

# H7N9 流感檢驗標準作業流程

2013 年 8 月 26 日第 2 版

## 壹、檢體種類

一、 咽喉拭子(throat swab)：檢驗禽流感病毒及病毒 RNA。

(一) 以 real-time RT-PCR 方法檢測病毒 RNA

1. A 型流感 (targeting M gene) 與 HA (H7) 亞型 (4 小時)

若此檢驗結果為陰性，判為陰性，若為陽性，則繼續進行  
以下 2 項檢驗。

2. NA 亞型 (4 小時)

3. 核酸序列分析 (2 天)

(二) 以培養方法檢測病毒 (7~14 天)

二、 血清：以血球凝集抑制試驗 (HI) 檢測抗體力價 (titer)。

(一) HI titer  $\geq 160$  判為陽性。

(二) 第一次採血後，隔 14~28 天後第二次採血清，若為 4 倍上升，  
則判為陽性。

## 貳、即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR，Roche 系統)

一、 試劑添加量 (以 Roche LightCycler 480 RNA Master  
Hydrolysis Probe 試劑為例)

(一) A/B 型流感病毒檢測

|                          |             |
|--------------------------|-------------|
| DEPC H <sub>2</sub> O    | 0.3μl       |
| senseA primer(10 μM)     | 1μl         |
| antisenseA primer(10 μM) | 1μl         |
| senseB primer(10 μM)     | 1μl         |
| antisenseB primer(10 μM) | 1μl         |
| FLUA probe (5 μM)        | 0.5μl       |
| FLUB probe (5 μM)        | 0.5μl       |
| Enzyme master mix        | 7.4μl       |
| Enhancer                 | 1μl         |
| Activator                | 1.3μl       |
| RNA sample               | 5μl         |
| <b>Total</b>             | <b>20μl</b> |

(二) H7N9 流感病毒檢測

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| DEPC H <sub>2</sub> O      | 0.3μl       |
| CNIC-H7F/N9 primer(10 μM)  | 2μl         |
| CNIC-H7R/N9R primer(10 μM) | 2μl         |
| CNIC-H7P/N9P probe(10 μM)  | 1μl         |
| Enzyme master mix          | 7.4μl       |
| Enhancer                   | 1μl         |
| Activator                  | 1.3μl       |
| RNA sample                 | 5μl         |
| <b>Total</b>               | <b>20μl</b> |

二、 Real-time RT-PCR 反應條件

(一) RT reaction : 63 °C , 3 mins 。

(二) Taq activation : 95 °C , 30 sec 。

(三) PCR reaction : 95 °C , 10 sec ; 58 °C , 30 sec ; 72 °C , 3 sec

( 45 replication cycles ) 。

### 參、病毒培養步驟（7~14 天）

- 一、人類病例檢體之病毒培養應在生物安全等級 BSL-3 之實驗室進行。
- 二、將檢體或病毒液 200  $\mu$ l 與 1 ml 病毒培養用細胞培養基（不含胎牛血清）充分混合，以 0.45  $\mu$ m 過濾膜過濾。
- 三、於 6 孔（6-well）接種盤取 200  $\mu$ l 過濾液接種至 MDCK 細胞株，培養 7~10 天，每日觀察細胞病變（CPE）。
- 四、若出現 CPE，以 3000 rpm 離心 15 分鐘收取病毒液，並於 -80°C 冷凍庫保存。

### 肆、血清抗體檢測步驟（3~6 天）

#### 一、血球凝集試驗（HA）

- （一）取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50  $\mu$ l 的 PBS 溶液，於第一列加入 100  $\mu$ l 的病毒抗原 H7N9 原液，negative control 行則以 100  $\mu$ L PBS 取代抗原。
- （二）取第一列的抗原 50  $\mu$ l 加入第二列，以微量吸管充分混合後，再取 50  $\mu$ l 加入第三列，如此序列稀釋至第八列，抗原呈現 2 倍至 128 倍稀釋。
- （三）每孔分別加入 50  $\mu$ l 的天竺鼠紅血球（0.75%），以手輕微搖

晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4°C 下靜置 30

—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

## 二、血球凝集抑制試驗 (HI)

(一) 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至

每 50  $\mu$ l 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。

(二) 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25  $\mu$ l 的 PBS 溶

液。於第一列加入 50  $\mu$ l 的 RDE 處理抗血清，negative control

行則以 25  $\mu$ l PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25  $\mu$ l 加入第

二列，以微量吸管充分混合後，再取 25  $\mu$ l 加入第三列，如此

序列稀釋至第八列。抗血清呈現 2 倍至 128 倍稀釋。抗血清

須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。

(三) 分別加入 25  $\mu$ l (8 HA unit/50  $\mu$ l) 的 H7N9 抗原，以手輕微搖

晃孔盤後，置於室溫下反應 10~15 分鐘。

(四) 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50  $\mu$ l/well，之後以

膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30~60 分鐘，之後記

錄抗血清力價結果。