禽流感病毒 H5 和 H7 亚型多联快速实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒使用说明书

【用途】

用于禽组织、分泌物、排泄物及尿囊液中禽流感病毒 H5（AIV-H5）和 H7 亚型（AIV-H7）的 RNA，适用于 AIV-H5 和 AIV-H7 的检测、诊断和流行病学调查。

【检测原理】

利用离心柱内玻璃纤维滤膜提取样品病原 RNA，在高效反转录酶的作用下，以 RNA 为模板，以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在热启动 Taq 酶的作用下，经高温变性、中温退火及延伸的循环多次后，使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。经荧光素标记的探针与扩增的 DNA 杂交，利用 Taq 聚合酶的 5'→3' 外切活性，使荧光探针的报告基团与淬灭基团分离，发出特异性荧光信号，利用荧光 PCR 仪检测特异性荧光信号，根据样品 Ct 值的大小及扩增曲线的形成情况判定结果。

【试剂盒组成】

组分	名称	数量	贮藏条件
RNA 核酸提取	裂解液	6 mL	室温
	洗液	12 mL	
	洗脱液	1 mL	
	吸附柱和收集管	10 套	
-20 ℃试剂	**反应体系管**	**10 支**	**-20 ℃**
	RNA 内参	**300 μL**	

【需要自备的物品】

1．**仪器**：涡旋震荡器、离心机、T8 荧光 PCR 扩增仪、-20℃冰箱、组织研磨器、可调移液器。

2．**耗材**：眼科剪、眼科镊、生理盐水、经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处理的灭菌 1.5mL 离心管和吸头。

【操作步骤】

1　样品采集

病死或扑杀禽，取喉气管、脑、胸肌、心肌和肺等组织；待检活禽，用棉拭子取呼吸道分泌物或排泄物，置于 50%甘油生理盐水中。2～8 ℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融）。

2　样品处理

2.1 组织样品处理：每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 1g，用手术剪剪碎混匀后取 0.02 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.2 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.3 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

3　病毒 RNA 的提取

3.1 将处理好的样品分别加入 20μL RNA 内参，再加入裂解液 600μL，充分颠倒混匀，室温静置 3min。将液体吸入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸入液体时尽量不要吸入悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），13000 rpm 离心 30 s。

3.2 弃去收集管中液体，吸取洗液 500 μL 加入吸附柱，13000 rpm 离心 30 s。

3.3 弃去收集管中液体，吸取洗液 500 μL 加入吸附柱，13000 rpm 离心 2 min（拿出时请注意避免吸附柱碰到下面的液体）以除去残留的洗液。

3.4 将吸附柱移入 1.5 mL 离心管中，向吸附柱中央加入 50μL 洗脱液，13000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 RNA。

4　操作方法

取反应体系管置于室温融化，用移液器吸取模板 5μL 加入反应体系管中，用离心机离心 30s，放入机器中，使用程序 AIV-H7&H5 进行扩增检测。

【结果判定】

根据自动分析，内参 CY5 荧光信号 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线，实验结果成立；被检样品若 FAM 荧光信号 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线为 H7 阳性；被检样品若 HEX 荧光信号 Ct 值≤30 并出现特定的扩增曲线为 H5 阳性；被检样品 30＜Ct＜36 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取 RNA，扩增后进行结果判定，如仍是可疑，可判定为阳性；被检样品 Ct 值≥36 时，超过本方法检测灵敏度范围，判定为阴性；**对于某些未呈现 S 型曲线，但本底较高的样品，应判定为阴性。**

【注意事项】

1. 本品仅供体外诊断用。
2. 为确保检测结果准确，请严格按照说明书操作。
3. 试剂盒内物品均只能使用一次，请勿重复使用。
4. **抗凝血及粪便样品，加入吸附柱前，10000 rpm 离心 30 s。**
5. 所有用于检测的废弃物品均应放入含消毒液的废物缸内，浸泡消毒；实验结束后立即用 1%次氯酸钠或 75%酒精消毒工作台。
6. 实验过程中，尽量避免手和手套接触吸附柱管口和离心管口，若离心管开盖时液体粘在手上或溅出，应立即更换手套；所有接触病料的物品均应合理处理。
7. 反应体系管用前，于室温融化，打开时请左右摇动掰至 45°，再用劲打开，避免用力过大将其掰断。
8. 反应体系管加入模板后，一定要离心，使液体全部置于管底。
9. 反应体系管使用完后，用取样器从机器取出时，插入最后一道棱，不要将反应体系管打开，避免污染。

【规格】10 头份/盒

【保存及有效期】反应体系管、RNA 内参于铝箔袋内于-20℃避光保存，有效期为 12 个月。提取试剂于室温保存。

【生产企业】哈尔滨元亨生物药业有限公司

【地址】哈尔滨利民开发区珠海路 1 号