

甲型流感病毒 (IAV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【产品名称】

商品名称：甲型流感病毒 (IAV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

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

【包装规格】25T/盒、50T/盒

【预期用途】

甲型流感是由甲型流感病毒(AIV)引起的一种禽类传染病，鸡、火鸡、鸭和鹌鹑等家禽均可感染，发病情况差别较大，有的出现急性死亡，有的无症状带毒。水禽是 AIV 的自然宿主，也是流感病毒的天然基因库，几乎所有亚型的流感病毒都可以在水禽中分离到^[1]。在世界范围内，家禽中流行的主要有 H5、H6、H7、H9 等亚型。H5 和 H7 亚型的某些毒株可以造成禽类很高的发病率和死亡率，被称为高致病性甲型流感(HPAI)病毒。OIE 将高致病性甲型流感列为 A 类动物疫病，我国也将其列为一类动物疫病^[2-3]。

本试剂盒利用实时荧光 PCR 原理，检测甲型流感病毒，对甲型流感诊断有重要指导意义。

【检验原理】

本试剂盒针对甲型流感病毒 M 基因高度保守区域设计特异性引物和探针，在反应体系中含甲型流感病毒基因组模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性、定量分析。

【试剂组成】

包装规格	25T/盒	50T/盒
IAV 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
IAV 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

注：1) 不同批号试剂不能混用。

2) 试剂盒内各试剂组份足够包装规格所标示的检测次数。

【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】

病死或扑杀动物，取喉气管、脑、胸肌、心肌和肺等组织；待检活动物，用棉拭子取呼吸道分泌物或排泄物，置于 1mL 50%甘油生理盐水中。

【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

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；棉拭子直接取 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；反应管数每满 10 份，多配制 1 份)，每测试反应体系配制如下表：

试剂	IAV 反应液	酶液
用量	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	1cycle	50 $^{\circ}$ C	10min	否
2	1 cycle	95 $^{\circ}$ C	2min	否
3	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 结果判断

阳性：检测通道 Ct 值 \leq 40，且曲线有明显的指数增长曲线；

阴性：样本检测结果 Ct 值 $>$ 40 或无 Ct 值。

5.3 质控标准

阴性质控品：无特异性扩增曲线或无 Ct 值显示；

阳性质控品：扩增曲线有明显指数增长期，且 Ct 值 \leq 32；

以上条件应同时满足，否则实验视为无效。

6. 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《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【参考文献】

- [1] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(1): 152-179.
- [2] Shortridge K. Avian influenza A viruses of southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man [J]. Bulletin of the World Health Organization, 1982, 60(1): 129.
- [3] 张焯, 舒跃龙. 2004-2012 年我国甲型流感流行情况 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(3): 239-240.