

肠道病毒通用型核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

[产品名称]

通用名称：肠道病毒通用型核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

[包装规格]

32 人份/盒

[预期用途]

本试剂盒用于体外定性检测人的咽拭子、疱疹液和粪便样本中的肠道病毒核酸。

手足口病是由肠道病毒引起的传染病，多发生于 5 岁以下儿童，可引起手、足、口腔等部位的疱疹，少数患儿可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症。个别重症患儿如果病情发展快，导致死亡。引发手足口病的肠道病毒有 20 多种（型），柯萨奇病毒 A 组的 16、4、5、9、10 型，B 组的 2、5 型，以及肠道病毒 71 型，均为手足口病较常见的病原体，其中以柯萨奇病毒 A16 型（Cox A16）和肠道病毒 71 型（EV 71）最为常见。

本试剂盒为手足口病患者的诊断提供辅助手段。检测结果仅供临床参考，最终诊断应紧密结合其他临床指标综合考虑。

[检验原理]

本检测试剂盒采用 PCR 方法结合荧光探针的体外扩增检测技术，PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团 FAM 和一个淬灭荧光基团 TAMAR。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，Taq 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步，从而对手足口病患者的咽拭子、疱疹液和粪便样本中的肠道病毒核酸实现定性检测，为手足口病患者的诊治提供辅助手段。

[主要组成成分]

组成	成分	规格	数量
核酸提取液	Trizol 试剂（异硫氰酸胍）	11mL/瓶	1 瓶
核酸反应液	由肠道病毒通用型病毒特异性引物、探针、dNTP，镁离子，Taq 酶，UNG 酶按一定比例	700 μ L/支	1 支
逆转录酶	逆转录酶、Rnasin 抑制剂	11 μ L/支	1 支
强阳性对照品	肠道病毒通用型的假病毒由样本稀释液稀释	60 μ L/支	1 支
弱阳性对照品	肠道病毒通用型的假病毒由样本稀释液稀释	60 μ L/支	1 支
阴性对照品	甘油生理盐水溶液	60 μ L/支	1 支
无 RNase 和 DNase 水	经去除 RNase 和 DNase 处理的水	1800 μ L/	1 支
荧光定量 PCR 八联反应		条	4 条

实验过程中必须用到但试剂盒未提供材料如下：

氯仿（-18℃以下预冷），异丙醇（-18℃以下预冷），无 RNase 和 DNase 水（4℃预冷），75%乙醇（无 RNase 和 DNase 水配制，-18℃以下预冷），1×PBS 缓冲液（无 RNase 和 DNase 水配制），1.5mL 无 RNase 和 DNase 离心管，无 RNase 和 DNase Tip 头。

各区域内必备物品一览表（仅供参考）

PCR 前准备区	样本处理区	检测区
1. 离心机	1. 离心机	1. 荧光 PCR 检测仪
2. 混匀器	2. 混匀器	2. 紫外灯
3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 专用工作服、实验用品、一次性手套
4. 微量加样器一套	4. 微量加样器一套	
5. 离心管架	5. 离心管架	
6. 消耗品：一次性手套，带滤芯吸头、离心管和玻璃器皿	6. 消耗品：一次性手套，带滤芯吸头，离心管和玻璃器皿	
7. 紫外灯	7. 紫外灯	
8. 专用工作服和实验用品	8. 专用工作服和实验用品	

【储存条件及有效期】

本试剂盒应储存于-18℃以下的避光条件下，有效期 9 个月（请于有效期内使用）。

“生产日期”、“有效期至：”见标签

【适用仪器】

ABI7300 荧光定量 PCR 仪和 ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本来源：新鲜采集的咽拭子、疱疹液和粪便标本。
2. 储存：24 小时内无法检测的标本采集好后立即放置于冻存管中，标记好样本名称（或编号）及类型，置于-70℃以下保存。标本应设立专库或专柜单独保存。
3. 运输：建议采取液氮、干冰的超低温运输。具体参见卫生部发布的《手足口病预防控制指南（2009 版）》。

【检验方法】

1. 样本处理

a) 将咽拭子或疱疹液标本的采样棉签放入 1.5mL 无 RNase 和 DNase 离心管内，加入 1mL 1×PBS 缓冲液，用无菌镊子挤压棉签头部，或采用移液器反复吹吸，使棉签上的咽拭子或体液中的样本充分溶解到缓冲液中，尽量吸干棉签上的液体，取出棉签放入一新的 1.5mL 无 RNase 和 DNase 离心管中，冻存。按照每克粪便加 1mL 1×PBS 缓冲液的比例往粪便样本中加入 PBS 缓冲液，充分振荡混匀，4℃ 13000rpm 离心 5min，吸取上清，并保存-18℃以下。

b) 从 a) 中处理过的咽拭子或体液浸液或粪便悬液上清中取 200 μL (疱疹液不足 200 μL 时请补加适量的 PBS 液) 和各 25 μL 阴性对照品、弱阳性对照品和强阳性对照品分别加入 1.5mL 无 RNase 和 DNase 的离心管

中，剩余的样本处理液放入-70℃以下保存。加入300 μL核酸提取液于管内，振荡混匀，然后再加入-18℃以下预冷200 μL氯仿，振荡混匀5秒，室温放置2min，4℃，13000rpm离心5min。

c) 将步骤b)的上清转入另一1.5mL无RNase和DNase的离心管中，加入等体积的-18℃以下预冷的异丙醇，振荡混匀，4℃，13000rpm离心5min，弃去上清。

d) 向沉淀中加入600 μL-18℃以下预冷的75%乙醇溶液，振荡混匀，4℃，13000rpm离心5min，弃上清，开盖室温干燥5min，使残留的乙醇挥发干净。

e) 向沉淀中加入50 μL无RNase和DNase水，振荡混匀，立即用于检测或放入-70℃以下保存待测。

注：标本处理和RNA提取亦可参照卫生部发布的2008版《手足口病预防控制指南》附件3中手足口病实验室检测方案中相关方法。

2. 扩增试剂准备

从试剂盒中取出核酸反应液，于冰上溶解后，振荡混匀。向荧光定量 PCR 八联反应管中加入 19.7 μL 核酸反应液和 0.3 μL 逆转录酶，压紧管盖，迅速将其转移至样本处理区，操作应在冰上进行。剩余的核酸反应液和逆转录酶立即放入-18℃以下冻存。

3. 加样

在所设定各荧光定量 PCR 八联反应管中分别加入步骤 1 中提取的 RNA 各 10 μL，操作应在冰上进行，压紧管盖，2000rpm 离心 10sec。将荧光定量 PCR 八联反应管放入荧光 PCR 检测仪内，记录加样顺序。

4. PCR 扩增

PCR 反应条件设置：

设置 ABI7300PCR 仪和 ABI7500PCR 仪的程序：50℃ 30min 1 cycle；95℃15min 1 cycle；95℃15sec，58℃ 45sec* 40 cycles（*为荧光信号采集步骤）。

仪器检测通道选择：

发光荧光基团为 FAM 荧光素，淬灭荧光基团为 TAMAR 荧光素，参考荧光基团为 ROX 荧光素，具体检测通道设置参照各仪器使用说明。

[阳性判断值]

阈值（threshold）设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照曲线（无规则的噪音线）的最高点为准。

基线（baseline）的选择：如果待检样本中最小 Ct 值>18，基线的起始点（循环数）默认为 3 和 15，接收默认的分析结果，如果待检样本中最小 Ct 值<18，基线的终点改为[最小的 Ct 值-4]分析结果。

样本重复检测必须严格按照说明书的检验方法要求操作。

1. 如果扩增曲线呈 S 型曲线，且阴性对照品的 Ct 值应为 0 或无数值、弱阳性对照品的 Ct 值≥30 并且≤38，强阳性对照品的 Ct 值应≤26，则本次试验有效，否则试验无效。
2. 如果扩增曲线呈 S 型曲线，且检测样本 Ct 值≤38，为检测阳性。
3. 如果扩增曲线不呈 S 型曲线，且检测样本 Ct 值为 0 或无数值时，为检测阴性。
4. 如果扩增曲线呈 S 型曲线，且检测样本 Ct 值>38 时，需重新检测。若重新检测的 Ct 值>38，则报告

为检测阳性；若重新检测的 Ct 值为 0 或无数值时，为检测阴性。

[检验结果的解释]

检测为阴性，并不代表该患者为非感染患者，具体诊断结果须结合其他临床诊断结果判断。造成检测为阴性的可能是：①不合理样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低，②病毒检测靶序列的变异，③未经验证的其他干扰因素如：服用抗病毒药物等，④患者为非其他病毒或细菌引起的感染。

[检验方法的局限性]

1. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，很容易出现假阳性结果。因此，PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
2. 样本中残留的蛋白质成分对 PCR 扩增有抑制作用，在步骤 1.样本处理的 c) 中取上清时应避免吸入白色沉淀物质。

[产品性能指标]

1. 试剂盒外观完好，各试剂瓶装量正确。
2. 阴性对照的 Ct 值应无数值；强阳性对照的 Ct 值应 ≤ 26 ；弱阳性对照的 Ct 值应 ≥ 30 并 ≤ 38 。
3. 使用本试剂盒检测企业阳性质控品 P1~P6 结果不得出现假阴性；检测肠道病毒 EV71 型核酸检测试剂国家阳性参考品 PC1~PC6 结果均为阳性；柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂国家参考品 P1~P9 结果均为阳性。
4. 使用本试剂盒检测企业阴性质控品 N1~N8 结果不得出现假阳性；肠道病毒 EV71 型核酸检测试剂国家阴性参考品 NC1~NC8，结果 NC1~NC6 为阳性，NC7、NC8 为阴性；柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂国家阴性参考品 N1~N8，结果 NC1~NC3 为阳性，NC4~NC8 为阴性。
5. 使用本试剂盒检测企业最低检测限质控品 S，重复检测 20 次，至少 18 次检出；检测肠道 EV71 病毒国家灵敏度参考品 S1~S5，检测 S1-S3 全部为阳性，S4、S5 仅供参考；检测柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂国家检测限参考品 S 的 10 倍梯度稀释后样本，检测 S1-S3 全部为阳性，S4 仅供参考。
6. 使用本试剂盒检测企业精密性质控品 1 和企业精密性质控品 2，各重复测定 10 孔，批内精密度均应达 $CV \leq 5.0\%$ ($n=10$)；肠道 EV71 病毒国家精密度参考品 10 倍稀释样本，重复检测 10 次，要求 10 次结果均为阳性，且其 CT 值的变异系数不高于 5.0%；检测柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂国家精密度参考品 (J) 稀释 100 倍后重复检测 10 次，要求 10 次结果均为阳性，且 CT 值的变异系数不高于 5%。
7. 经验证，本试剂盒检测试剂与人基因组及以下病原体不存在交叉反应：

名称	是否存在交叉反应
人基因组	否
轮状病毒	否
诺瓦克病毒	否

呼肠病毒	否
口蹄疫病毒	否
李斯特杆菌	否
霍乱杆菌	否

8. 本试剂盒可检测肠道病毒不同型别及亚型如下:

病毒名称	亚型
EV71 病毒	C1-C4
柯萨奇 (Cox) 病毒	A16、A4、A5

检测不同基因亚型的样本的相关系数的范围在 0.9800-0.9990 之间, 表明该试剂盒在线性范围内能有效的检测不同基因亚型样本。

9. 通过对三家临床试验单位的 1180 份临床试验数据综合分析, 北京华大吉比爱生物技术有限公司生产的肠道病毒通用型核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)相对于卫生部公布的引物系统检测的阳性一致百分比为 99.74%, 阴性一致百分比为 93.37%, 总一致性百分比为 97.54%, Youden 指数为 93.11%; SPSS 软件 Kappa 检验结果为 0.945, 表明两种试剂具有良好的等效性。

[注意事项]

- 手足口病样品具有传染性, 样品的采集、保存、运输、处理实验应遵循国家相应的管理规范 and 生物安全条例, 进行样本处理时必须做好相关的保护措施, 确保实验人员安全。
- 本试剂盒仅适用于体外检测。
- 实验区域请严格分区操作:
第一区: PCR 前准备区-准备扩增所需试剂;
第二区: 样本处理区-待测样本和对照品处理;
第三区: 检测区-PCR 扩增检测。
- 各区物品均为专用, 不得交叉使用, 避免污染; 实验后立即清洁工作台。
- 试剂盒内各试剂使用前, 充分融化并振荡均匀后请短暂离心。
- 70℃ 以下保存的提取 RNA, 应在加样前置冰上解冻, 短暂离心。样本中残留的蛋白质成分对 PCR 扩增有抑制作用, 在步骤 1. 样本处理的过程中取上清时应避免吸入白色沉淀物质。
- 分装有核酸反应液和逆转录酶的荧光定量 PCR 八联反应管应压紧管盖迅速转移至样本处理区。
- 加样时应使样品完全落入反应液中, 不应有样品黏附于管壁上, 加样后应尽快压紧管盖。
- 扩增完毕立即取出荧光定量 PCR 八联反应管, 密封在高压灭菌袋内无害化处理。
- 核酸反应液分装时应尽量避免产生气泡, 上机前注意检查各荧光定量 PCR 八联反应管是否盖紧, 以免荧光物质泄漏污染仪器。
- 实验中用过的 Tip 头请直接打入盛有 84 消毒液的废物缸内, 并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
- 工作台及各种实验用品定期用 1% 次氯酸钠、75% 乙醇或紫外灯进行消毒。

13. 实验中所用的离心管、Tip 头必须保证无 RNase 和 DNase。

14. 实验中所用过的离心管、Tip 头必须无害化处理。

[参考文献]

1) 王家良.《临床流行病学》人民卫生出版社, 2002。

2) 李东力等. 手足口病流行病学与防控对策. 沈阳部队医药. 2008。

3) 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南 (2008 年版)。

http://www.gov.cn/gzdt/2008-12/12/content_1176057.htm

4) Xiao XL et al. Simultaneous detection of human enterovirus71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control

[基本信息]

注册人/生产企业名称: 北京华大吉比爱生物技术有限公司

住所: 北京市海淀区永丰屯 538 号 1 号楼 236、237 室

售后服务单位名称: 北京华大吉比爱生物技术有限公司

联系方式:

电话: 0086-10-80492001

传真: 0086-10-80492118

邮编: 101300

网址: [http:// www.gbi.com.cn](http://www.gbi.com.cn)

E-mail: gbj-office@genomics.cn

生产地址: 北京市顺义区临空经济核心区裕华路 28 号 6 号 4 层, 8 号 2 层西侧, 12 号 3 层西, 12 号 1 层西侧

生产许可证编号: 京食药监械生产许 20060069 号

[医疗器械注册证编号/产品技术要求编号]

国械注准 20163401202

[说明书核准日期及修改日期]

核准日期: 2016 年 06 月 29 日

修改日期: 2017 年 11 月 09 日

修改日期: 2021 年 08 月 27 日