

肠道病毒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：肠道病毒通用型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】 50 人份/盒

【货 号】 JC20101

【预期用途】

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。通过以FAM标记的肠道病毒通用型探针，在反应体系中检测肠道病毒。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	625μl×1 管	Tris、KCl、dNTPs、MgCl ₂
酶混合液	50μl×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶
肠道病毒通用型反应液	200μl× 1 管	引物、探针
肠道病毒通用型阳性对照	300μl× 1 管	灭活的 EV71 型病毒培养液
去 RNA 酶水（空白对照）	500μl× 1 管	焦碳酸二乙酯

备注：不同批号间的试剂不能互换。

【储存条件及有效期】

避光-20℃贮存，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、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI7500、Qiagen Rotor Gene6000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. 样本处理（包含待测样本、阳性对照及空白对照）

用 Qiagen公司的QIAamp RNA Mini Kit或者Roche公司的高 Pure Viral Nucleic Acid Kit RNA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. 试剂准备

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、肠道病毒通用型反应液、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	12.5
酶混合液	1
肠道病毒通用型反应液	4
去 RNA 酶水（空白对照）	2.5
总体积	20

3. 加样

在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入处理好的待测标本 RNA、空白对照、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。

4. PCR扩增检测

4.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

4.2 ABI7500操作说明

4.2.1 循环参数设定

步骤	温度	时间	循环数（次）
1	逆转录反应	50℃	30 min
2	预变性	95℃	5 min
3	变性	95℃	10 s
	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			

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

4.2.2 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。

4.3 Qiagen Rotor Gene6000操作说明

4.3.1 循环参数设定

步骤	温度	时间	循环数（次）
1	逆转录反应	50℃	30 min
2	预变性	95℃	5 min
3	变性	95℃	10 s
	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：Green			

4.3.2 结果分析

反应结束自动保存结果，点击Analysis自动获得分析结果，根据分析后图像调节Eliminate cycles值以及Threshold值（可以根据实际情况自行调整，调整空白对照的扩增曲线平直或低于阈值线），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参考值为CT值等于35.5。

【检验结果的解释】

质量控制

1. 空白对照：无典型S型扩增曲线显示。
2. 阳性对照：呈典型S型扩增曲线或CT值≤30。
3. 以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

在仪器正常，空白对照、阳性对照均正常的情况下进行结果分析：

1. 扩增曲线呈典型S型曲线且CT≤35.5，判断为肠道病毒阳性。
2. 无典型S型扩增曲线或CT>35.5，此次结果判断为阴性。

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】

本试剂盒用于体外定性检测人咽拭子样本中肠道病毒核酸的检测，不能进行分型。本试剂盒不包含内标存在假阴性的可能。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】

灵敏度：使用CCID50标定法为 2.0×10^{-2} CCID₅₀/0.1ml；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）无交叉反应。

【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；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. 标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实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] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Dierssen 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.
- [5] 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 网址 www.s-sbio.com

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 网址 www.s-sbio.com

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），泰州市医药高新区药城大道837号

【生产许可证编号】苏食药监械生产许20100121号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20163401200

【说明书核准日期及修改日期】2022年05月28日