

# 医院人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测 标准操作程序

## 一、目的

确保人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测过程标准化、规范化，降低人为不规范操作对检测结果造成的影响，保证结果的准确性和可重复性。

## 二、适用范围

医疗机构临床基因扩增检验实验室按照《关于医院开展人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测有关工作的通知》（卫办医政函〔2013〕383 号）和《关于做好医疗机构人感染 H7N9 禽流感检测试剂供给保障工作的通知》（卫发明电〔2013〕29 号）有关要求，使用国家疾病预防控制中心制备或商品化试剂盒开展人感染 H7N9 禽流感病毒核酸检测工作。

## 三、样本采集、运送和保存

尽量采集病例发病早期的呼吸道样本（上呼吸道样本包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物、咽漱液和鼻洗液，下呼吸道样本包括痰液、气管吸取物、肺洗液、肺组织等）。可将鼻、咽拭子收集于同一采样管中，以便提高检出率。患者有下呼吸道样本时，应优先采集。

根据试剂说明书对样本采集方法有关要求，制订样本采集标准操作程序（SOP），并组织样本采集人员进行培训及考核。样本的采集应当严格按照 SOP 进行。

样本采集后，按照《人间传染病的病原微生物名录》中高致病性禽流感病毒的相关规定进行包装，用密封容器立即送往实验室。若气温高时，需放入冰块降温。样本抵达实验室后，应尽快进行检测，24小时内能检测的样本可置于2~8℃暂时保存，24小时内无法检测的样本则应置于 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 状态保存。如无 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存条件时，可于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存。样本避免反复冻融。

样本采集、处理、运输及保存不当时，可因病毒RNA降解出现假阴性结果，也可因为样本“污染”出现假阳性结果。

#### **四、PCR 检测**

##### **(一) 样本处理**

样本的核酸提取应当在样本处理区进行。按所采用的商品化试剂盒说明书要求，取适量待检样本、阳性及阴性对照进行核酸提取。样本应尽可能新鲜，提取过程应严防RNA酶污染及操作不当导致的RNA降解。提取过程如涉及离心步骤，应采用低温冷冻离心机；在生物安全柜内进行加样、提取过程中，为防止RNA降解，可将试管架置于托盘内平铺的碎冰上。提取好的RNA应及时用于检测，否则应当 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存。如无 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存条件，可于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存。

##### **(二) 试剂准备**

试剂准备应当在试剂准备区进行。根据所用的试剂盒，样本可进行甲型流感病毒核酸、禽流感H7亚型或H7N9病毒核酸的检测。试剂的配制按所用商品化试剂盒说明书进行。

除酶混合物外，其它试剂在使用前应当在室温充分复融，混匀并瞬时低速离心。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，以免管内溶液泄露污染仪器。分装有扩增反应液的反应管应当扣盖或装入密实袋内再转移至样本处理区。

### **(三) 加样**

加样应当在样本处理区进行。加样时应当使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

按试剂、仪器说明书完成加样和 PCR 反应管准备。

### **(四) PCR 扩增检测**

PCR 扩增检测在扩增区进行。待检 PCR 管转移至扩增区，按顺序置于 PCR 仪上，编辑样本信息，按试剂和仪器说明书设定循环参数。

### **(五) 结果分析**

根据所用试剂盒说明书设置基线值 (baseline)。荧光阈值 (threshold) 设定以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点为原则，且 Ct 值应大于所设置的扩增循环数 (或显示为 undet)。使用仪器配套软件自动分析结果。

### **(六) 质量控制**

检测过程对可能出现的假阳性和假阴性进行质量控制，除了检测商品试剂盒所提供阳性和阴性对照外，每次临床样

本检测时，至少应当有 1 份弱阳性和 3 份阴性质控样本（多份阴性质控样本设置对实验室“污染”所致假阳性的监控更为有效），随机放在所检测标本的中间。弱阳性质控样本可为检测阳性的灭活稀释后保存的临床样本、灭活病毒或假病毒颗粒等，如所采用的商品化试剂盒有“内标”控制假阴性，或弱阳性质控样本来源困难，可暂不设弱阳性质控。阴性质控样本采用标本采集管内溶液即可。质控样本应与临床标本同等对待，参与样本核酸提取和扩增检测全过程。

试剂盒中的阳性和阴性对照用于判断实验室的有效性，按试剂盒说明书进行。

### **（七）实验结果的判定与解释。**

按照试剂盒说明书进行。对于出现弱阳性结果的样本应进行重复检测，并注意与可能的实验室轻度或样本交叉“污染”所致假阳性结果区别。

## **五、检测结果报告**

按照试剂盒说明书进行。

## **六、其它注意事项**

（一）人感染 H7N9 禽流感病毒实验室活动、样本采集和运输按照《人间传染的病原微生物名录》中高致病性禽流感病毒进行管理。从事人感染禽流感检测的技术人员必须经过生物安全培训并具备相应的实验技能，在检测过程中必须采取生物安全防护措施（使用眼罩、N95 型口罩等）。样本

核酸提取必须在 II 级生物安全实验室，经过年检合格的二级生物安全柜内进行。实验室应具有良好的通风。

（二）注意仪器设备的日常和定期维护，加样器、扩增仪和温育设备应进行定期校准。试剂盒及一次性使用的无 DNA 酶和 RNA 酶 PCR 反应管、离心管、带滤芯吸头等应进行每批质检。

（三）实验应严格分区操作；各区物品、工作服等均应当专区专用，不得交叉使用。实验后应及时清洁工作台，以防污染。

（四）每批实验室后，可采取实验室通风、10%次氯酸钠溶液擦洗地台面、紫外照射等措施，消除可能存在的扩增产物气溶胶污染。

（五）使用中国疾控中心制备试剂开展检测工作时，可参考相应试剂盒说明书（见附件 1、2）有关要求。

- 附件：1. H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书  
2. H7N9 禽流感病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

## H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 检测试剂盒

# (荧光 PCR 法) 说明书

## 【产品名称】

通用名称：H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

英文名称：Diagnostic Kit for H7N9 subtype avian flu virus RNA (Fluorescence PCR)

【包装规格】 48 人份/盒。

## 【预期用途】

本试剂用于对咽拭子样本中 H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 进行定性检测，用于 H7N9 禽流感病毒感染的辅助诊断及流行病学监控。

【检验原理】根据荧光 PCR 技术原理，针对 H7N9 亚型禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因设计特异性引物和 Taqman 探针，通过荧光 PCR 检测仪进行检测，从而实现 H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 的定性检测。试剂盒以正常人上皮细胞中广泛存在的核糖核酸酶 P (RNase P) 的 mRNA 为正常人体细胞对照，对提取和检测过程进行监控。

## 【主要组成成分】

名称	成分	规格	数量 (管)
H7 反应液	含内标 RNP、H7 亚型特异基因的引物探针混合液	1.0ml/管	1
N9 反应液	含内标 RNP、N9 亚型特异基因的引物探针混合液	1.0ml/管	1
DNA 聚合酶	DNA 聚合酶，不可用其他同类 DNA 聚合酶替代	60μl/管	1

逆转录酶	逆转录酶，不可用其他同类逆转录酶替代	60µl/管	1
阳性对照	RNP、H7、N9 RNA 假病毒混合物	1.0ml/管	1
阴性对照	DEPC 水	1.0ml/管	1

本品各组成成分均不得与其他产品或不同批号产品中的相应组成成分进行互换。

**本品不包含，但对试验必须的设备和试剂：**

生物安全柜、台式离心机、旋涡振荡器、拭子、采样管、无菌病毒采样液、1.5 ml 无核酸酶的离心管、全自动荧光 PCR 检测仪专用 PCR 扩增管和核酸分离试剂盒(硅胶膜吸附法，北京金豪制药股份有限公司，Cat：BJH101)。

**【储存条件及有效期】**-20℃ 冷冻保存，有效期 2 个月，阳性对照反复冻融次数不得超过 5 次。

**【适用仪器】**RG3000、LightCycler、ABI Prism 7500、ABI Prism 7000 型全自动荧光 PCR 检测仪。

**【样本要求】**

1. **样本类型：**咽拭子。推荐使用金豪公司生产的微生物采样及运送管（12 人份/盒）。

**2. 拭子、采样管和保存液：**

2.1 拭子选择：应使用头部为合成纤维（例如，聚酯纤维），杆部为铝或塑料的拭子。

2.2 采样管：外螺旋口、耐-70℃ 冻存，可容纳 3 ml 病毒采样液。

2.3 无菌病毒采样液：应含有蛋白质稳定剂，阻止细菌和真菌生产的抗生素，缓冲液，经无菌处理。

**3. 样本采集、运输和保存：**

由于 H7N9 亚型禽流感病毒为呼吸道传播病毒，有关生物安全应按照“《人间传染的病原微生物名录》”中高致病性禽流感病毒进行管理。

3.1 采集：采集病人发病 3 日内的咽拭子标本，用于病原检测。用微生物采样及运送管内的采样棉签，适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将棉签放入装有 3ml 保存液的 15ml 外螺旋盖采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，以防干燥，外表贴上带有唯一识别号码的标签。4℃ 暂存并在 48 小时内送达实验室。

3.2 保存和运输：新鲜采集样本应在 4℃ 条件下 48 小时运送到检测实验室。保存样本可在 -20℃ 以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于 -70℃ 冰箱。冷冻样本应在冷冻条件下送至实验室。运输时在包装箱内填充吸水材料，运输过程中保持标本采集管直立状态，不能倾斜。

样本送至实验室后，立即进行处理和分装，避免反复冻融。临床样本保存在 4℃ 不能超过 4 天。

#### 4. 咽拭子标本的处理

咽拭子要在标本保存液中充分搅动（至少 40 下），以洗脱拭子上粘附的病毒及含有病毒的细胞等，用于病毒分离时，需要冻融一次（防止多次冻融），使细胞破裂，释放病毒颗粒。然后在 4℃ 条件下，10000rpm 离心 20 分钟，用上



清接种细胞或直接提取 RNA。如果发现有细菌污染，须用滤器过滤除菌。

## 【检验方法】

### 1. 核酸提取：

取 200  $\mu$ l 咽拭子样本进行核酸提取。采用北京金豪制药股份有限公司的核酸分离试剂盒（硅胶膜吸附法），该试剂盒可用于对呼吸道悬浮液样本中的病毒 RNA 提取，并按试剂盒说明书要求操作。

本品的阳性对照和阴性对照均参与核酸提取。

#### 1.1. 准备及注意事项：

1.1.1 分别在洗液 A 瓶和洗液 B 瓶中加入 16ml 和 60ml 无水乙醇，颠倒充分混匀，并在瓶身上加以标识。

1.1.2 吸取所需的洗脱液，加至一无核酸酶的 eppendorf 管中，于 70℃ 预热。

1.1.3 冷冻样本应室温融化，轻微震荡混匀后使用。

1.1.4 区分操作中的离心设置（rpm 和 g），本产品操作过程均为室温离心。

1.1.5 助沉剂在低温保存时可能呈胶状，吹打混匀即可使用。

#### 1.2. 样本裂解及核酸吸附

1.2.1 在 1.5ml 无核酸酶的离心管中加入 10  $\mu$ l 助沉剂和 400  $\mu$ l 裂解液，加入 200  $\mu$ l 待处理样本，剧烈震荡 2 分钟，室温静置 10 分钟。

注：如样本体积小于或大于 200  $\mu$ l，需按比例改变助沉剂、裂解液以及无水乙醇体积。体积大于 400  $\mu$ l 样本应分多次进行处理。

1.2.2 加入 480  $\mu$ l 无水乙醇，颠倒混匀，吸取 600  $\mu$ l 裂解混合物转移到核酸吸附柱中。

注：如样本体积小于或大于 200  $\mu$ l，需按比例改变乙醇用量。

1.2.3 3500g 离心 2 分钟，取下套管，倒掉套管中的液体。将剩余裂解混合物转移至核酸吸附柱，重新离心一次，弃套管中的液体。

1.2.4 将核酸吸附柱重新装入套管，6000g 离心 1 分钟，倒掉套管中的液体。

### 1.3. 核酸纯化

1.3.1 将核酸吸附柱重新装入套管，在核酸吸附柱中加入 500  $\mu$ l 洗液 A，6000g 离心 1 分钟，将核酸吸附柱装入一个干净套管中。

1.3.2 在核酸吸附柱中加入 500  $\mu$ l 洗液 B，静置 1 分钟，6000g 离心 1 分钟。

1.3.3 倒掉套管中的液体，将核酸吸附柱重新装入套管。

1.3.4 重复一次 1.3.2 步骤(本步骤不用静置 1 分钟)。

1.3.5 将核酸吸附柱换一新套管，13000rpm 离心 3 分钟。

#### 1.4. 核酸洗脱

1.4.1 将核酸吸附柱装入一无核酸酶 1.5ml 离心管，小心在吸附膜中央加入 50  $\mu$ l 预热洗脱液，室温静置 4 分钟。

1.4.2 10000 rpm 离心 2 分钟，离心管中液体即待测样本 RNA。

### 2. PCR 扩增：

#### 2.1 实验设计：

2.1.1 待检样本检测：每份样本分别使用 2 种反应液(H7 和 N9 反应液) 进行检测，综合 2 种反应液的检测结果对样本进行判定。

2.1.2 对照品检测：每次试验都应设置阴性对照和阳性对照。

#### 2.2 反应体系的配制：

2.2.1 准备工作：将 2 种反应液 (H7 和 N9 反应液) 融化后振荡混匀，离心 6000rpm 10 秒。

2.2.2 2 种反应体系 (H7 和 N9) 的配制：取 2 个 1.5ml 无核酸酶离心管，计算待测样本数量(n)，分别取 20  $\mu$ l  $\times$  (n+2) 反应液 (H7 和 N9)、0.5  $\mu$ l  $\times$  (n+2) DNA 聚合酶和 0.5  $\mu$ l  $\times$  (n+2) 逆转录酶充分混匀，离心 6000rpm 10 秒。

$n + 2 = n$  份样本+1 份阳性对照+1 份阴性对照；

### 2.3 反应体系分管：

每份待测样本设置 2 个 PCR 扩增管（H7 和 N9），分别  
将每种反应体系按 20  $\mu$  l/管分装至对应的 PCR 扩增管中。

### 2.4 加样：

每份待测样本 RNA、阳性对照、阴性对照以 5  $\mu$  l/管分  
别加入 2 个 PCR 扩增管中。

### 2.5 扩增检测：

将加样后的 PCR 扩增管分别转移到全自动荧光定量 PCR  
检测仪上进行扩增检测，不同仪器的设置如下：

2.5.1 全自动荧光定量 PCR 检测仪（RG3000、ABI Prism  
7500、ABI Prism 7000 型）扩增程序：

对于 ABI Prism 7500、ABI Prism 7000 型全自动荧光  
定量 PCR 检测仪，荧光信号设置为：Reporter Dye1: FAM、  
JOE/VIC, Quencher Dye1: NONE, Passive Reference: NONE。  
其他型号仪器可设置为 FAM 和 HEX 通道。荧光 PCR 扩增程序  
的设置见表 1。反应总体积为 25  $\mu$  l。

表 1. 荧光 PCR 扩增程序

步骤	反应温度	时间	是否采集光	循环数
逆转录及变性	50℃	30 分钟	否	1
	95℃	3 分钟	否	
预扩增	95℃	15 秒	否	5
	50℃	30 秒	否	
	72℃	1 分钟	否	

扩增及荧光收集	95℃	10 秒	否	40
	55℃	40 秒	是	

2.5.2 全自动荧光定量 PCR 仪（Roche LightCycler 系列）扩增程序：

选择 FAM、HEX 通道收集荧光。荧光 PCR 扩增程序见表 2。

表 2. 荧光 PCR 扩增程序

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光	循环数
逆转录及变性	50℃	30 分钟	否	1
	93℃	3 分钟	否	
预扩增	93℃	15 秒	否	5
	50℃	30 秒	否	
	72℃	1 分钟	否	
扩增及荧光收集	93℃	10 秒	否	40
	55℃	40 秒	是	

### 3. 结果分析：

3.1 本品 H7 荧光探针的报告荧光为 FAM，N9 荧光探针的报告荧光为 FAM，RNP 荧光探针的报告荧光为 HEX。所以应选择 FAM 通道和 HEX 通道分析试验结果。

3.2 基线（Baseline）范围根据仪器要求设定，目的为校正背景荧光干扰，终止循环（End）一般设置为最强样本出现扩增信号的前 3-4 个循环。

3.3 阈值线用于判断样本是否扩增，应调整使阈值线高于荧光背景和阴性对照的荧光信号，或点击分析（Analysis）自动获得。

### 4. 质量控制：

每次试验应设置阳性对照和阴性对照，且应符合以下要求，否则试验结果不成立。

4.1 阴性对照无 Ct 值或 Ct 值为 0。

4.2 阳性对照 Ct 值小于 30.0。

### 【参考值（参考范围）】

Ct 值 $\leq$ 37.0 报告该反应阳性；

无 Ct 值或 Ct 值为 0 报告该反应阴性；

37.0<Ct 值<40.0 为灰区；

内标 RNP 有效的范围为：0<Ct 值<33.0；

### 【检验结果的解释】

1. 在内标 RNP 结果成立的条件下各种判读模式如下：

反应液	模式 1	模式 2	模式 3	模式 4
H7	-	-	+	+
N9	-	+	-	+
RNP	+	+	+	+
结果判断	H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 阴性	H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 阴性	H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 阴性	H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 阳性

注：在内标 RNP 结果不成立的条件下视为检测异常，应重新采样检测。

2. 结果在灰区的样本需重复试验：取 200  $\mu$ l 样本重新提取 RNA（核酸分离试剂盒中裂解液、无水乙醇的用量加倍，其他组分的用量不变）并检测。复检结果 Ct<40.0 的样本为阳性，否则为阴性。

3. 内标 RNP 检测靶物质为正常人上皮细胞中广泛存在的核糖核酸酶 P（RNase P）的 mRNA，用于对样本中 RNA 的提取和扩增检测过程进行有效监控。

如果该份样本的 RNP 检测 Ct 值 $\geq$ 33.0，可能为以下原因：

3.1 未采集到足够的正常人上皮细胞，应重新采样。

- 3.2 核酸提取过程异常，导致 RNA 损失，应重新提取。
- 3.3 样本中存在 RT-PCR 抑制物质，可稀释后检测；

### **【检验方法的局限性】**

1. 样本中 RNA 浓度低于本产品的最低检出值（100copies/ml）时可能出现假阴性。

2. 目前研究显示，发病后两日内取样检测，病毒 RNA 检出率最高，随发病时间的延长，病毒被清除，病毒核酸的检出水平迅速下降。因此应在发病后尽早采样，必要时可采用多部位取样检测。临床评价应结合其他临床症状和实验室检测指标进行判断。

### **【产品性能指标】**

1. 本品可最低检出 100copies/ml 稀释物。
2. 本品对季节性流感（H1N1 以及 H3N2）灭活病毒、B 型流感灭活病毒、高致病性禽流感灭活病毒（H5N1）RNA 进行检测，结果为阴性。

### **【注意事项】**

1. 开始检测前请仔细阅读本说明书全文，并严格按照要求进行操作。
2. 实验室配置和试验操作请按照《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》和《临床基因扩增检验实验室工作规范》进行；整个检测过程应严格分区进行：PCR 反应体系的配置

区；标本处理、加样区；各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。

3. H7N9 亚型禽流感为经呼吸道传播疾病，应按照相关要求进行管理。样本的采集、处理、运输和保存均存在一定生物危害。样本的采集、运输和保存应按照乙类传染病进行管理；标本的提取必须在生物安全二级实验室的负压生物安全柜中完成；试验中接触过标准品和对照品的废弃物品（如吸头）、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。

4. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

5. 本产品仅用于体外诊断检测。

#### **【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. 《人感染 H7N9 禽流感诊疗方案（2013 年第 2 版）》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》（卫医发[2002]10 号）

#### **【生产企业】**

企业名称：北京金豪制药股份有限公司

生产地址：北京市北京经济技术开发区运成街 7 号

注册地址：北京市北京经济技术开发区运成街 7 号 1 号楼

邮政编码：100176



电话号码：010-67878866

传真号码：010-67881632

网 址：[www.kinghawk828.com](http://www.kinghawk828.com)

**【医疗器械生产企业许可证编号】**京药监械生产许  
20050017 号