

## 犬细小病毒（CPV）、犬冠状（CCoV）、犬瘟热病毒（CDV）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、尿液、粪便、粪/肛拭子及死亡犬肠道组织等样品中犬细小病毒（CPV）的 DNA，犬冠状病毒（CCoV）、犬瘟热病毒（CDV）的 RNA，适用于犬细小病毒（CPV）、犬冠状病毒（CCoV）、犬瘟热病毒（CDV）的检测。

#### 【原理】

根据犬细小病毒（CPV）、犬冠状病毒（CCoV）、犬瘟热病毒（CDV）的基因特异片段分别设计引物及荧光探针（CPV-FAM、CCoV-ROX、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 <sub>2</sub> 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包括犬细小病毒（CPV）、犬冠状病毒（CCoV）、犬瘟热病毒（CDV）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；流程顺序为分配液区→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。
- 反应体系应在特定分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/排泄物样品：**按规范采集唾液、尿液、粪便等。
- **拭子样品：**按规范采集粪/肛拭子。
- **组织样品：**按规范采集死亡犬肠道组织等样品。

#### 【样品处理】

- **唾液样品：**唾液直接取 200 μL 进行核酸提取。
- **尿液样品：**取 2 mL 尿液 15000×g 离心 5 min，弃 1.8 mL 上清后进行核酸提取。

- **粪便、粪/肛拭子样品：**将 0.1-0.5 g 粪便或拭子放在盛有 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：**用无菌剪刀剪取约 0.5 cm×0.5 cm 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 0.8-1.0 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 DNA/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℃ 5 min，反转录 55℃ 5 min，预变性 95℃ 2 min；循环 95℃ 5 s，60℃ 30 s，共 40 次，每次循环的第二步（60℃ 30 s）收集荧光信号（报告基团“CPV-FAM、IC-HEX、CCoV-ROX、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 CPV 阳性，样本中存在犬细小病毒；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 CPV 阴性，样本中不存在犬细小病毒；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 CPV 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 CCoV 阳性，样本中存在犬冠状病毒；无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为 CCoV 阴性，样本中不存在犬冠状病毒；35≤Ct 值<40 并出现特异的扩增曲线，判为 CCoV 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			
	CPV-FAM	CCoV-ROX	CDV-Cy5	IC-HEX
CPV 核酸阳性	+	-	-	+/-
CCoV 核酸阳性	-	+	-	+/-
CDV 核酸阳性	-	-	+	+/-
CPV、CCoV 核酸阳性	+	+	-	+/-
CPV、CDV 核酸阳性	+	-	+	+/-
CCoV、CDV 核酸阳性	-	+	+	+/-

三种病毒核酸阳性	+	+	+	+/-
三种病毒核酸阴性	-	-	-	+
核酸提取失败、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。