

犬细小病毒(CPV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【产品名称】

商品名称：犬细小病毒(CPV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

Name: Canine Parvovirus Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】25T/盒、50T/盒

【预期用途】

犬细小病毒 (Canine Parvovirus, CPV) 可引起犬的剧烈呕吐、出血性肠炎、脱水、白细胞减少和心肌炎等症。临床上犬细小病毒病可分为肠炎型和心肌炎型，对犬造成很大危害。CPV 有 3 种亚型，主要是在 VP2 蛋白上有基因差异，即 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c。感染 CPV 的犬主要通过粪便向外排毒，因此粪便是犬间传递感染的主要传染源。CPV 常规检测方法主要有病毒分离鉴定、血凝和血凝抑制试验、ELISA 和 PCR 等方法。PCR 法灵敏度高、特异性强、操作简单，已被广泛用于 CPV 诊断。

本试剂盒适用于检测样本中的犬细小病毒，用于犬细小病毒感染的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用 TaqMan 探针法实时荧光 PCR 技术，设计一对犬细小病毒特异性引物，结合一条特异性探针，用荧光 PCR 技术对犬细小病毒的 DNA 进行体外扩增检测，用于临床上对可疑感染病料的病原学诊断。

【试剂组成】

包装规格	25T/盒	50T/盒
CPV 反应液	500 μ L \times 1 管	500 μ L \times 2 管
酶液	25 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CPV 阳性质控品	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
阴性质控品	250 μ L \times 1 管	250 μ L \times 1 管
CPV 阳性标准品 (1.92 \times 10 ⁸ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CPV 阳性标准品 (1.92 \times 10 ⁷ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CPV 阳性标准品 (1.92 \times 10 ⁶ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CPV 阳性标准品 (1.92 \times 10 ⁵ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件及有效期】

-20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C，避光保存、运输、反复冻融次数不超过 5 次，有效期 12 个月。

【适用仪器】

ABI7500、安捷伦 MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf 等系列荧光定量 PCR 检测仪。

【标本采集】

病死犬可采集淋巴结、脾、肺、等组织；活犬可采集血液、血清、粪便等。

【保存和运输】

采集或处理好的样品在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 条件下保存应不超过 24 h；若需长期保存，应放置 -70 $^{\circ}$ C 以下保存，冻融不超过 3 次。

【使用方法】

1. 样品处理（样本处理区）

1.1 样本前处理

组织样品：每份组织分别从 3 个不同的位置称取样品约 1g，手术剪剪碎混匀后取 0.5g 于研磨器中研磨，加入 1.5mL 生理盐水后继续研磨，待匀浆后转至 1.5mL 灭菌离心管中，8000rpm 离心 2min，取上清液 100 μ L 于 1.5mL 灭菌离心管中；咽拭子样品直接取 100 μ L 于 1.5mL 灭菌离心管中。

1.2 核酸提取

推荐采用上海将来实业股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（磁珠法或离心柱法）进行核酸提取，请按照试剂说明书进行操作。

2. 试剂配制（试剂准备区）

根据待检测样本总数，设所需要的 PCR 反应管数为 N(N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照；样品每满 10 份，多配制 1 份)，每测试反应体系配制如下表：

试剂	CPV 反应液	酶液
用量（样本数为 N）	19 μ L	1 μ L

将混合好的测试反应液分装到 PCR 反应管中，20 μ L/管。

3. 加样（样本处理区）

将步骤 1 提取的核酸、阳性质控品、阴性质控品各取 5 μ L，分别加入相应的反应管中，盖好管盖，混匀，短暂离心。

4. PCR 扩增（核酸扩增区）

4.1 将待检测反应管置于荧光定量 PCR 仪反应槽内；

4.2 设置好通道、样品信息，反应体系设置为 25 μ L；

荧光通道选择：检测通道（Reporter Dye）FAM，淬灭通道（Quencher Dye）NONE，ABI 系列仪器请勿选择 ROX 参比荧光，选择 None 即可。

4.3 推荐循环参数设置：

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	95 $^{\circ}$ C	2min	否
2	45 cycles	95 $^{\circ}$ C	15sec	否
		60 $^{\circ}$ C	30sec	是

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定（请参照各仪器使用说明书进行设置，以分析 ABI7500 仪器为例）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可设在 3~15、End 值可设在 5~20，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analyze 自动获得分析结果。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性质控品：用作阴性质控。无特异性扩增曲线或无 Ct 值显示；

5.2.2 阳性质控品：扩增曲线有明显指数增长期，且 Ct 值 ≤ 32 ；

5.2.3 阳性标准品：用作标准曲线的绘制。FAM 通道有 S 型曲线，标准品线性相关系数 $|R|(r) \geq 0.98$ 。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

6. 检验结果的解释

在满足质量控制的条件下，待检样本检测结果 Ct 值为“Undet”或核酸含量显示 $< 1 \times 10^3$ copies/mL，报告“低于试剂盒最低检测限 (1×10^3 copies/mL)”；核酸含量在 1×10^3 copies/mL ~ 1×10^8 copies/mL 之间的样本，直接报告测定数值；核酸含量高于 1×10^8 copies/mL 的样本，建议用 $1 \times TE$ 稀释后重新测定，结果根据稀释倍数进行校准，报告校准后的值，并注明“可报告浓度”。

7. 检测方法的局限性

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关；
2. 样本提取过程中没有控制好交叉污染，会出现假阳性结果；
3. 阳性对照、扩增产物泄漏，会导致假阳性结果；
4. 病原体在流行过程中基因突变、重组，会导致假阴性结果；
5. 不同的提取方法存在提取效率差异，会导致假阴性结果；
6. 试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性或定量检测不准确的结果；
7. 本检测结果仅供参考，如须确诊请结合临床症状以及其他检测手段。

【注意事项】

1. 所有操作严格按照说明书进行；
2. 试剂盒内各种组分使用前应自然融化，完全混匀并短暂离心；
3. 反应液应避免光保存；
4. 反应中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧；
5. 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服；
6. 样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行，以免交叉污染；
7. 实验完毕后用 10% 次氯酸或 75% 酒精或紫外灯处理工作台和移液器；
8. 试剂盒内所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【参考文献】

[1] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 27533-2011 犬细小诊断技术[S].