



【产品名称】通用名称：H7N9 禽流感病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

英文名称：Detection Kit for Avian Influenza Virus Subtype H7N9 RNA (PCR-Fluorescence Probing)

【包装规格】大包装，48 反应/盒

### 【预期用途】

流感病毒可分为甲（A）、乙（B）、丙（C）三型。其中，甲型流感依据流感病毒血凝素蛋白（HA）的不同可分为 1-16 种亚型，根据病毒神经氨酸酶蛋白（NA）的不同可分为 1-9 种亚型，HA 不同亚型可以与 NA 的不同亚型相互组合形成不同的流感病毒。而禽类特别是水禽是所有这些流感病毒的自然宿主，H7N9 禽流感病毒是其中的一种。H7N9 流感病毒既可以感染禽类，也可以感染人。人感染 H7N9 禽流感会出现严重肺炎，症状包括发烧、咳嗽、呼吸困难等。

本试剂盒适用于检测呼吸道样本、血清、肺组织等样本中 H7N9 禽流感病毒 RNA，可用于该病毒感染的实验室诊断和宿主动物的监控。检测结果仅供研究，不用于临床诊断。

### 【检验原理】

本试剂盒基于实时荧光 PCR 技术，分别选取 H7N9 禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因保守区作为扩增靶区域，设计特异性引物探针，通过一步法实时荧光 PCR 体系扩增对 AIV H7N9 进行定性检测。反应体系中除特异性引物和特异性荧光探针外，还配以对应的 PCR 反应 Buffer、逆转录酶、Hot-Start Taq 酶、核苷酸单体（dNTPs）、 $Mg^{2+}$  等成分，可实现对 H7N9 禽流感病毒核酸灵敏特异地检测。

### 【主要组成成分】

组分名称	规格	数量
PCR 检测试剂	AIV H7 PCR 反应液 A	816 $\mu$ l/管
	AIV N9 PCR 反应液 A	816 $\mu$ l/管
	AIV H7N9 PCR 反应液 B	288 $\mu$ l/管
质控品	阴性质控品	200 $\mu$ l/管
	AIV H7N9 阳性质控品	200 $\mu$ l/管

【储存条件及有效期】保存于 $-20\pm 5^{\circ}C$ ，反复冻融次数 $<5$ 次，有效期 9 个月。

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

### 【样本要求】

- 1 适用样本类型：呼吸道样本、血清、肺组织。
- 2 样品采集、保存与运送。

标本采集、保存、运送请遵循《人感染 H7N9 禽流感病毒标本采集及实验室检测策略》。

### 【检验方法】

#### 1 核酸提取

建议取 200  $\mu$ l 液态样本进行核酸提取；组织样本可以研磨液进行提取操作。可采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒，请按照试剂盒说明书进行操作；也可选择其他合适的商业化产品。

本试剂盒中的阴性质控品参与提取，用于对环境进行监控；AIV H7N9 阳性质控品不参与提取，用于 PCR 检测试剂的质控。

#### 2 PCR 扩增（ABI 7500 仪器操作为例，ABI 7300、LC480 等仪器参照此操作及仪器操作手册）

##### 2.1 分别配制 AIV H7 RT-PCR 反应体系和 AIV N9 RT-PCR 反应体系

##### 2.1.1 AIV H7 RT-PCR 反应体系配制

取适量 PCR 反应管（按 AIV H7 反应体系计算）；每管加入 AIV H7 PCR 反应液 A 17 $\mu$ l、AIV H7N9 PCR 反应液 B 3 $\mu$ l（也可按照单个反应的用量，计算 PCR 反应液 A、B 各自所需总量，两者混匀后分装 20 $\mu$ l 于单个 PCR 反应管中）。

##### 2.1.2 AIV N9 RT-PCR 反应体系配制

取适量 PCR 反应管（按 AIV N9 反应体系计算）；每管加入 AIV N9 PCR 反应液 A 17 $\mu$ l、AIV H7N9 PCR 反应液 B 3 $\mu$ l（也可按照单个反应的用量，计算 PCR 反应液 A、B 各自所需总量，两者混匀后分装 20 $\mu$ l 于单个 PCR 反应管中）。

2.2 于上述 PCR 反应管中分别加入处理后的阴性质控品、AIV H7N9 阳性质控品、待测标本核酸各 5 $\mu$ l，8,000rpm 离心数秒，放入 PCR 扩增仪。

2.3 探针检测模式设置为：Reporter Dye: FAM, Quencher Dye: NONE, Passive Reference: NONE。反应条件设置为：50 $^{\circ}C$  15min, 1 个循环；95 $^{\circ}C$  15 分钟, 1 个循环；94 $^{\circ}C$  15 秒 $\rightarrow$ 58 $^{\circ}C$  45 秒（收集荧光），40 个循环。保存文件，运行。

### 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。

#### 【质量控制】

阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线或无 Ct 值显示；

阳性质控品：FAM 检测通道有明显扩增曲线，且 Ct 值 $\leq$ 32；

以上要求需在同一实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

#### 【结果判定】

1. 如果检测样品的 AIV H7 及 N9 RT-PCR 反应体系 FAM 检测通道均无扩增曲线或 Ct 值 $>$ 38，可判样品为 H7N9 禽流感病毒阴性；
2. 如果检测样品的 AIV H7 及 N9 RT-PCR 反应体系 FAM 检测通道均有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 38；可判样品为 H7N9 禽流感病毒阳性；
3. 如果检测样品的 AIV H7 或 N9 RT-PCR 反应体系仅其中之一的扩增曲线满足判为阳性的要求，则需重复检测；若重复检测结果为 H7 及 N9 均阳性，则判 H7N9 禽流感病毒阳性；若重复检测结果仍为 H7（或 N9）阳性，则只能判禽流感病毒 H7（或 N9）亚型阳性，并建议以其他方法做进一步确认。

#### 【检测方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关。
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. 病毒在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果。
4. 由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时核酸提取效率存在一定差异，本试剂盒推荐使用本公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法），用户可根据具体要求进行选择确认。
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】

根据产品分析性能评估结果，本试剂盒的分析灵敏度为  $1.0 \times 10^3$  copies/ml。与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体（甲型流感病毒 H3 亚型、甲型流感病毒 H1 亚型、乙型流感病毒、副流感病毒、禽流感 H5 亚型病毒、禽流感病毒 H9 亚型等）无交叉反应。

#### 【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%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器；
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《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【生产企业】企业名称：中山大学达安基因股份有限公司

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

邮 编：510665

电 话：020-32290789、8008304008

传 真：020-32068820

网 址：<http://www.daangene.com>

【医疗器械生产企业许可证编号】粤食药监械生产许 20040999 号

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准日期及修改日期】