

猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 Delta 冠状病毒多重实时荧光 RT-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 方法检测母猪乳汁、排泄物、肛门拭子等样品中猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪 Delta 冠状病毒 (PDCoV) 的 RNA, 适用于猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪轮状病毒的检测。

【原理】

根据猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 Delta 冠状病毒的基因特异片段分别设计引物及荧光探针 (PDEV-FAM、TGEV-Cy5、PDCoV-ROX), 同时在猪基因特异片段上设计内质控引物及 HEX 荧光探针, 以样品核酸作为模板, 在同一反应管内进行三种目的基因和内质控基因的多重 RT-PCR 检测。扩增试剂中添加 dUTP 和温度敏感型 UNG 酶可有效减少气溶胶等的污染, 降低假阳性风险。

【试剂盒组成】

组成	100 头份	贮藏条件
阴性对照 (ddH ₂ O)	1 mL	-20℃
阳性对照 (PTC)	20 µL	
20×反转录酶混合液 (酶 Mix)	110 µL	
2.5×PTD qPCR 反应液 ^{*1} (qMix)	850 µL	
2.5×PTD 引物及探针混合液 ^{*2} (引物 Mix)	850 µL	
说明书	1 份	

*1: PTD 为猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 Delta 冠状病毒英文简称 PEDV、TGEV、PDCoV 字母缩略而来。

*2: 该引物及探针混合液中包含猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪 Delta 冠状病毒和猪源内质控的引物、探针等, 该混合液使用及保存时请尽量避免光。

【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℃冰箱、可调移液器 (2.5 µL、10 µL、20 µL、200 µL、1000 µL)。
- **耗材:** 荧光 PCR 反应管、吸头 (10 µL、200 µL、1000 µL)。

【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, 使用后应立即放回 -20℃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, 一个月内频繁使用可将试剂盒暂存于 4℃。

【样品采集】

- **组织样品:** 按规范采集粪便或死亡仔猪肠道组织等样品。
- **液体样品:** 按规范采集无菌母猪乳汁 3 mL。
- **拭子样本:** 按规范采集肛门拭子。

【样品处理】

- **组织样品:** 用无菌剪刀剪取约 0.5cm×0.5cm 充血、出血、肠壁变薄、含多量水样粪便等病变明显的小肠组织, 加入 0.8ml-1.0ml 的 PBS 混匀, 组

织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨，将组织混悬液转入无菌 EP 管中，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 离心 5 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。

- **肛门拭子样品：**将肛门拭子放在盛有 0.8ml 灭菌 PBS 的无菌 EP 管中，涡旋振荡 10min，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。
- **液体样品：**将乳汁转移到无菌 EP 管中，反复冻融两次，4℃条件下 14600×g 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
20×反转录酶混合液	1× (N+1) μL
2.5×PTD qPCR 反应液	8× (N+1) μL
2.5×PTD 引物及探针混合液	8× (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 17 μL。取 3 μL 模板，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：UNG 酶消化 25 °C 5 min，反转录 55 °C 5 min，预变性 95 °C 2 min；循环 95 °C 5 s，60 °C 30 s，共 40 次，每次循环的第二步（60 °C 30 s）收集荧光信号（报告基团“PEDV-FAM、IC-HEX、PDCoV-ROX、TGEV-Cy5”，淬灭基团“None”）。

【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

阳性对照四种通道的 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

FAM 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 PEDV 阳性，样本中存在猪流行性腹泻病毒核酸；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 PEDV 阴性，样本中不存在猪流行性腹泻病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 PEDV 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。

ROX 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 PDCoV 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 PDCoV 阴性，样本中不存在猪瘟病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 PDCoV 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。

Cy5 通道被检样品 Ct 值<35 并出现特异的扩增曲线，判为 TGEV 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 TGEV 阴性，样本中不存在猪伪狂犬病毒核酸；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 TGEV 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 通道为内质控通道，通常检测结果为 Ct 值<35 出现特异的扩增曲线，判为阳性，但当目标检测病毒核酸浓度较高时，存在由于反应体系内部竞争导致 HEX 通道检测结果为阴性的可能。

综合判定结果见下表

综合判定结果	检测结果			
	PEDV-FAM	IC-HEX	PDCoV-ROX	TGEV-Cy5
PEDV 核酸阳性	+	+/-	-	-
TGEV 核酸阳性	-	+/-	-	+
PDCoV 核酸阳性	-	+/-	+	-
PEDV、PDCoV 核酸阳性	+	+/-	+	-
TGEV、PDCoV 核酸阳性	-	+/-	+	+
PEDV、TGEV 核酸阳性	+	+/-	-	+

三种病毒核酸阳性	+	+/-	+	+
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。