

犬瘟热病毒（CDV）、犬副流感病毒（CPIV）多重荧光 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 方法检测犬类的唾液、口鼻分泌物拭子及死亡犬肺、扁桃体等样品中犬瘟热病毒（CDV）、犬副流感病毒（CPIV）的 RNA，适用于犬瘟热病毒（CDV）、犬副流感病毒（CPIV）的检测。

【原理】

根据犬瘟热病毒（CDV）、犬副流感病毒（CPIV）的基因特异片段分别设计引物及荧光探针（CPIV-FAM、CDV-Cy5），同时在犬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两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×qPCR 反应液（qMix）	850 μL	
2.5×引物及探针混合液*1（引物 Mix）	850 μL	
说明书	1 份	

*1：该引物及探针混合液中包含犬瘟热病毒（CDV）、犬副流感病毒（CPIV）和犬源内质控的引物、探针等，该混合液使用及保存时请尽量避光。

【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】

- **分泌物样品：**按规范采集唾液、口鼻分泌物拭子等。
- **组织样品：**按规范采集死亡犬肺组织等。

【样品处理】

- **唾液：**直接取 200 μL 进行核酸提取。
- **拭子：**将拭子放在盛有 0.8 mL 灭菌 PBS 的无菌 EP 管中，涡旋振荡 5 min，4℃条件下 15000×g 离心 5 min，取上清液 200 μL 进行核酸提取。
- **组织样品：**用无菌剪刀剪取 20-50mg 病变明显的组织样本，加入 0.8 -1.0 mL 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 15000×g 离心 5 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×qPCR 反应液	8×(N+1) μL
2.5×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 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：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“CPIV-FAM、IC-HEX、CDV-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 CPIV 阳性，样本中存在犬副流感病毒；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 CPIV 阴性，样本中不存在犬副流感病毒；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 CPIV 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 CDV 阳性，样本中存在犬瘟热病毒；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 CDV 阴性，样本中不存在犬瘟热病毒；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 CDV 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。

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		
	CPIV-FAM	CDV-Cy5	IC-HEX
CDV 核酸阳性	-	+	+/-
CPIV 核酸阳性	+	-	+/-
两种病毒核酸阳性	+	+	+/-
两种病毒核酸阴性	-	-	+
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。