

狂犬病毒 (RV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【产品名称】

通用名称: 狂犬病毒 (RV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

Name: Rabies Virus Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】 25T/盒、50T/盒

【预期用途】

狂犬病是由狂犬病病毒 (Rabies Virus, RV) 引起的一种急性、接触性人兽共患传染病。病原体为弹状病毒科狂犬病毒属 RNA 病毒。该病主要是通过被患病或带毒的动物咬伤传染所致, 其病死率高达 100%^[1]。

本试剂盒适用于检测的犬脑组织、唾液等标本中狂犬病毒 RNA, 适用于狂犬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, 设计一对狂犬病病毒特异性引物^[2], 结合一条特异性探针, 用荧光 PCR 技术对狂犬病病毒的 RNA 进行体外扩增检测, 用于临床上对可疑感染者的病原学诊断。

【试剂组成】

| 包装规格 | 25T/盒 | 50T/盒 |
|----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| RV 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 |
| RV 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 |
| RV 阳性标准品 (1.72 \times 10 ⁸ copies/mL) | 50 μ L \times 1 管 | 50 μ L \times 1 管 |
| RV 阳性标准品 (1.72 \times 10 ⁷ copies/mL) | 50 μ L \times 1 管 | 50 μ L \times 1 管 |
| RV 阳性标准品 (1.72 \times 10 ⁶ copies/mL) | 50 μ L \times 1 管 | 50 μ L \times 1 管 |
| RV 阳性标准品 (1.72 \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 \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】

ABI、Agilent Stratagene MX、Roche LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf 等系列荧光定量 PCR 检测仪。

【标本采集】

对大动物 (如犬、猫、牛等) 脑组织标本的采集使用快速采样法, 即用塑料管从头部枕骨大孔或能看见脑组织的位置向眼眶处斜插 (或用粗穿刺针从眼眶向头部枕骨大孔处斜插), 然后阻断塑料管尾部与外界大气压强连通, 迅速将塑料管拔出。尽量使塑料管通过大脑、中脑和小脑部位, 取出的塑料管中应有脑组织, 将脑组织标本放入无菌离心管中。唾液: 用唾液采集器或棉拭子收集唾液于无菌离心管中。

【保存和运输】

上述标本短期内可保存于-20 $^{\circ}$ C, 长期保存可置-70 $^{\circ}$ C, 但不能超过 6 个月, 标本运送应采用 2~8 $^{\circ}$ C 冰袋运输, 严禁反复冻融。

【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 | RV 反应液 | 酶液 |
|-------------|------------|-----------|
| 用量 (样本数为 N) | 20 μ L | 1 μ L |

将混合好的测试反应液分装到 PCR 反应管中, 21 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 4 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 | 42 $^{\circ}$ C | 20min | 否 |
| 2 | 1 cycle | 95 $^{\circ}$ C | 10min | 否 |
| 3 | 40 cycles | 94 $^{\circ}$ C | 15sec | 否 |
| | | 55 $^{\circ}$ C | 30sec | 是 |

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定

设置 Baseline 和 Threshold：一般直接按机器自动分析的结果分析，当曲线出现整体倾斜时，根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值（一般可在 3~15 范围内调节）、stop 值（一般可在 5~20 范围内调节），以及 Threshold 的 Value 值（上下拖动阈值线至高于阴性对照），重新分析结果。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性质控品：用作阴性质控。FAM 通道无 S 型曲线，在 Reports 界面 Ct 一栏显示 Undet.；

5.2.2 阳性质控品：扩增曲线有明显指数生长期，且 Ct 值 \leq 32；以上条件应同时满足，否则实验视为无效；

5.2.2 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. 试剂盒里所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生行业标准. WS281-2008 狂犬病诊断标准[S]. 人民卫生出版社.
- [2] 丁晓东，史子学，江禹，等. 狂犬病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[S]. 内蒙古民族大学, 2007.