

【产品名称】
通用名称：肠道病毒 EV71/CA16 核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】 大包装，10 人份/盒；大包装，48 人份/盒；单管单人份，10 人份/盒。

【预期用途】
本品用于体外定性检测粪便、咽拭子、肛拭子样本中肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型。
手足口病（hand, foot and mouth disease, HFMD）在近年儿童中常见流行,由肠道病毒感染引起,主要表现口腔黏膜溃疡性疱疹及四肢末端水疱样皮疹,主要病原为柯萨奇病毒 A16 型（CA16）和肠道病毒 71 型（EV71），二者所致的手足口病临床难以区别。其中，EV71 不仅引起手足口病,而且可引起严重中枢神经系统并发症，如脑膜炎、脑炎、急性迟缓性瘫痪等。实现对肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒 A16 型的检测有利于疫情监测以及制定有效的预防控制措施。
本试剂盒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。

【检验原理】
本试剂盒利用一步法实时荧光 PCR 技术，分别以肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型基因编码区的高度保守区为靶区域，分别设计特异性引物及荧光探针，进行一步法 RT-PCR 多重扩增，用于样本中肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型 RNA 的同步定性检测。另外，本试剂盒带有内标物质，用于对核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装 10 人份/盒)	EV71/CA16 PCR 反应液 A	170μL/管	1	特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer
	EV71/CA16 PCR 反应液 B	30μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
	EV71/CA16 内标溶液	120μL/管	1	含内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (大包装 48 人份/盒)	EV71/CA16 PCR 反应液 A	816μL/管	1	特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer
	EV71/CA16 PCR 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
	EV71/CA16 内标溶液	240μL/管	1	含内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (单管单人份)	EV71/CA16 PCR 反应管（未贴标签管）	1 人份/管	10	特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer、热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
	EV71/CA16 内标溶液	120μL/管	1	含内标片段的假病毒
质控品 (适用于大包装、单管单人份)	阴性质控品	200μL/管	1	生理盐水
	EV71/CA16 强阳性质控品	200μL/管	1	含 EV71/CA16 目的片段的假病毒
	EV71/CA16 临界阳性质控品	200μL/管	1	含 EV71/CA16 目的片段的假病毒

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】
试剂盒保存于-20±5℃环境下，有效期 9 个月。
PCR 检测试剂反复冻融次数不应超过 7 次；各组分开瓶次数不应超过 7 次；试剂盒在 25℃时运输不应超过 3 天。产品的生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】 ABI 7500、Roche LightCycler480。

【样本要求】
1 适用样本类型：粪便、咽拭子、肛拭子。
2 样本采集、保存和运送
样本采集对象为手足口病、疱疹性咽峡炎等患者或疑似患者，特别是发病所在地的社区或托幼机构的 5 岁以下的儿童。
样本可采集粪便、咽拭子和肛拭子。临床样本在运输和贮存过程中要避免反复冻融，如果不能确保-20±5℃的条件，应该在 0~8℃运输和保存。样本应冷冻运输，运输时要附有必要的信息，如样本编号、发病日期和样本采集日期。
2.1 粪便样本：采集病人发病 7 日内的粪便样本，粪便样本采集量 5~8g/份，采集后立即放入无菌采便管内。
2.2 咽拭子样本：采集病人发病 3 日内的咽拭子样本，用专用采样棉签，适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将棉签放入装有 3~5mL 保存液（维持液或生理盐水，推荐使用维持液）的采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，以防干燥。
2.3 肛拭子：可用棉拭子由肛门插入直肠内采取：小孩插入直肠内 1~3cm 采样，成人插入直肠内3~5cm 采样，使拭子变成湿润并染有一些粪便颜色。将棉球或拭子放入无菌离心管密闭送检或培养后送检。
2.4 样本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试，或保存于-20±5℃待测，保存期为 6 个月，标本应避免反复冻融。标本运送采用0℃冰壶或加冰并以泡沫箱密封，低温运输时间不 应超过8h，长途运输建议采用干冰以保持低温。

【检验方法】
1 样本处理和核酸提取（样本处理区）
可采用本公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法）（产品编号：Cat. #DA-Z146），具体操作步骤请按照试剂盒说明书指引进行。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，所以须配套提取试剂使用。
本试剂盒中的阴性质控品和EV71/CA16强阳性质控品、EV71/CA16临界阳性质控品均参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。
2 PCR 试剂准备（试剂准备区）
2.1 大包装规格试剂使用：
从试剂盒中取出EV71/CA16 PCR 反应液 A、EV71/CA16 PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。
取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+ EV71/CA16 临界阳性质控品+EV71/CA16 强阳性质控品）PCR 反应管。
EV71/CA16 单人份扩增体系配制如下表：

EV71/CA16 PCR 反应液 A	EV71/CA16 PCR 反应液 B	扩增体系
17μL	3μL	20μL

将各组分充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 单管单人份规格试剂使用：直接使用 EV71/CA16 PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

3.1 往上述对应的 EV71/CA16 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品核酸、EV71/CA16临界阳性质控品核酸、EV71/CA16强阳性质控品核酸5μL，盖紧管盖，8,000g 离心数秒后转移至扩增 检测区。

3.2 ABI Prism 7500 仪器设置

3.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1：FAM，Quencher Dye1：none；Reporter Dye2：VIC，Quencher Dye2：none；Reporter Dye3：CY5，Quencher Dye3：none；Passive Reference：NONE。

3.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

50℃ 15 分钟，1 个循环；95℃ 15 分钟，1 个循环；94℃ 15 秒→55℃ 45 秒（收集荧光），45 个循环。设置完成后，保存文件，运行程序。

3.3 LightCycler480 仪器设置

3.3.1 点击软件主界面的“New Experiment”，进入程序设定界面。

3.3.2 检测模式设置：从 Detection Format 的下拉框中选择分析模式：Multi Color Hydrolysis Probe，“Customizes”模块中选择 483-533、523-568、615-670 滤片组合，“Block Type”为仪器自动检测，“Plate ID”可手工输入或扫描仪扫描，“Reaction Volume”设定为 25ul。

3.3.3 循环参数：定义 PCR 程序中每个步骤（Program Name）及循环数(Cycles)和分析模式(Analysis Mode),利用“+”和“-”增加或删除步骤，扩增参数如下：

50℃ 15 分钟，1 个循环；95℃ 15 分钟，1 个循环；94℃ 15 秒@55℃ 45 秒，45 个循环；（此步采集荧光信号：“Analysis Mode”选择“Quantification”，“Acquisition Mode”选择“Single”）40℃ 10 秒，1 个循环；

3.3.4 填样品表：点击“Sample Editor”模块，进入样本信息编辑界面，在“Select Workflow”中选择“Abs Quant”，在“Sample Name”列中定义样本名称,在“Sample Type”栏中选定样品类型：阴性质控品选 NTC；未知样品选Unknown。

3.3.5 运行程序：点击“Experiment”模块，回到程序设定界面，点击窗口右下方的“Start Run”，弹出结果保存窗口，输入文件名和路径后进入程序运行界面。

4 结果分析

- 4.1 反应结束后保存检测数据文件。
- 4.2 分析条件设置：根据分析后图像调节Baseline 的 start 值、stop 值以及 Threshold 的 Value 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，调整阴性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。

5 质量控制

	FAM 通道	VIC 通道	CY5 通道	结果判定
阴性质控品	Undet 或 No Ct	Undet 或 No Ct	有扩增曲线	阴性
EV71/CA16临界阳性质控品	Ct 值≤36.0	Ct 值≤36.0	有或无扩增曲线	阳性
EV71/CA16强阳性质控品	Ct 值≤28.0	Ct 值≤28.0	有或无扩增曲线	阳性

以上要求需在同一实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

6 结果判定

- 6.1 若检测样品同时满足 a 和c 条件则可判样品为 EV71 阴性；若检测样品同时满足 b 和c 条件则可判样品为 CA16 阴性。
- a. FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值>44 或无扩增曲线，
- b. VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值>40 或无扩增曲线，
- c. CY5 检测通道有扩增曲线。
- 6.2 若检测样品在 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤44，CY5 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为 EV71 阳性；
- 6.3 若检测样品在 VIC 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤40，CY5 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为 CA16 阳性；

【阳性判断值】 通过临床样本检测结果分析，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的参考值为：EV71 的 CT 值为 44，CA16 的 CT 值为 40。

【检验结果的解释】

- 1 每次实验均需检测阴性质控品，EV71/CA16临界阳性质控品及EV71/CA16强阳性质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定；
- 2 阴性结果判定标准如下表：

	FAM 检测通道	VIC 检测通道	CY5 通道	结果判定
EV71 阳性结果判定	Ct 值≤44		有或无扩增曲线	EV71 阳性
CA16 阳性结果判定		Ct 值≤40	有或无扩增曲线	CA16 阳性

- 3 阴性结果判定标准如下表：

	FAM 检测通道	VIC 检测通道	CY5 通道	结果判定
EV71 阴性结果判定	Ct 值>44 或无扩增曲线		有扩增曲线	EV71 阴性
CA16 阴性结果判定		Ct 值>40 或无扩增曲线	有扩增曲线	CA16 阴性

- 4 报告建议采用以下格式：
- 阴性结果报告格式为：样本未检测到 EV71 或 CA16 病毒 RNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
- 阳性结果报告格式为：样本检测到 EV71 或 CA16 病毒 RNA。

【检测方法的局限性】

- 1 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关；
- 2 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 3 病毒在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果；
- 4 由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时核酸提取效率存在一定差异，本试剂盒使用本公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法）（产品编号：Cat. #DA-Z146）；
- 5 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

- 1 阴阳性符合率：
- （1）检测 EV71、CA16 国家阳性参考品，符合要求；或10 份企业阳性参考品符合率 100%（10/10）；
- （2）检测 EV71、CA16 国家阴性参考品，符合要求；或10 份阴性参考品符合率 100%（10/10）。
- 2 最低检出限：1.0×10³ copies/mL；检测 EV71、CA16 国家最低检出限参考品，符合要求。
- 3 分析特异性：
- 3.1 与以下病原体临床样本（浓度为 1.0×10⁴copies/mL）无交叉反应：
- | | | | |
|----------|------------|------------|------------|
| 埃可病毒 | 柯萨奇病毒 B2 型 | 柯萨奇病毒 B3 型 | 柯萨奇病毒 B5 型 |
| 脊髓灰质炎病毒 | 乙脑减毒活疫苗 | 腮腺炎病毒 | HSV-1 病毒 |
| HSV-2 病毒 | 水痘病毒 | 腺病毒 VII 型 | 风疹病毒 |
| 麻疹病毒 | 腺病毒 III 型 | 副流感病毒 2 型 | 副流感病毒 3 型 |
- 3.2 干扰反应：胆红素（0.1 mg/mL）、肌红蛋白（1mg/mL）、胃蛋白酶（5mg/mL）等内源性物质不干扰试剂盒检测结果；样本中可能存在药峰浓度的甲基泼尼松龙（2mg/mL）、氢化可的松（5mg/mL）、地塞米松（0.5mg /mL）不干扰试剂盒检测结果。
- 4 批内精密度及批间精密度：ct 值的CV%均小于 10%；检测 EV71、CA16 国家精密度参考品，符合要求。
- 5 对比试验研究：临床试验结果显示，本试剂盒的阳性符合率为 98.6%，阴性符合率为 99.5%，总符合率为 99.1%。

【注意事项】

- 1 产品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书；
- 2 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
- 3 产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；
- 4 全程应避免 RNA 酶污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
- 5 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
- 6 PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
- 7 如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
- 8 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 9 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
- 10 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20±5℃待用(24h 内)；
- 11 所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 12 须对每次实验进行质量控制。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】