成成分】

| 组份名称           | 规格及数量     | 主要成分                                                                              |
|----------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 核酸扩增反应液        | 375μl×1 管 | 三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液                                                           |
| 酶混合液           | 250μl×1 管 | 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶                                                               |
| H7N9 反应液       | 200μl×1 管 | 含 H7 亚型、N9 亚型及 RNase P 的引物、探针                                                     |
| 阳性对照           | 500μl×1 管 | 含 H7 亚型、N9 亚型及 RNase P 特定基因片段的病毒样颗粒                                               |
| 弱阳性对照          | 500μl×1 管 | 含 H7 亚型、N9 亚型及 RNase P 特定基因片段的病毒样颗粒（浓度为 $1 \times 10^4$ copies/ml，CT 值在 30-35 之间） |
| 去 RNA 酶水（空白对照） | 500μl×1 管 | 经焦碳酸二乙酯处理过的水                                                                      |

备注：不同批号间的试剂不能互换。本试剂盒不包含但检测必需的配套提取试剂：硕世生物的病毒核酸提取试剂盒（货号：SDK60101）、Qiagen 公司的 QIAamp RNA Mini Kit（货号：52904）或者 Roche 公司的 High Pure Viral Nucleic Acid Kit（货号：11858874001）提取试剂盒提取 RNA，按试剂盒说明书操作。

## 【储存条件及有效期】

避光 -20℃ 贮存，有效期 12 个月。冰袋低温运输不能超过 4 天；反复冻融次数不能超过 5 次。

生产日期、有效期至：见试剂盒外包装。

## 【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。

## 【样本要求】

适用样本类型为咽拭子、痰液样本。

咽拭子样本采集按照《临床护理实践指南》（2011 版）中关于咽拭子采集法进行采集。采集病人发病 3 日内的咽拭子样本，用专用采样棉签，棉签材质为脱脂棉和木棒。用压舌板轻压舌部，迅速用棉签擦拭患者口腔两侧腭弓及咽、扁桃体的分泌物，避免咽拭子触及及其他部位；迅速将棉签放入装有 3~5ml 生理盐水的采集管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖密封，以防干燥。

痰液以清晨第一口痰为宜。先用清水漱口，嘱患者用力咳出深部的痰于无菌样本保存管，密封，即可送检。

样本采集后应及时检测，2℃-8℃ 保存 3 天内完成检测，-20℃ 保存期 6 个月，-70℃ 可以保存 12 个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过 5 次，采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

## 【检验方法】

## 1. 试剂准备（试剂准备区）

取出试剂盒，在室温下融化并振荡混匀后，低速离心 10 秒，计算需准备反应试剂人份数 N（N=样本数+3 管对照）。每人份反应体系配制如下：

反应液配制表（每人份）

| 反应液组份     | 加量 (μl)/每人份 |
|-----------|-------------|
| 核酸扩增反应液   | 7.5         |
| 酶混合液      | 5           |
| H7 N9 反应液 | 4           |
| 去 RNA 酶水  | 3.5         |
| 总体积       | 20          |

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 20μl 的量分装到 n 个 PCR 反应管中。

## 2. 样本处理（样本处理区）

## 2.1 核酸提取：

各取 200 μl 待测样本、阳性对照、弱阳性对照和空白对照用硕世生物的病毒核酸提取试剂盒（货号：SDK60101）、Qiagen 公司的 QIAamp RNA Mini Kit（货号：52904）或者 Roche 公司的 High Pure Viral Nucleic Acid Kit（货号：11858874001）提取试剂盒提取 RNA，按试剂盒说明书操作。

本试剂盒的阳性对照、弱阳性对照、空白对照参与提取，用于对环境的监控和试剂的质控。

## 2.2 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、阳性对照、弱阳性对照、空白对照各 5 μl，终体积为 25 μl/管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

## 3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 ABI7500 操作说明

3.2.1 循环参数设定

| 步骤                               |            | 温度  | 时间    | 循环数       |
|----------------------------------|------------|-----|-------|-----------|
| 1                                | 逆转录        | 50℃ | 30min | 1 cycle   |
| 2                                | 预变性        | 95℃ | 5 min | 1 cycle   |
| 3                                | 变性         | 95℃ | 10 s  | 45 cycles |
|                                  | 退火、延伸及检测荧光 | 55℃ | 40 s  |           |
| 步骤 3 中 55℃时荧光检测，检测通道：FAM、VIC、ROX |            |     |       |           |

\*注：ABI7500 实时荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

## 3.2.2 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。

#### 【阳性判断值】

在正常人群中不应检测出 H7N9 禽流感病毒的核酸，利用受试者工作曲线（ROC）确定本试剂盒的 H7N9 禽流感病毒临界 Ct 值 H7 亚型为 36.2；N9 亚型为 36.6。

#### 【检验结果的解释】

质量控制：

| 通道<br>对照组 | Ct值   |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|
|           | FAM通道 | VIC通道 | ROX通道 |
| 空白对照      | UNDET | UNDET | UNDET |
| 阳性对照      | Ct≤30 | Ct≤30 | Ct≤30 |
| 弱阳性对照     | Ct≤35 | Ct≤35 | Ct≤35 |

注：以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

#### 结果判读

在仪器正常，阳性对照和空白对照均正常的情况下进行结果分析（FAM 通道代表禽流感病毒 H7 亚型，VIC 通道代表禽流感病毒 N9 亚型，ROX 通道代表内标）。

|   | FAM通道<br>Ct值      | VIC通道<br>Ct值      | ROX通道<br>Ct值 | 结果判读                   |
|---|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| 1 | Ct≤36.2           | Ct>36.6或<br>UNDET | 不做要求         | 禽流感病毒H7亚型阳性            |
| 2 | Ct>36.2或<br>UNDET | Ct≤36.6           | 不做要求         | 禽流感病毒N9亚型阳性            |
| 3 | Ct≤36.2           | Ct≤36.6           | 不做要求         | 禽流感病毒H7N9阳性            |
| 4 | Ct>36.2或<br>UNDET | Ct>36.6或<br>UNDET | Ct≤35.0      | 禽流感病毒H7亚型和N9<br>亚型同为阴性 |

注：当样本检测结果为阳性时，若内标无扩增信号或者Ct值>35，其阳性结果仍然可信。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒用于咽拭子、痰液样本中 H7N9 禽流感病毒核酸的定性检测。对于检测结果为阳性的情况，可提示所检样本中存在 H7N9 病毒；但是，如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。因此，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量。

2. 检测结果和样本采样、运输及保存条件有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果；同时，对于新增血清型、变异株可能存在不能检出的情况，也会造成假阴性的结果。因此，对于临床高度怀疑的阴性结果，建议采用多种样本类型或多次采样进行检测，必要时可考虑采用其他试剂进行检测。

#### 3、有关假阴性结果的可能性分析

①不正确的样本采集、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未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

#### 【产品性能指标】

1. 国家参考品的符合率：3 份阳性参考品符合率 100%（3/3），15 份阴性参考品的符合率 100%（15/15）；

企业参考品的符合率：3 份阳性参考品符合率 100%（3/3），7 份阴性参考品的符合率 100%（7/7）。

2. 最低检测限：检测 H7N9 国家参考品（A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013）为 100U；检测 H7N9 企业参考品为  $1 \times 10^3$  copies/ml。

3. 特异性：与感染部位相同或感染症状相似且常见的其它

病原体（ $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml 的腺病毒 3 和 7 型、人冠状病毒、人巨细胞病毒、肠道病毒 71 型、人副流感病毒 1、2、3 和 4 型、麻疹病毒、人偏肺病毒、人博卡病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型、人鼻病毒、乙型流感病毒、流感病毒 H1 亚型和 H3 亚型、禽流感病毒 H5N1，和  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的肺炎链球菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、克雷伯杆菌、流感嗜血杆菌、百日咳杆菌、结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌和唾液链球菌）无交叉反应。

4. 精密度：检测精密度参考品的变异系数<5%。

5. 当常见的干扰物质如血液、粘液、奥司他韦、阿昔洛韦、病毒唑、扎那米韦、帕拉米韦在检验样本中的浓度分别为 25%、25%、30 mg/ml、200 mg/ml、200 mg/ml、10 mg/ml、300 mg/ml 时，不会影响到样本检测结果。

6. 临床试验结果总结：共检测 1400 例样本，其中包括 1004 例咽拭子和 396 例的痰液样本。与测序法相比，阳性符合率 100%，阴性符合率 99.82%，总符合率 99.86%；Kappa 值为 0.9953，说明两种方法检测性能具有很好一致性。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅作为体外诊断试剂使用。操作人员应经过专业培训并具有一定经验。

2. 操作者应当严格按照产品说明书的规定进行采样、转运和储存，并在规定的时间内进行检测。

3. 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、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。

4. 实验请严格分区操作；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请立即清洁工作台。

5. 本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。

6. 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。

7. 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，在有效期内使用试剂盒。

8. 待测样本尽可能新鲜，提取过程应严防 RNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 降解。

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，不应有样品粘附于管壁上，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%次氯酸钠的废液缸内，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用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。

15. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板板孔。

16. -70℃保存的 RNA 样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。

17. 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。

#### 【参考文献】

[1] 《人感染 H7N9 禽流感诊疗方案（2013 年第 2 版）》，国家卫生和计划生育委员会办公厅，2013 年 4 月 10 日；

[2] Gao R, Cao B and Hu Y et.al, Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. The New England Journal of Medicine. 2013 Apr 11.p1-10.

#### 【基本信息】

注册人：江苏硕世生物科技有限公司

住所：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区

联系方式：电话 0523-86201616 传真 0523-86201617

网址 www.s-sbio.com

售后服务单位名称：江苏硕世生物科技有限公司

联系方式：电话 0523-86201616 传真 0523-86201617

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14 四楼办研区）

【生产许可证编号】苏食药监械生产许20100121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】

