

肠道病毒 71 型 RNA 检测试剂盒(PCR 荧光法)说明书

【产品名称】 肠道病毒 71 型 RNA 检测试剂盒(PCR 荧光法)

【包装规格】 32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测人粪便和咽拭子样本中的肠道病毒 71 型 RNA。

适应症：肠病毒属于微小病毒科（picornaviridae）肠病毒群（enterovirus），是一组无包膜单链 RNA 微小核糖核酸病毒。肠道病毒 71 型（EV71）为目前肠病毒群中最晚发现的病毒，其感染性强且致病率高，尤其是神经系统方面的并发症。肠道病毒 71 型是引起婴幼儿手足口病(hand-foot and mouth disease; HFMD)常见病原体之一。本试剂盒适用于由肠道病毒 71 型感染引起的手足口病的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒选用肠道病毒 71 型（EV71）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肠道病毒 71 型（EV71）核酸的自动化检测。

【主要组成成分】

组成		组成成分	规格
病毒核酸纯化试剂盒	病毒核酸纯化柱	含硅胶膜的离心柱	32 个
	2mL 离心套管		32 个
	Carrier RNA	含大肠杆菌核酸提取物	120μL
	溶液 L	含三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、硫氰酸胍、Triton-100	×1 12mL
	溶液 WA	含盐酸胍、三羟甲基氨基甲烷	×1 7.6mL
PCR 反应试剂盒	溶液 WB	含乙酸胺、三羟甲基氨基甲烷	×1 6.5mL
	溶液 TE	含三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸	×1 2mL
	RT-PCR 反应混合液	含三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）	×1 630μL
	酶混合液	含 Taq 酶及抗体、逆转录酶、RNA 酶抑制剂	×1 49μL
	肠道病毒 71 型荧光探针	含肠道病毒 71 型引物和荧光探针	×1 21μL
	肠道病毒 71 型阳性对照	含人工非感染性体外转录 RNA	×1 350μL

	阴性对照	含 TE 缓冲液	×1 350μL ×1
--	------	----------	-------------------

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

【储存条件及有效期】

病毒核酸纯化试剂盒 2~8℃可保存 12 个月，PCR 反应试剂盒-20℃可保存 12 个月，未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复冻融不得超过三次。生产日期和使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

具有 FAM 荧光通道的 ABI7500 型荧光 PCR 扩增仪和 StepOne Plus 荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 样本：粪便、咽拭子

2. 采集

粪便：采集样本时应用干净竹签选取含有粘液、脓血等病变成分的粪便；外观无异常的粪便须从表面、深处及粪端多处取材，其量至少为大拇指末段大小（约 5g）。

咽拭子：用消毒棉棒适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，避免触及舌部，将拭子头放入无菌螺口塑料管中，旋紧管盖并密封。

3. 存放：样本可立即检测；或样本 2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融。

4. 运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理(样本处理区)

用户需自备的试剂与物品：

- 1) 无水乙醇
- 2) 1.5mL 离心管（必须选用 DNase-free & RNase-free 的 1.5mL 离心管）
- 3) 移液器吸头（必须选用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 移液器吸头）
- 4) 一次性手套及防护用品及纸巾
- 5) 台式少量离心机（可配离心 1.5mL 离心管和 2mL 离心管的转子）
- 6) 旋涡震荡器
- 7) 水浴锅

1.1 试剂使用前准备

- 1) 请将溶液 L 置于 70℃水浴至沉淀消失后再使用。
- 2) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
- 3) 根据试剂瓶标签上的指示在溶液 WA 和溶液 WB 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。

4) 根据所需要制备的核酸样品数计算需要使用的溶液 L 体积（300μL 溶液 L/管，注意由于加液过程可能存在误差，建议计算时增加 300~500μL 溶液 L 的体积），按每 1mL 溶液 L 体积加入 10μL Carrier RNA（存放于 PCR 反应试剂盒内）的比例加入 Carrier RNA，旋涡振荡数秒混匀。

1.2 样本使用前处理

1.2.1 粪便

在 1.5mL 离心管中加入 250μL 无菌生理盐水，用灭菌的牙签挑取约 200mg 左右（如果粪便呈液体状，直接吸取 200μL 粪便），加入到 1.5mL 离心管中，旋涡振荡直至粪便完全分散开来。12000rpm 离心 5 分钟，取 100μL 上清液进行病毒核酸的分离纯化。

1.2.2 咽拭子

样本试管中加入 1mL 无菌生理盐水(冻存样本使用前在室温融解并充分混匀)，充分震荡摇匀，吸取洗液加入到 1.5mL 离心管中，12000rpm 离心 5 分钟，去部分上清液，留 100μL 溶解沉淀进行病毒核酸的分离纯化。

1.3 操作步骤

1) 在 1.5mL 离心管中加入 300μL 含 Carrier RNA 的溶液 L，再加入 100μL 样本，旋涡振荡数秒混合均匀，室温静置 10 分钟。
* 为避免阳性样本污染溶液 L 而造成假阳性，应先加入溶液 L 再加入待检样本。

* 为避免打开管盖时样品间的交叉污染，可低速离心数秒，使管盖上的溶液沉降到管底。

2) 每管加入 320μL 无水乙醇，温和地翻转离心管 3~5 次混合均匀。

* 为避免打开管盖时样品间的交叉污染，可低速离心数秒，使管盖上的溶液沉降到管底。

3) 取一个核酸纯化柱放入到 2mL 离心管中，吸取步骤 2) 中的混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。
* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

4) 弃 2mL 离心管中的滤液，并将 2mL 离心管在纸巾上倒扣拍击一次，将核酸纯化柱置回到 2mL 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500μL 溶液 WA，盖上管盖，12000rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，在纸巾上倒扣拍击是为了避免粘附在离心管口的滤液对离心机的污染。

* 确认在溶液 WA 中已经加入无水乙醇。

5) 弃 2mL 离心管中的滤液，并将 2mL 离心管在纸巾上倒扣拍击一次，将核酸纯化柱置回到 2mL 离心管中，在核酸纯化柱中加入 600μL 溶液 WB，盖上管盖，14000rpm 离心 1 分钟。

* 确认在溶液 WB 中已经加入无水乙醇。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000rpm，则用最高速离心 2 分钟。

6) 弃 2mL 离心管中的滤液，并将 2mL 离心管在纸巾上倒扣拍击一次，将核酸纯化柱置回到 2mL 离心管中，14000rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 RT-PCR 效果。

7) 弃 2mL 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5mL 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50μL 溶液 TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000rpm 离心 30 秒。

* 必须选用 DNase-free & RNase-free 的 1.5mL 离心管收集病毒核酸。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将 1.5mL 离心管管盖剪去，以免管盖脱落而损伤离心机。

8) 弃纯化柱，取 20μL 洗脱的核酸用于 RT-PCR；或者将病毒核酸储存于-20℃备用。

2. 试剂配制(试剂准备区)

从试剂盒中取出 RT-PCR 反应混合液、酶混合液和荧光探针，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。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	RT-PCR 反应混合液	肠道病毒 71 型 荧光探针	酶混合液
用 量	18μL	0.6μL	1.4μL

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 20μL 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 20μL 的阴性对照、肠道病毒 71 型阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管，转移至检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测(PCR 检测区)

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(min:sec)
1	1	42	30:00
2	1	95	05:00
3	5	94	00:15
		50	00:30
		72	00:30
4	40	94	00:10
		60	00:30

检测荧光选择：请选择 FAM 荧光检测，数据采集定在 60℃。

【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的最高点。阳性对照 Ct 值应小于 38.0，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。

1. 检测样本 Ct 值≤38.0 者判为阳性。
2. 检测样本 Ct 值>38.0 的样本建议重做，重做结果 Ct 值<40 者为阳性，否则为阴性。

【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。

【产品性能指标】

1. 灵敏度：本试剂盒的产品检测下限为 500copies/mL。
2. 特异性：本试剂盒与甲型肝炎病毒（HAV）、戊型肝炎病毒（HEV）、柯萨奇 A16 病毒（CA16）等样本无交叉反应。
3. 精密度：一份弱阳性的样本连续重复 10 次检测，其 Ct 值的 CV 值不大于 5%。

【注意事项】

- 1.有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
- 2.本试剂盒仅用于体外检测。
- 3.实验室严格分区操作：
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 检测区-PCR 扩增检测
- 4.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。
- 5.使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
- 6.反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 7.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。
- 8.扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
- 9.实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
- 10.工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
- 11.PCR 反应混合液应避免低温保存。
- 12.不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。
- 13.尽量采用新鲜样本进行病毒 RNA 的分离纯化。反复冻融的样本将导致检出的敏感性降低，表现为 CT 值偏大或者假阴性。
- 14.阴性对照和阳性对照也需要进行核酸提取步骤。

【参考文献】

- 1.手足口病的实验室检测及辅助诊断方法[期刊论文]-疾病预防控制 2011(5).
2. Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9 (2): 149-156.
3. Ooi MH, Solomon T, Podin Y, Mohan A, Akin W, Yusuf MA, et al.

Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1858-1866.

4. Ang LW, Koh BK, Chan KP, Chua LT, James L, Goh KT. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007.[J]. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38(2): 106-112.

5.中华人民共和国卫生部.手足口病诊疗指南(2010 年版)[EB/OL]. [2010-04-21].

【基本信息】

注册人/生产企业名称：艾康生物技术（杭州）有限公司
住所：杭州市西湖区振中路 210 号
联系方式：电话：0571-87775858 传真：0571-87775851
售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司
联系方式：电话：400-118-2266 传真：0571-87775851
生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）
生产许可证编号：浙食药监械生产许 20120007 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20143401880
【说明书核准日期及修改日期】
核准日期：2019.04.28
修改日期：2022.04.22