

【产品名称】

通用名称：柯萨奇病毒 A6/A10 RNA 检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒对人咽拭子样本的柯萨奇病毒 A6 核酸、柯萨奇病毒 A10 核酸进行定性检测。

柯萨奇病毒是一种肠病毒分为 A 和 B 两类，其中 A 型(甲型)有 23 种、B 型(乙型)6 种，均具高传染性，是一类常见的经呼吸道和消化道感染人体的病毒，感染后会出现发热、打喷嚏、咳嗽等感冒症状，目前柯萨奇病毒的实验室检测有：1) 柯萨奇病毒分离检测；2) 柯萨奇病毒特异性标志物检测；3) 血清学诊断检测等。本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 方法。

【检验原理】

本试剂盒选用柯萨奇病毒 A6 型与柯萨奇病毒 A10 型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柯萨奇病毒 A6/A10 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
柯萨奇病毒 A6/A10 主反应液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP	1 mL×1
柯萨奇病毒 A6/A10 荧光探针	含引物、探针	70 μL×1
柯萨奇病毒 A6/A10 酶混合液	含 DNA 聚合酶、逆转录酶以及抗体	53 μL×1
柯萨奇病毒 A6/A10 阳性对照	主要成分为柯萨奇病毒 A6/A10 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】ABI7500 荧光 PCR 扩增仪；天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪

【样本要求】

1. 标本：人咽拭子样本。
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】

从试剂盒中取出柯萨奇病毒 A6/A10 主反应液、柯萨奇病毒 A6/A10 酶混合液和柯萨奇病毒 A6/A10 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+对照品数(2)]。每人份反应体系配制如下：

试剂	柯萨奇病毒 A6/A10 主反应液	柯萨奇病毒 A6/A10 荧光探针	柯萨奇病毒 A6/A10 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、柯萨奇病毒 A6/A10 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	时 间
1	1	50℃	30min
2	1	95℃	10min
		94℃	15sec
3	5	50℃	30sec
		72℃	30sec
4	40	94℃	10sec
		58℃	30sec(收集荧光)

检测荧光选择：CA6(FAM)，CA10(VIC)，内标(TEXAS RED)

【阳性判断值】

柯萨奇病毒 A6 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 A6 型阳性。

柯萨奇病毒 A10 型阳性判断：VIC 通道检测 Ct 值小于或等于 37.0 时，则判断该样本为柯萨奇病毒 A10 型阳性。

【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。

FAM 通道：

1. 检测样本 Ct 值 ≤ 37.0 者判 CA6 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct < 40$ 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者判 CA6 为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本判 CA6 为阴性，内标 Ct 值无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 CA10 为阳性。
2. 检测样本的 $37.0 < Ct < 40$ 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者判 CA10 为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本测定的 Ct 值无数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本判 CA10 为阴性，内标 Ct 值无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，这些样本包括柯萨奇病毒 A16、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 B5、甲型流感病毒(H1N1)、RSV-A、RSV-B、健康人咽拭子样本各一份，检验结果均应为阴性，符合率(-/-)为 8/8。
3. 阳性符合率：6 份阳性参考品样本，这些样本包括柯萨奇病毒 A6 样本、柯萨奇病毒 A10 样本、柯萨奇病毒 A6 与 A10 混合样本各两份，检验结果均应为阳性，符合率(+/-)为 6/6。
4. 检测限：浓度为 500copies/mL 的检测限参考品 L1-L3，其中 L1 为柯萨奇病毒 A6 型、L2 为柯萨奇病毒 A10 型、L3 为柯萨奇病毒 A6 与 A10 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. 精密度：选用 2 例高、低浓度样本作为精密度测试样本，重复测试 10 次，Ct 值的变异系数(CV,%) $\leq 5.0\%$ 。
6. 交叉反应：本试剂盒与柯萨奇病毒 A16、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A4、柯萨奇病毒 B5、甲型流感病毒(H1N1)、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。

【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，提取过程应严防 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%次氯酸钠的废液缸内，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 仪器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. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
3. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.
4. Fujimoto T,Lizuka S,Enomoto M. Hand,foot,and mouth disease caused by coxsackievirus A6,Japan,2011[J].Emerging Infectious Diseases,2012,(02):337-339.
5. amashita T,Ito M,Taniguchi A. Prevalence of coxsackie virus A5,A6,and A10 in patients with herpangina in Aichi Prefecture,2005[J].Japanese Journal of Infectious Diseases,2005.390-391.

【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 20153402139

【说明书核准日期及修改日期】2020.08.21