

柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

通用名称: 柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】 50 大份/盒

【预期用途】

本产品用于婴幼儿咽拭子样本中柯萨奇病毒 A6 型(CoxA6)和 A10 型(CoxA10)核酸的定性检测。

柯萨奇病毒属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,是单链 RNA 病毒,分为 A 和 B 两类。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。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 型、肠道病毒 71 型感染引起,而在我国柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型也导致手足口病的爆发,致死原因主要为脑干脑炎及神经源性肺水肿。肠道病毒主要通过消化道、呼吸道和密切接触等途径传播。实验室检测方法目前主要有病毒分离、核酸检测等。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术,以柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型保守区设计特异性引物和探针,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,从而实现对柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型在核酸水平上的定性检测。

本试剂盒设置了内标,内标为人核糖核酸酶 P(RNaseP),通过对内标对待测样本的采集、运输和提取过程中进行监控,避免检测结果的假阴性。

【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 A6/A10 反应液	200μL×1 管	含柯萨奇病毒 A6 型、A10 型和 RNaseP 的引物、探针
阳性对照	300μL×1 管	灭活柯萨奇病毒 A6 型、A10 型病毒培养液和含 RNaseP 的病毒样颗粒
去 RNA 酶水(空白对照)	500μL×1 管	经焦碳酸二乙酯处理的水

备注:不同批号间试剂盒组份不能互换;本试剂盒不包含但检测必需的配套提取试剂:硕世生物的病毒核酸提取试剂盒(货号:SDK60101)、Qiagen 公司的 QIAamp RNA Mini Kit(货号:52904)或者 Roche 公司的 High Pure Viral Nucleic Acid Kit 提取试剂盒(货号:11858874001)提取 RNA,按试剂盒说明书操作。

【储存条件及有效期】

储存条件、有效期和特殊要求:避光-20℃贮存,有效期 12 个月。冰袋低温运输不能超过 4 天;反复冻融次数不能超过 5 次。

生产日期、有效期至:见试剂盒外包装。

【适用仪器】

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 样本类型:咽拭子
- 样本的采集:拭子越过舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处,反复擦拭 3~5 次,避免触及舌、口腔黏膜和唾液。将拭子从

此文件由申请人或注册人提供

口中慢慢取出,插入到 3mL~5mL 病毒标本保存液(VTM)(含 10% Hanks 基础液,2%牛血清蛋白和 0.1%青链霉素,PH=7.4),在靠近顶端处折断棉签棒,旋紧管盖并密封,以防干燥。

- 样本保存和运输:样本采集后应及时检测,-20℃保存期 6 个月,-70℃保存期至少为 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(试剂准备区)

按反应液配置表中的比例取相应量的核酸扩增反应液、酶混合液、柯萨奇病毒 A6/A10 反应液和去 RNA 酶水,充分混匀后按 20μL/管分装至 N 个(N=待测样本数+2 管对照)PCR 反应管中。

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 A6/A10 反应液	4
去 RNA 酶水	3.5
总体积	20

2. 样本处理(样本处理区)

2.1 核酸提取 推荐用硕世生物的病毒核酸提取试剂盒、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。

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核酸、空白对照、阳性对照各 5μL,终体积为 25μL/管,盖紧管盖,瞬时低速离心。

3. RT-PCR 扩增检测(核酸扩增区)

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	50℃	30min	1 cycle
2	预变性	95℃	5 min	1 cycle
3	变性	95℃	10 s	45 cycles
	退火、延伸及检测荧光	55℃	40 s	
步骤3中55℃时荧光检测，检测通道：FAM、VIC、ROX				

步骤 3 中 55℃时荧光检测,检测通道:FAM、VIC、ROX

*注:ABI7500 实时荧光 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】

在正常人群中不应检测出柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型的核酸,利用受试者工作曲线(ROC)确定本试剂盒的柯萨奇病毒 A6 型的临界 Ct 值为 36.0;柯萨奇病毒 A10 型的临界 Ct 值为 35.75。

【检验结果的解释】

质量控制:

通道	Ct 值		
	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道
空白对照	UNDET	UNDET	UNDET
阳性对照	Ct≤30	Ct≤30	Ct≤30

注: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，阳性对照和空白对照均正常的情况下进行结果分析（FAM通道代表柯萨奇病毒A6型，VIC通道代表柯萨奇病毒A10型，ROX通道代表内标）。

	FAM通道 Ct值	VIC通道Ct 值	ROX通道 Ct值	结果判读
1	Ct≤36.0	Ct>35.75 或UNDET	不做要求	柯萨奇病毒A6型阳性
2	Ct>36.0 或 UNDET	Ct≤35.75	不做要求	柯萨奇病毒A10型阳性
3	Ct≤36.0	Ct≤35.75	不做要求	柯萨奇病毒A6型和 A10型同为阳性
4	Ct>36.0 或 UNDET	Ct>35.75 或 UNDET	Ct≤35.0	柯萨奇病毒A6型和 A10型同为阴性

注：当样本检测结果为阳性时，若内标无扩增信号或者Ct值>35，其阳性结果仍然可信。

【检验方法的局限性】

本试剂盒的检测结果显示与样本采集、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。

本试剂盒中的内标靶基因为人的管家基因-核糖核酸酶P，实验室的耗材容易被人体表面携带的核酸污染，可能导致试剂盒中空白对照的ROX通道有扩增。

【产品性能指标】

1. 企业参考品的符合率：10份阳性参考品符合率100%（10/10），8份阴性参考品的符合率100%（8/8）。
2. 最低检测限：柯萨奇病毒A6型为15TCID₅₀/mL、柯萨奇病毒A10型为10TCID₅₀/mL。
3. 特异性：与10⁵TCID₅₀/mL柯萨奇病毒A16型、肠道病毒71型、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、肠道腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、轮状病毒、札如病毒、星状病毒，以及10⁶CFU/mL小肠结肠炎耶尔森菌、空肠弯曲菌、大肠杆菌O157、流感嗜血杆菌、嗜水气单胞菌、伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌、拟态弧菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌等无交叉反应。
4. 重复性：产品具有良好的批内重复性，变异系数CV小于5%。
5. 当常见的干扰物质如血液、脓液、更昔洛韦、利巴韦林、阿昔洛韦、病毒灵、盐酸金刚乙胺和思密达在检验样本中的浓度分别为25%、25%、200 mg/mL、200 mg/mL、200 mg/mL、200 mg/mL、200 mg/mL、200 mg/mL时，不会影响到样本检测结果。
6. 临床试验结果总结：共检测900例咽拭子样本，与测序法相比，CA6阳性符合率100%，阴性符合率99.50%，总符合率99.67%，Kappa值为0.9924；CA10阳性符合率100%，阴性符合率99.85%，总符合率99.89%，Kappa值为0.9970。说明两种方法检测性能具有很好一致性。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅作为体外诊断试剂使用。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；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请立即清洁工作台。
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。
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] 任倩. 手足口病重要病毒序列分析及生物信息学表征. 山东泰安市, 泰山医学院, 2012.
- [2] Lu QB, Zhang XA, Wo Y, et al. Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009-2011. PLoS One. 2012;7(12):e52073.
- [3] Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. J Clin Virol, May, 2010, 48(1):49-54.

【基本信息】

注册人：江苏硕世生物科技股份有限公司

住所：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14 四楼办研区）

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】