

非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒三重实时荧光 PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

本试剂盒采用探针法多重实时荧光 RT-PCR 方法检测猪全血、血清、淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃体、排泄物、口鼻拭子及细胞培养物等样品中非洲猪瘟病毒（ASFV）的 DNA、猪瘟病毒（CSFV）的 RNA、猪伪狂犬病毒（PRV）的 DNA，适用于非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的检测。AD-011-0 为普通探针法检测试剂盒；AD-011-1 为防污染体系检测试剂盒，添加 dUTP 和 UNG 酶可有效减少气溶胶等的污染，降低假阳性风险。

【原理】

提取样品 DNA/RNA 作为模板，通过实时荧光定量 RT-PCR 检测三种不同标记的特异荧光探针信号，判定样品中是否存在非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒的核酸。

【试剂盒组成】

组成	100 头份	贮藏条件
反转录酶混合液	110 μ L	-20 $^{\circ}$ C
阴性对照（无核酸酶水）	1 mL	
阳性对照	20 μ L	
PCR 反应液	900 μ L	
荧光探针	650 μ L	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

- 试剂：**核酸提取试剂。
- 仪器：**离心机、四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20 $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器（2 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
- 耗材：**荧光 PCR 反应管、吸头（10 μ L、200 μ L、1000 μ L）。

【使用注意事项】

- 建议与源微生物提供的柱式或磁珠法病毒核酸提取试剂盒配套使用。
- 所有接触病料的物品均应合理处置，以免污染实验室。
- PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区；流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区；严禁器材和试剂倒流。
- 所有试剂应在规定条件下储存，冻存的试剂使用前应完全融化、混匀，瞬时离心 15 s，使液体全部沉于管底，放于冰盒中，吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取，使用后立即放回 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

- 注意防止试剂盒各组分污染。
- 严格遵守操作说明，操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制，整个实验过程严格控制污染。
- 避免反复冻融试剂降低检测灵敏度，本试剂盒应尽量在 3 次内用完。

【样品采集】

组织样品：按规范采集淋巴结、脾脏、肾脏及脑组织等样品约 3 cm×3 cm 大小，骨髓样品长度约 3 cm，扁桃体整体采集。

液体样品：按规范采集无菌抗凝血或血清 5 mL，口鼻拭子保存液样品 3 mL。

细胞培养物样品：反复冻融 3 次后第 3 次解冻后保存备用。

【样品处理】

组织样品：取适当大小的样品放入研磨管中，按 1:5 倍体积加入 DEPC 水，使用研磨仪等充分研磨，制成组织匀浆液，400×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。

抗凝血、血清或口鼻拭子保存液等液体样本：无需特殊处理直接取 200 μL 进行核酸提取。

细胞培养物：1500×g 4 °C 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。

【核酸提取】

采用离心柱法或者磁珠法病毒核酸提取试剂盒等提取样品中的核酸，低温保存、待检建议每次提取做一个阳性样品和阴性样品的提取对照。

【实时荧光 PCR 操作】

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N，则反应体系配制如下：

试剂	体系
无菌无核酸酶水	3× (N+1) μL
反转录酶混合液	1× (N+1) μL
PCR 反应液	8× (N+1) μL
引物、荧光探针混合液	6× (N+1) μL

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 18 μL。

取 2 μL 模板 DNA/RNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：反转录 50 °C 5 min，预变性 95 °C 2 min；循环 95 °C 10 s，58 °C 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（58 °C 35 s）收集荧光信号（报告基团“FAM、HEX、Cy5”，淬灭基团“None”）。防污染体系在反转录步骤（50 °C 5 min）之前进行消化步骤 25 °C 5 min。

【结果判定】

1. 结果分析条件设定

阈值设定原则：仪器自动生成，或者根据具体扩增曲线或仪器噪音情况进行适当调整。

2. 试验成立条件

阳性对照三种通道的 Ct 值均 < 35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照均无 Ct 值或者 Ct 值 ≥ 35 且无特异性扩增曲线，判为试验有效。试验无效时应仔细检查试剂或操作后重新进行试验。

3. 结果描述及判定

P72 基因（FAM 通道）被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因阳性，样本中存在非洲猪瘟病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因阴性，样本中不存在非洲猪瘟病毒核酸； $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为 ASFV P72 基因疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 <40 判为阳性，否则判为阴性。

HEX 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为 CSFV 阳性，样本中存在猪瘟病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 CSFV 阴性，样本中不存在猪瘟病毒核酸； $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为 CSFV 疑似，对疑似样品，需重新取样提取 RNA，进行复检，Ct 值 <40 判为阳性，否则判为阴性。

gH 基因（Cy5 通道）被检样品 Ct 值 <37 并出现特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因阳性，样本中存在猪伪狂犬病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因阴性，样本中不存在猪伪狂犬病毒核酸； $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为 PRV gH 基因疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 <40 判为阳性，否则判为阴性。

综合判定结果见下表

综合判定结果	检测结果		
	CSFV-FAM	CSFV-HEX	PRV-Cy5
样本中三种病毒核酸阳性	+	+	+
CSFV、PRV 核酸阳性	—	+	+
ASFV、PRV 核酸阳性	+	—	+
ASFV、CSFV 核酸阳性	+	+	—
ASFV 核酸阳性	+	—	—
CSFV 核酸阳性	—	+	—
PRV 核酸阳性	—	—	+
三种病毒核酸阴性、试剂失效或操作失误	—	—	—

注：“+”代表检测阳性；“—”代表检测阴性。

【规格】100 头份/盒

【保存及有效期】于-20℃以下保存，有效期为 12 个月。