

H7N9 流感檢驗標準作業流程

疾病管制局 2013 年 4 月 6 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) (4 小時)

若此檢驗結果為陰性，判為陰性結案，若為陽性，則

繼續進行以下 2 項檢驗。

2. HA 與 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)

DEPC H ₂ 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
Total	20μl

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 μl 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 μm 過濾膜過濾。
- 三、於 6 孔 (6-well) 接種盤取 200 μl 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 μ l 的 PBS 溶液，於第一列加入 100 μ l 的病毒抗原 H7N9 原液，negative control 行則以 100 μ l PBS 取代抗原。

(二) 取第一列的抗原 50 μ l 加入第二列，以微量吸管充分混合後，再取 50 μ 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 μ 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 μ 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 μ l 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 μ l 的 RDE 處理抗血清，negative control

行則以 25 μ l PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 μ l 加入第二列，以微量吸管充分混合後，再取 25 μ 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 μ l (8 HA unit/50 μ 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 μ l/well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4 $^{\circ}$ C 下靜置 30~60 分鐘，之後記錄抗血清力價結果。