口蹄疫通用型荧光PCR检测试剂盒（实时荧光PCR法）

使用说明书

【产品名称】

通用名称：口蹄疫通用型荧光PCR检测试剂盒（实时荧光PCR法）

英文名称：Foot and Mouth Disease Virus Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】50T/盒

【预期用途】

口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease Virus，FMDV) 属于小RNA病毒科，口蹄疫病毒属，主要侵害偶蹄兽，有O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3和Asia-I七个血清型。口蹄疫发病以发热、口腔黏膜及蹄部和乳房皮肤发生水泡和溃烂为特征，是国际兽疫局规定的A类传染病，易通过空气传播，传染性强，流行迅速，偶尔感染人。由于口蹄疫传播迅速、难于防治、补救措施少，被称为畜牧业的“头号杀手”。

本试剂盒利用实时荧光PCR原理，定性检测口蹄疫通用型病毒，对FMDV引起的偶蹄兽类病的诊断和监控具有重要指导意义。

【原　　理】

本试剂盒针对口蹄疫病毒通用型的高度保守区域设计特异性引物和探针，在反应体系中含口蹄疫病毒通用型基因组模板的情况下，PCR反应得以进行并释放荧光信号。利用荧光定量PCR仪对PCR过程中相应通道信号进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

【试剂盒组成】

序号	组成	50T/盒
1	FMDV　RT-PCR反应液	875 μL×1管
2	FMDV 混合酶液	125 μL×1管
3	FMDV 阳性对照	40 μL×1管
4	FMDV 阴性对照	40 μL×1管
5	说明书	1份

注：阴性对照为灭菌纯水，阳性对照为含口蹄疫病毒靶基因的质粒。

【储存条件及有效期】避光-20℃以下保存，避免反复冻融，有效期12个月。

【适用仪器】ABI 系列、Bio-Rad系列、Agilent Stratagene MX系列、Roche LightCycler R480、Cepheid SmartCycler、Rotor-Gene系列、杭州博日系列等多通道实时荧光定量PCR仪。

【样本要求】

1.新鲜采集的咽拭子、疱疹液和粪便标本，并使用灭菌生理盐水悬浮。

2.应避免标本间交叉污染。

3.标本收集后可立即检测；若不能立即检测，可置于2～8℃冷藏过夜保存；如需长期保存，标本应冻存于-80℃以下，避免反复冻融。

【检验方法】

1.试剂准备（试剂准备区）

（1）从冰箱中取出试剂盒，从试剂盒中取出实验所需试剂，充分融化混匀并瞬时离心以去除管壁附着液体。

（2）核算当次实验所需要的反应数（n），并根据如下表所示反应体系计算当次实验所需要的各种试剂量。

n =阴性对照数（1T）+阳性对照数（1T）+误差预留量（1T）+样本数

单反液配制表	RT-PCR反应液	17.5 μL
	混合酶	2.5 μL

（3）在无菌离心管中加入上述试剂，充分混匀后瞬时离心。按照20 μL/管分装量将试剂分装至PCR反应管。

2.样本准备（样本处理区）

用QIAGEN、Roche公司RNA提取试剂盒提取RNA，具体操作按照其试剂盒说明书操作。

3.加样

在上述制备好的PCR反应样本管中分别加入处理好的待测标本RNA各5 μl、终体积25 μl/管，盖好PCR反应盖混匀后瞬时低速离心，转移到PCR仪器上。阴性对照和阳性对照管则各加5 μL试剂盒自带的阴性对照或阳性对照品，终体积为25 μl/管，盖

好 PCR 反应盖混匀后瞬时低速离心，转移到 PCR 仪器上。

4.PCR（PCR 扩增区）

（1）取样本处理区准备好的 PCR 反应管，放置在实时荧光定量 PCR 仪样品槽相应位置，并记录放置顺序。

（2）按下表设置仪器核酸扩增相关参数进行 PCR 扩增。

反应体积	25 μL	**通道选择**	FAM 通道采集 FMDV 病毒荧光信号
PCR 反应条件	**步骤**	**条件**	**循环数**
	反转录	50℃：10 分钟（min）	1
	预变性	95℃：3 分钟（min）	1
	PCR 扩增	95℃：5 秒（s）	40
		55℃：40 秒（s） （此阶段结束时采集荧光信号）	

注：ABI 系列荧光 PCR 仪在设置时不选 ROX 校正，设置淬灭基团选择 None。

【参考值（参考范围）】

1.试剂盒有效性判定：

（1）阳性对照：有典型 S 型扩增曲线或 Ct 值≤35。

（2）阴性对照：Ct 值＞38 或无 Ct 值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期。

2.标本结果判定：

（1）阳性：标本检测结果 Ct 值≤35 或有明显指数增长期。

（2）可疑：标本检测结果 Ct 值在 35～38 范围内。此时应对标本进行重复检测，如重复实验结果 Ct 值仍在 35～38 范围内，有明显指数增长期，则判定为阳性，否则为阴性。

（3）阴性：标本检测结果 Ct 值＞38 或无 Ct 值。

【检验结果的解释】

通道及检测结果	**标本检测结果解释**
FAM	
＋	标本中检出 FMDV 病毒 RNA
－	标本中未检出 FMDV 病毒 RNA

【检验方法的局限性】

1.当检测样本中被检核酸浓度低于本试剂盒的最低检出限时可能会发生假阴性的结果。

2.被检样本在采集、运输、储存以及处理过程中操作方式不当容易造成 RNA 降解而产生假阴性结果。

3.样本在采集、运输、储存以及处理过程中发生交叉污染，则容易得到假阳性结果。

【产品性能指标】 产品的最低检出限为 10^3 Copies/mL，产品 CV 值≤3%。

【注意事项】

1.使用本试剂盒的实验室，应严格按照国家有关部分颁布的有关基因扩增检验实验室管理规范进行管理；

2.为避免 RNA 降解，样本处理过程应在 0-4℃条件下操作，且完成实验后立即上机检测；样本处理过程中使用的器具耗材应经过无核酶处理；

3.各区域物品均为专用，不得交叉使用，以免污染；检测结束后，应立即对工作台清洁；

4.吸取反应液时，应尽量避免产生气泡；上 PCR 仪前，应注意检查各反应管是否盖紧，以免液体蒸发造成结果不准确；

5.试剂盒所有试剂在使用前应该在常温下充分融化混匀，并应瞬时离心；

6.试剂盒内所配阴性和阳性对照在第一次使用前应全部转移至标本准备区，并单独存放；

7.为防止荧光干扰，应避免裸手直接接触 PCR 反应管，并应避免在 PCR 反应管上进行任何标记；

8.检测过程中使用过的吸头，应直接打到盛有 10%次氯酸的废物缸内，检测结束的 PCR 反应管，切忌开盖，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃；工作台及各种实验用品应定期用 10%次氯酸、75%酒精或紫外灯进行消毒；

9.仪器扩增相关参数应按照本说明书相关要求进行设置；不同批号试剂不能混用；并在有效期内使。