

肠道病毒（EV）通用型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：肠道病毒（EV）通用型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于定性检测人口咽拭子、粪便样本中肠道病毒的特异性 RNA 核酸片段。

肠道病毒包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒及新型肠道病毒等共 71 个血清型。肠道病毒主要引起脊髓灰质炎、手足口病、无菌性脑膜炎、疱疹性咽峡炎、病毒性心肌炎和流行性胸痛等多种疾病，其中手足口病的传统检测方法主要有病毒分离培养、血清免疫学方法、基因芯片法、核酸杂交法。实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 技术，选取肠道病毒基因组中相对保守的区域，设计特异性引物及探针，在样本核酸提取之后采用荧光 PCR 方法，对临床样本中通用型肠道病毒进行快速定性检测。

本产品采用磁珠法提取肠道病毒 RNA 模板，然后在酶的作用下对靶区域进行扩增，同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

包装	序号	组分	主要成分
核酸提取试剂	1	磁珠	磁珠
	2	核酸助沉剂	核酸助沉剂
	3	RNA 提取液 1	氯化钠、乙二胺四乙酸、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、十二烷基硫酸钠、异硫氰酸胍
	4	RNA 提取液 2	β-巯基乙醇、氯化钠
	5	RNA 提取液 3	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、无水乙醇
	6	RNA 提取液 4	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	7	RNA 提取液 5	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、乙二胺四乙酸
扩增试剂	1	蛋白酶 K	蛋白酶 K
	2	EV PCR 反应液	反转录酶、尿嘧啶-N- 糖基化酶、TaqDNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸、氯化镁、二对引物、二条荧光探针
	3	EV 阳性质控品	质粒
	4	EV 弱阳性质控品	质粒
	5	EV 阴性质控品	灭菌水

	6	EV 内标	质粒
--	---	-------	----

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2：本产品中蛋白酶 K 属于提取试剂组分，需-20±5℃避光保存，故存放在扩增试剂盒中。

注 3：试剂盒以外必需的设备及材料：荧光定量 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、干式恒温仪或水浴锅、移液器及灭菌的吸头（带过滤塞、无 RNase）、灭菌离心管（无 Rnase）、离心机、PCR 样品反应管（无 Rnase）、无粉乳胶手套和磁力架。

注 4：内标模板与靶基因无同源性。

【储存条件及有效期】

核酸提取试剂在 2~8℃保存，扩增试剂在-20±5℃保存，有效期 8 个月。

试剂盒应避光保存，避免重压、反复冻融。

产品生产日期见标签，失效日期见标签。

试剂盒各组分反复冻融不宜超过三次，开瓶后请于二个月内使用。

运输稳定性要求：采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，且到货后按照各组分规定条件保存，产品可稳定保存至产品效期末。

【适用仪器】适用于 ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型：口咽拭子、粪便样本。

2.样本采集：

口咽拭子：点燃酒精灯，嘱病人张口暴露咽喉，用培养管内的消毒长棉签以灵敏而轻柔的动作擦拭两侧腭弓和咽、扁桃体上的分泌物。取毕，将试管口在酒精灯火焰上消毒，然后将棉签插入试管，塞紧，密闭送检。

粪便样本：用灭菌捻拭子拭取粪便或腹泻物置于无菌玻璃管（含 0.4ml 灭菌生理盐水），用无菌棉球将试管塞紧后，密闭送检。

3.样本保存：样本收集后可立即用于检测。2~8℃条件下保存不超过 72 小时。-20℃条件下可保存 8 个月。长期保存请置于-70℃条件以下。应避免反复冻融。

4.运输：运输过程中应采用不易碎的容器装载样本，并且视作潜在的传染源，避免外漏。采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，避免样本运输途中解冻，影响检测结果。

5.提取核酸的要求：提取产物浓度范围应为 10ng/μl~100ng/μl；OD260/OD280 的比值在 1.7~1.9 之间。

【检验方法】

1.试剂配制

1.1 检测反应设置阳性质控、弱阳性质控和阴性质控，每孔均设有内标。

1.2 配制过程：反应数 N=待检样本数(n)+质控品数(3)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，取 1.5ml 无菌离心管配制反应体系（EV PCR 反应液 20μl/人份+EV 内标 1μl/人份），试剂全部加入后震荡混匀，离心数秒。然后将上述混合液 21μl/管分装至 PCR 反应管中。

2.样本处理

实验开始前取出试剂盒所需组分，轻微振荡，使其充分混匀，如试剂中有沉淀，请溶解后使用。操作时，如发现管壁和管盖有液体，请短暂离心使液体甩入管底，再置于磁力架上。

2.1 取 N 个 1.5ml 灭菌离心管（N 为所需提取临床样本的数量），分别加入 300μl 提取液 1、40μl 蛋白酶 K、4μl 核酸助沉剂、20μl 磁珠（使用前充分振荡混匀），200μl 待处理样本，100μl 提取液 2，室温颠倒混匀 15 分钟，使磁珠和核酸充分结合。

2.2 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，磁珠吸附完全，溶液澄清后弃去上清液。吸附在离心管盖上的磁珠可通过反复颠倒磁力架冲洗下来。

2.3 加入 550μl 提取液 3，漩涡振荡使磁珠重新悬浮，然后置于磁力架上，2 分钟磁分离后去上清。

2.4 重复操作 2.3。

2.5 将离心管放置在磁力架上，缓慢加入 600μl 提取液 4，吹吸 3 次，静置 2 分钟磁分离后弃去上清液，取下离心管。

2.6 加入 50μl 提取液 5，用移液器缓慢吹打混匀，55℃温浴 10 分钟，期间轻轻晃动溶液两次。

2.7 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，磁分离后将上清液转移至新的灭菌离心管中。

3.加样

将 EV 阴性质控品、EV 阳性质控品、EV 弱阳性质控品、临床样本 RNA 4μl 分别加入 PCR 反应管中，盖紧管盖（避免气泡产生）短暂离心将管壁上的液体全部甩至管底，然后立即进行 PCR 反应。

4.PCR 扩增程序设置

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 VIC 通道。
- 3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火，延伸，荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 HEX 通道。
- 3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火，延伸，荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5.结果分析条件的设定

5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。基线（baseline）的起始点（Start）一般设定在 5~8 之间，终止点（Stop）一般设定在 12~15 之间，阈值线（threshold）通常设定在 1000~5000 之间（视具体情况而定）。设定之后，点击分析（Analyse）按键，可以从 Reports 窗口得到各样本的 Ct 值。

5.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值，手动调整基线(Non-adaptive baseline)的起始点（Start）一般设定为 5~8，终止点（Stop）一般设定为 12~15，阈值线（threshold fluorescence）通常设定在 500~2000 之间（视具体情况而定）。设定之后，可以从“Text report”窗口得到各样本的 Ct 值。

6.质量控制

- 6.1 内标：内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。
- 6.2 阴性质控品：靶基因通道无 S 型扩增曲线；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。
- 6.3 阳性质控品：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤30.0；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。
- 6.4 弱阳性质控品：靶基因通道、内标通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤37.0；阴性样本参考值为 Ct 值>40.0；37.0<Ct 值≤40.0 且扩增曲线正常为灰区；内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

【检验结果的解释】

- 1.若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，或内标通道虽出现 S 型扩增曲线，但 Ct 值>35.0，检测结果无效，应重新提取样本核酸进行检测。
- 2.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道无 S 型扩增曲线，则检测样本为 EV 阴性。
- 3.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：
 - 3.1 若靶基因通道 Ct 值≤37.0，则检测样本为 EV 阳性；
 - 3.2 若 37.0<靶基因 Ct 值≤40.0，并且扩增曲线正常，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值≤40.0，则检测样本为 EV 阳性。具体方法如下：
 - 1) 取待提取样本 4ml，置于离心管内；

- 2) 12000 转/min 离心 10 分钟，弃上清留下 1ml；
- 3) 震荡混匀余液，按提取说明书的要求进行提取；
- 4) 将提取后样本按本试剂盒说明书的要求进行检测。
- 4.若靶基因 Ct 值≤15.0 而又出现不规则曲线，应重新提取样本核酸稀释后进行检测。具体方法见本说明书的样本处理。

【检验方法的局限性】

本试剂盒适用于检测临床样本，但其检测结果也受检测仪器及仪器正确使用的影响。本试剂盒检测结果可供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

- 1.本试剂盒的最低检测限为 1.0×10³ copies/ml。
- 2.分析特异性：对于可能存在检测干扰的非肠道病毒如单纯疱疹病毒Ⅱ型、肺炎衣原体、流感病毒、肺炎支原体、副流感病毒、金黄色葡萄球菌、合胞体病毒、肺炎链球菌、B 族链球菌、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、A 群轮状病毒、腺病毒和巨细胞病毒检测结果均为阴性，无交叉反应。
- 3.本试剂盒验证过的肠道病毒包括：肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A9 型、A16 型、A10 型、A5 型、A7 型、A4 型、B2 型、B5 型、B13 型、埃可病毒 30 型。
- 4.抗干扰物质：对于可能存在检测干扰的粘蛋白、血红蛋白阳性样本，检测结果均为阳性。
- 5.阳性参考品符合率：检测企业阳性参考品（P1~P8），阳性符合率为 8/8。
- 6.阴性参考品符合率：检测企业阴性参考品（N1~N8），阴性符合率为 8/8。
- 7.最低检出限参考品符合率：重复检测企业最低检出限参考品（L）10 次，阳性符合率为 10/10。
- 8.精密度参考品符合率：重复检测企业精密度参考品（J1 和 J2）10 次，阳性符合率均为 10/10，Ct 值的变异系数 CV 均≤5%。

【注意事项】

- 1.本产品仅用于体外诊断。
- 2.使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。临床基因扩增实验室应该分为三个区域,并且各个区域应具有以下表格中的必备物品，各区的仪器、耗材、试剂等独立专用。

PCR 准备区 (PCR 反应体系配制区)	样本处理区 (样本处理、加样区)	检测区 (PCR 扩增、荧光检测、结果分析区)
迷你离心机 旋涡混合器 冰箱(4℃；-20℃) 移液器一套 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套，无菌吸头、离心管、PCR 反应管 紫外灯 专用工作服和办公用品	生物安全柜 台式高速离心机 旋涡混合器 冰箱(4℃；-20℃) 移液器一套 紫外灯 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套，无菌吸头、离心管	荧光定量 PCR 仪 紫外灯 专用工作服 办公用品 无粉乳胶手套

	专用工作服和办公用品	
--	------------	--

- 3.操作人员应经过以下专业培训，具有合格的操作技能方能上岗。
- a.本产品说明书要求的操作培训。
- b.临床基因扩增实验室各个区域仪器设备的操作培训。
- c.《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》法规的安全防护培训。
- 4.请自备移液器，振荡器，迷你离心机，离心机，干式恒温仪或水浴锅，无菌吸头、离心管，PCR 反应管及无粉一次性乳胶手套（经常更换）。
- 5.样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。
- 6.样本操作和处理需符合相关法规要求：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》。
- 7.实验后的废弃物，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
- 8.试剂盒中的阳性质控品是体外纯化的质粒，无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
- 9.样本核酸提取完毕后，建议立即进行检测，否则请保存于-20℃，并且在 24 小时内进行检测。
- 10.实验完毕后使用 5%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪表面，然后紫外灯照射至少 30 分钟。
- 11.不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒。不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断器械
	注意！查阅随附文件
	保护环境

【参考文献】

- [1]信洪武,郭志刚. 肠道病毒持续性感染与人类慢性疾病的病因学联系[J]. 国外医学.病毒学分册. 1995(01)
- [2]叶鸿瑁. 新生儿肠道病毒感染[J]. 实用医院临床杂志. 2005(03)
- [3]何雅青,肖性龙,杨洪,张海龙,姚相杰,阳帆. 实时荧光 RT-PCR 及 RT-PCR 快速检测肠道病毒 71 型和柯萨奇 A16 病毒[J]. 中国卫生检验杂志. 2008(12)

[4]Chien-Hui Hsu,Chun-Yi Lu,Pei-Lan Shao,Ping-Ing Lee,Chuan-Liang Kao,Ming-Yi Chung,Luan-Yin Chang,Li-Min Huang. Epidemiologic and clinical features of non-polio enteroviral infections in northern Taiwan in 2008[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection . 2011 (4)

[5]Oberste MS,Nix WA,Maher K,et al.Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. J Clin Virol . 2003

[6]Jartti T,Lehtinen P,Vuorinen T,et al.Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. Emerging Infectious Diseases . 2004

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

网址：www.bioresource.com.cn

生产许可证编号：京食药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400486

【说明书核准及修改日期】