

肠道病毒通用型、柯萨奇病毒 A16 型和肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法） 说明书

【产品名称】肠道病毒通用型、柯萨奇病毒 A16 型和肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【货号】JC20303N

【包装规格】50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测婴幼儿咽拭子样本中的肠道病毒71型，柯萨奇病毒A9、A16、B2、B5，埃可病毒30型等肠道病毒核酸，可以同时区分柯萨奇病毒A16型和肠道病毒71型。

手足口病是由肠道病毒引起的急性传染病，多发生于学龄前儿童，尤以3岁以下年龄组发病率最高。病人和隐性感染者均为传染源，主要通过消化道、呼吸道和密切接触等途径传播。主要症状表现为手、足、口腔等部位的斑丘疹、疱疹，少数病例可出现脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍等，手足口病多由柯萨奇病毒A16、肠道病毒71型感染引起，致死原因主要为脑干脑炎及神经源性肺水肿。实验室诊断方法目前主要有病毒分离、核酸检测等。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光PCR技术，以柯萨奇病毒A16型衣壳蛋白基因、肠道病毒71型衣壳蛋白基因编码区和肠道病毒5'UTR基因编码区的保守区为靶区域，设计引物和探针。通过分别以Fam、Vic、Rox和 Cy5 标记的柯萨奇病毒A16型、肠道病毒71型、肠道病毒通用型和内标对照，在同一反应体系中同时检测柯萨奇病毒A16型、肠道病毒71型和肠道病毒通用型，并通过内标对照鉴别仪器故障、试剂因素、聚合酶活性因素或样本中存在抑制物等造成的结果不理想的原因。探针为包括5'端报告基团和3'端淬灭基团的寡核苷酸，在PCR扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被Taq酶（5'→3'外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量PCR仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对肠道病毒在核酸水平上的定性检测。

【主要组成成分】

组份名称	规格及数量	主要成分
核酸扩增反应液	375μL×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液
酶混合液	250μL×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶
柯萨奇病毒 A16 型/肠道病毒 71 型/通用型反应液	200μL×1 管	引物、探针
阳性对照	300μL×1 管	灭活的柯萨奇病毒 A16 型和肠道病毒 71 型病毒培养液
去 RNA 酶水（空白对照）	500μL×1 管	焦碳酸二乙酯
内标对照	500μL×1 管	含特定基因序列的 TOP 质粒

备注：不同批号间的试剂不能互换。

【储存条件及有效期】

-20±5℃避光保存，有效期6个月。

避免反复冻融，冻融次数不能超过5次。

生产日期及有效期至：见标签。

【适用仪器】

ABI7500荧光定量PCR仪。

【样本要求】

适用样本类型为咽拭子样本。咽拭子样本采集按照《临床护理实践指南》（2011版）中关于咽拭子采集法进行采集。采集病人发病3日内的咽拭子样本，用专用采样棉签，棉签材质为脱脂棉和木棒。用压舌板轻压舌部，迅速用棉签擦拭患者口腔两侧腭弓及咽、扁桃体的分泌物，避免咽拭子触及其他部位；迅速将棉签放入装有3~5mL生理盐水的采集管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖密封，以防干燥。样本采集后应及时检测，2℃~8℃保存3天内完成检测，-20℃保存期4个月，-70℃可以保存12个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过5次，采用冰袋低温运输不能超过3天。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备间）

取N个（N=空白对照+待检测样本数+阳性对照）PCR反应管，每管按照反应液配制表加量要求依次加入核酸扩增反应液、酶混合液、柯萨奇病毒A16型/肠道病毒71型/通用型反应液、去RNA酶水。

反应液配制表（每人份）

反应液组份	加量（ μL ）/每人份
核酸扩增反应液	7.5
酶混合液	5
柯萨奇病毒 A16 型/肠道病毒 71 型/通用型反应液	4
去 RNA 酶水	3.5
总体积	20

2. 样本处理（样本处理间）

2.1 核酸提取 取200 μL 待测样本、阳性对照和空白对照，分别将10 μL 内标对照加入其中。用 Qiagen公司的QIAamp RNA Mini Kit或者Roche公司的High Pure Viral Nucleic Acid Kit提取试剂盒提取RNA，按试剂盒说明书操作。阳性对照及空白对照取200 μL /次进行提取。

2.2 加样 在上述准备好的PCR反应管中分别加入处理好的待测样本RNA、空白对照RNA和阳性对照RNA各5 μL ，终体积为25 μL /管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

3. PCR扩增检测（PCR扩增间）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 ABI7500操作说明

3.2.1 循环参数设定

步骤	温度	时间	循环数
1 逆转录反应	50 $^{\circ}\text{C}$	30 min	1 cycle
2 预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1 cycle
3 变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 s	45 cycles
退火、延伸及检测荧光	55 $^{\circ}\text{C}$	40 s	

步骤 3 中 55 $^{\circ}\text{C}$ 时荧光检测，检测通道：FAM，VIC，ROX，CY5

*注：ABI 7500荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

3.2.2 结果分析

反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节Baseline的Start值、End值以及Threshold值（可以根据实际情况自行调整，Start值可以在3~15、End值可设在5~20，调整空白对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击Analysis自动获得分析结果，在Report界面察看结果。

【阳性判断值】

根据临床试验结果，利用ROC曲线法最终确定本试剂盒的柯萨奇病毒A16参考值为CT值等于35.3；肠道病毒71参考值为CT值等于35.3；肠道病毒通用型参考值为CT值等于35.5。

【检验结果的解释】

质量控制

- 空白对照：无典型S型扩增曲线显示。内标对照呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 35 。
- 阳性对照：呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 30 。内标对照呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 35 。
- 以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

结果判读

在仪器正常，阳性对照、空白对照和内标对照均正常的情况下进行结果分析，（Fam 通道为柯萨奇病毒A16型，Vic 通道为肠道病毒71型，Rox 通道为肠道病毒通用型，Cy5通道为内标对照）

1. 待测样本具备如下条件，样本扩增曲线呈典型S型曲线，判为阳性：

柯萨奇病毒A16型 (Fam)	肠道病毒71型 (Vic)	肠道病毒通用 型 (Rox)	结果判读
CT ≤ 35.3	CT > 35.3 或undet	CT ≤ 35.5	柯萨奇病毒A16型阳性
CT > 35.3 或undet	CT ≤ 35.3	CT ≤ 35.5	肠道病毒71型阳性
CT > 35.3 或undet	CT > 35.3 或undet	CT ≤ 35.5	非柯萨奇病毒A16型和肠道病毒71型的其他肠道病毒

- 待测样本判为阴性：柯萨奇病毒A16型（Fam）CT > 35.3 或undet或无典型S型曲线，肠道病毒71型（Vic）CT > 35.3 或undet或无典型S型曲线，肠道病毒通用型（Rox）CT > 35.5 或undet或无典型S型曲线。
- 待测样本扩增曲线呈典型S型曲线，但浓度过高而导致内标对照没有扩增，待测样本可直接判为阳性。也可将待测样本进行10倍稀释重新检测。
- 检测结果和样本采样、运输及保存条件有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。

【检验方法的局限性】

本试剂盒用于咽拭子样本中，肠道病毒71型，柯萨奇病毒A9、A16、B2、B5，埃可病毒30型等肠道病毒核酸的定性检测。手足口病一病多原，本试剂盒对于新增血清型、变异株存在不能检出的可能，检测结

果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

柯萨奇病毒A16型灵敏度CCID₅₀标定法为 2.0×10^{-2} CCID₅₀/0.1mL，该浓度水平检出率范围93~97%；肠道病毒71型灵敏度CCID₅₀标定法为 2.0×10^{-2} CCID₅₀/0.1mL，该浓度水平检出率范围92~93%；肠道病毒通用型（包括埃可病毒30型、柯萨奇病毒A4型、A9型、B2型和B5型）灵敏度CCID₅₀标定法为 2.0×10^{-2} CCID₅₀/0.1mL，该浓度水平检出率范围90~97%。与感染部位相同或感染症状相似且常见的其他病毒（腺病毒、轮状病毒、巨细胞病毒、流感病毒、EBV、单纯疱疹病毒、VZV、HHV-6、HHV-7、风疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、B群链球菌、人类白细胞的总RNA）在 $1 \sim 5 \times 10^6$ copies/mL浓度水平下无交叉反应。当干扰物质如血液、脓液、阿昔洛韦、更昔洛韦、利巴韦林和思密达在检测样本中浓度分别为25%、25%、0.2g/L、0.2g/L、0.2g/L和0.2g/L时，不会对样本检测结果判断产生影响。柯萨奇病毒A16型的阳性符合率为96.43%，阴性符合率为100%；肠道病毒71型的阳性符合率为100%，阴性符合率为100%；肠道病毒通用型的阳性符合率为98.33%，阴性符合率为100%。

【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. 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。
3. 实验严格分区操作，各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后立即清洁工作台。
4. 本试剂盒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. 待测样本尽可能新鲜，样本提取前需加入内标对照，提取过程严防RNA酶污染。
7. -70℃保存的核酸RNA，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
8. 每次实验应设置空白对照和阳性对照。不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
9. 分装有反应液的反应管应扣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。
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，并与其他废弃物品一同丢弃。
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 仪需定期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] Tan EL, Chow VT, Kumarasinghe G, et al. Specific detection of enterovirus 71 directly from clinical specimens using real-time RT-PCR hybridization probe assay. J Mol Cell Probes. 2006;20 (2):135-140.
- [2] Tan EL, Yong LL, Quak SH, et al. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. J Clin Virol. 2008;42 (2):203-206.
- [3] Fujimoto T, Yoshida S, Munemura T, Taniguchi K, et al. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. J Infect Dis. 2008;61 (6):497-499.
- [4] Xiao XL, He YQ, Yu YG, et al. Simultaneous detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control. J Arch Virol. 2009; 154 (1):121-125.
- [5] Leś K, Przybylski M, Dzieciatkowski T, et al. Detection of human enteroviruses with real-time PCR assay using TaqMan fluorescent probe. J Med Dosw Mikrobiol. 2010; 62(3):245-253.
- [6] Marian AC Piqueur, Walter A Verstrepen, Peggy Bruynseels, et al. Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. Virol J. 2009; 6: 95.
- [7] Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Development and evaluation of a “real-time” RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. J Med Virol. 2002;67(4):555-562.
- [8] Dierksen U, Rehren F, Henke-Gendo C, et al. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. J Clin Virol. 2008;42(1):58-64.
- [9] Verstrepen WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Virol. 2002;25

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

住所：江苏省泰州市药城大道837号

联系方式：电话0523-86201616 传真0523-86201617 邮编225300 网址www.bioperfectus.cn

售后服务单位名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

联系方式：电话0523-86201616 传真0523-86201617 邮编225300 网址www.bioperfectus.cn

生产地址：泰州市医药高新区药城大道837号

生产许可证编号：苏药监械生产许20100121号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20173404282

【说明书核准及修改日期】2023年12月27日