

【产品名称】

通用名称：肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒 RNA 检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒对人口咽拭子样本的肠道通用病毒(EU)核酸、肠道病毒 71 型(EV71)核酸、柯萨奇病毒 A16 型(CA16)核酸进行定性检测。手足口病是由肠道病毒引起的传染病，该病毒属于第 IV 类的 RNA 病毒。引发手足口病的肠道病毒有 20 多种，柯萨奇病毒 A 组的 16、4、5、9、10 型，B 组的 2、5 型，部分埃可病毒以及肠道病毒 71 型，均为手足口病较常见的病原体。其中以肠道病毒 71 型以及柯萨奇病毒 A16 最为常见，目前肠道病毒的实验室检测有：1) 肠道病毒分离检测；2) 肠道特异性标志物检测；3) 血清学诊断检测等。本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 方法。经临床验证，本试剂盒可以检出肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、柯萨奇病毒 A4 型、柯萨奇病毒 A5 型、柯萨奇病毒 A6 型、柯萨奇病毒 A7 型、柯萨奇病毒 A9 型、柯萨奇病毒 A10 型、柯萨奇病毒 B2 型、柯萨奇病毒 B5 型。

【检验原理】

本试剂盒选用 EV71、CA16 以及肠道病毒保守基因片段设计特异引物及特异探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对 EV71、CA16 以及通用型肠道病毒核酸的自动化检测。

试剂盒中的内标选用一对管家基因特异性引物，结合特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，内标选用 TEXAS RED 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组成	主要成分	规格
肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒主反应液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP	1 mL×1
肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒荧光探针	含引物、探针	70 μL×1
肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒酶混合液	含 DNA 聚合酶、逆转录酶以及抗体	53 μL×1
肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒阳性对照	主要成分为 EV71/CA16/通用型肠道病毒(CA10)核酸片段(体外转录 RNA)	50 μL×1
阴性对照	主要成分为 0.9% NaCl	50 μL×1

- 注： 1. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换；
2. 核酸提取试剂盒需自备，推荐使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒（苏苏械备 20151030 号）。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，试剂反复冻融三次后，-20℃±5℃下可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明，运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】 扩增检测仪器为 ABI7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：人口咽拭子样本。
2. 采集容器：应当选用国家批准生产的一次性使用的咽拭子采样器。
3. 采集：样本采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。
4. 存放：2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃以下保存，不超过 3 个月；-70℃以下长期保存，但应避免反复冻融。
5. 运输：采用泡沫箱加冰袋密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

使用苏州天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒(苏苏械备 20151030 号)进行提取，提取过程请严格按照其说明书进行。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒主反应液、肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒酶混合液和肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒荧光探针，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂人份数 $[n=样本数+2(对照品数)]$ 。每人份反应体系配制如下：

试剂	肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒 主反应液	肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒 荧光探针	肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒 酶混合液
用量	28.5μL	2.0μL	1.5μL

计算上述各试剂的使用量，加入一适当体积的离心管中，充分混匀后，按 32μL 量分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

分别加入 8μL 的阴性对照、肠道病毒 71 型/柯萨奇病毒 A16 型/通用型肠道病毒阳性对照(无需抽提)、样品处理上清液，终体积为 40μL/管，盖紧反应管，瞬时低速离心，转移至扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测【扩增区】

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度(℃)	反应时间
1	1	50	30min
2	1	95	10min
		94	15sec
3	5	50	30sec
		72	30sec
		94	10sec
4	40	58	30sec (收集荧光)

检测荧光选择： EU(CY5)，CA16(FAM)，EV71(VIC)，内标(TEXAS RED)

【阳性判断值】

柯萨奇病毒 A16 型阳性判断： FAM 通道检测 Ct 值小于或等于 37.0 时，则判断该样本为柯萨奇病毒 A16 型阳性。

肠道病毒 71 型阳性判断： VIC 通道检测 Ct 值小于或等于 37.0 时，则判断该样本为肠道病毒 71 型阳性。

通用型肠道病毒阳性判断： CY5 通道检测 Ct 值小于或等于 37.0 时，则判断该样本为通用型肠道病毒阳性。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阳性对照 Ct 值应小于 30，阴性对照 Ct 无数值；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

CY5 通道：

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者判 EU 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct \leq 40$ 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者判 EU 为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本判 EU 为阴性，内标 Ct 值无数数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

FAM 通道：

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者判 CA16 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct \leq 40$ 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者判 CA16 为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本判 CA16 为阴性，内标 Ct 值无数数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

VIC 通道：

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者判 EV71 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct \leq 40$ 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者判 EV71 为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本判 EV71 为阴性，内标 Ct 值无数数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

【检验方法的局限性】

检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医生参考使用。同时，检测结果和样本的采集、保存及运输条件有关，其中任何环节失误都可导致假阴性结果；如在样本处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管无破损，标签完好。
2. 分析特异性：8 份阴性参考品样本，这些样本包括博卡病毒、人副流感病毒 2 型、人副流感病毒 3 型、甲型流感病毒(H1N1)、乙型流感病毒、RSV-A、RSV-B 各一份以及 1 份健康人咽拭子样本，检验结果均应为阴性，符合率(-/-)为 8/8。
3. 阳性符合率：10 份阳性参考品样本，这些样本包括肠道病毒 EV71 型、柯萨奇病毒 16 型、肠道病毒 EV71 型与柯萨奇病毒 16 型混合样本各两份，柯萨奇病毒 CA6、CA9、CA10、CB2 型各一份，检验结果均应为阳性，符合率(+/-)为 10/10。
4. 检测限：浓度为 500copies/mL 的检测限参考品 L1-L3，其中 L1 为 EV71 型、L2 为 CA16 型、L3 为 EV71 与 CA16 混合型，分别重复 20 次，至少 17 次检测结果为阳性，检测结果符合率应 $\geq 17/20$ 。
5. 精密性：选用 2 例高、低浓度样本作为精密性测试样本，重复测试 10 次，Ct 值的变异系数(CV,%) $\leq 5.0\%$ 。
6. 交叉反应：本试剂盒与博卡病毒、人副流感病毒 2 型、人副流感病毒 3 型、甲型流感病毒(H1N1)、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型均无交叉反应。
7. 干扰物：2g/mL 血红蛋白、 1.5×10^{10} 个/L 白细胞、18g/L 粘蛋白、5mg/mL 利巴韦林、20 μ g/mL 阿普洛韦对本试剂盒检测结果无影响。
8. 检测型别：本试剂盒可以检出肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、柯萨奇病毒 A4 型、柯萨奇病毒 A5 型、柯萨奇病毒 A6 型、柯萨奇病毒 A7 型、柯萨奇病毒 A9 型、柯萨奇病毒 A10 型、柯萨奇病毒 B2 型、柯萨奇病毒 B5 型。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外检测试剂，操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
2. 为保证实验结果的准确性和可靠性请使用已校准的移液器，选用合格的一次性使用的 PCR 反应管、离心管、枪头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
3. 实验请严格分区操作：第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂；第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理；第三区：PCR 扩增区-PCR 扩增检测，各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
4. 本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
5. 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
6. 每次实验应设置阴性对照和阳性对照，不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
7. 待测样本尽可能新鲜，提取过程严防 RNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 降解。
8. -70℃ 保存的 RNA 样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
9. 分装有反应液的反应管应加盖或装入密封袋内再转移至样本处理区。
10. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
11. 反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染仪器。
12. 扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
13. 实验中用过的枪头请直接打入盛有 10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同丢弃。
14. 工作台及各种实验用物品经常用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。
15. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板孔。
16. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【参考文献】

1. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
2. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.
3. Tan EL, Chow VT, Quak SH. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, (3): 294-301. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.009.
4. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 手足口病诊疗指南(2010 版)[Z]. 2010.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式:0512-62525631 传真:0512-62956337 网址:www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式:0512-62525631 传真:0512-62956337 网址:www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋(NW-07)501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋(NW-06)504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400301

【说明书核准日期及修改日期】2020.09.14