

附件 1

手足口病标本采集及检测技术方案

一、采集标本的种类、保存和运输

（一）粪便标本。

采集病人发病 3 日内的粪便标本，用于病原检测。粪便标本采集量 5-8g/份，采集后立即放入无菌采便管内，外表贴上带有唯一识别号码的标签，4℃暂存 12 小时内送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

（二）咽拭子标本。

采集病人发病 3 日内的咽拭子标本，用于病原检测。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（含 5%牛血清维持液或生理盐水，推荐使用维持液）的 15ml 外螺旋盖采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，以防干燥，外表贴上带有唯一识别号码的标签。4℃暂存并在 12 小时内送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

（三）血清标本。

各省（区、市）在手足口病流行年份中均应采集 EV71 和 CVA16 感染的手足口病患儿的双份血清。采集急性期（发病 0-7d）和恢复期（发病 14-30d）双份配对血清用于阐明和分析 EV71 和 CVA16 感染后 IgG 和 IgM 抗体的动态变化，评价血清学抗体试剂盒的敏感性和特异性。静脉采集 3-5ml 全血，置于真空无菌采血管中，自凝后，分离血清，将血清移到 2ml 外螺旋的血清保存管中，外表贴上带有唯一识

别号码的标签。将血清置于-20℃以下冰箱中冷冻保存。

（四）疱疹液。

在手足口病的实验室诊断中，从疱疹液中分离到病毒即可确诊该病毒为病因，可同时采集多个疱疹作为一份标本。先用 75%的酒精对疱疹周围的皮肤进行消毒，然后用消毒针将疱疹挑破用棉签蘸取疱疹液，迅速将棉签放入内装有 3-5ml 保存液（含 5%牛血清维持液或生理盐水，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，采样管外表贴上带有唯一识别号码的标签。所采集标本 4℃暂存立即（12h 内）送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

（五）肛拭子标本。

采集病人发病 3 日内的肛拭子标本，用于病原检测。用专用采样棉签，从患儿肛门轻轻插入，适度用力弧型左右擦拭数下，拔出后，迅速将棉签放入装有 3-5ml 保存液（含 5%牛血清细胞维持液）的 15ml 外螺旋的采样管中，采样管外表贴上带有唯一识别号码的标签。在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖，并密封，以防干燥。

（六）尸检标本。

采集脑、肺和肠淋巴结等重要组织标本，每一采集部位分别使用单独的消毒器械。每种组织应多部位取材，每部位应取 2-3 份约 5-10g 的组织，淋巴结 2 个，分别置于 15ml-50ml 无菌的有外螺旋盖的冻存管中，采样管外表贴上带有唯一识别号码的标签。

（七）脑脊液标本。

出现神经系统症状的病例，可采集脑脊液标本，进行病毒分离或核酸检测。采集时间为出现神经系统症状后 3 天内，采集量为

1.0-2.0ml。采集后立即装入无菌带垫圈的冻存管中，4℃暂存立即(12h内)送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。但EV71感染神经系统时，很难在脑脊液中检测到EV71病原。

临床标本在运输和贮存过程中要避免反复冻融。标本采集后要全程冷藏或冷冻保存和运输，12小时内送达实验室。依照《人间传染的病原微生物名录》，肠道病毒或潜在含有肠道病毒的标本按B类包装，置于冷藏保存盒内运输，尽量缩短运输时间。可采用陆路或航空等多种运输方式，但在运输过程中应采取保护措施，避免强烈震动、重力挤压等现象。在送到省、地、市级CDC实验室时，包装盒内应带冰且包装完整。在上送标本的同时，需附带相关的《手足口病病例临床标本采样登记表》。

二、标本采集注意事项

在手足口病的实验室诊断中，从疱疹液或脑脊液中分离到病毒即可诊断该病毒为病因。用于采集咽拭子的无菌拭子要放在标本保存液中，如含5%牛血清维持液。用于分子生物学诊断的标本采集与病毒分离标本的采集方法一样。为了保证检测结果的准确性和有效性，标本应在病例发病后尽早采集，尽快检测。不能立即检测的标本应冷冻保存。对于血清学诊断，急性期血清应该在发病后尽早采集，恢复期血清在发病两周后采集。标本保存液的配置见下表：

	保存液
Eagle's 液 (MEM)	80.5ml
3%-谷氨酰胺 200mM	1.0ml
胎牛血清	5.0ml

7.5%NaHCO₃溶液 3.5ml

青、链霉素 10ml

(各 10000U/ml)

三、实验室检测操作流程

(一) 病毒分离。

1. 试剂配置

(1) 细胞的生长液、维持液的配制见下表:

	生长液 (GM)	维持液 (MM)
Eagle's 液 (MEM)	86.5ml	92.5ml
3%L-谷氨酰胺 200mM	1.0ml	1.0ml
胎牛血清	10.0ml	2.0ml
7.5%NaHCO ₃ 溶液	2.5ml	3.5ml
青、链霉素	1.0ml	1.0ml
(各 10000U/ml)		

(2) 粪便标本和肛拭子的处理液

完全 PBS 液中加入 P. S 溶液, 终浓度为青霉素 100 单位/ml, 链霉素为 100 μ g/ml。

完全 PBS 液的配置: 取以下 1 份 B 液和 1 份 C 液加到 8 份 A 液中即为完全 PBS 工作液。

A 液:

试剂品名	加入量
NaCl	8.00g
KCl	0.20g
Na ₂ HPO ₄ (无水)	0.91g
KH ₂ PO ₄	0.12g

用 600~800ml 蒸馏水溶解以上盐类, 加蒸馏水补至 1000ml, 10psi (70Kpa) 15 分钟高压灭菌, 即为不完全 PBS 工作液(不含钙、镁离子)。

B 液:

试剂品名	加入量
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.10g

溶解于 100ml 蒸馏水中，10psi（70Kpa）15 分钟高压灭菌。

C 液：

试剂品名	加入量
CaCl ₂	0.10g

溶解于 100ml 蒸馏水中，10psi（70Kpa）15 分钟高压灭菌。

2. 病毒分离细胞系

许多细胞系可支持人肠道病毒（如 EV71、CVA16）生长。

对于检测手足口病的病原来说，建议所有怀疑含 EV71、CVA16 等肠道病毒感染的标本均需接种到以下两种细胞系：

- RD 细胞，来源于人横纹肌肉瘤细胞。
- HEp-2 细胞，来源于人喉癌上皮细胞。

3. 标本的处理

（1）粪便标本和肛拭子的处理

操作步骤：

- 1) 在离心管上标记标本号；
- 2) 每管中加入 10ml PBS、1g 玻璃珠、1ml 氯仿；
- 3) 在生物安全柜中将每一份粪便标本取大约 2g 加入标记好的离心管中（确保离心管上的标号与原始标本的标号一致）；肛拭子为 2ml；
- 4) 剩余的原始标本最好留在原容器中，冻存于 -20℃；
- 5) 确保拧紧离心管，用机械震荡器剧烈震荡 20min；
- 6) 在确保离心机的盖子盖好和离心桶密封的情况下，用冷冻离心机在 1500g 条件下离心 20min；
- 7) 在生物安全柜中将每 1 份标本的上清液分别吸入 2 个有外螺旋盖的冻存管中（如果上清液不清澈，应再用氯仿处理 1 次）；
- 8) 1 管粪便悬液冻存于 -20℃ 作为备份，另 1 管存于 4-8℃ 以

备接种。

(2) 疱疹液标本的处理

疱疹液标本通常直接用于 RNA 提取或病毒分离。

(3) 脑脊液标本的处理

脑脊液标本通常直接用于病毒分离。

(4) 咽拭子标本的处理

咽拭子要在标本运输（保存）液中充分搅动（至少 40 下），以洗下拭子上粘附的病毒及含有病毒的细胞等，用于病毒分离时，需要冻融一次（防止多次冻融），使细胞破裂，释放病毒颗粒。然后在 4℃ 条件下，10000 rpm 离心 20min，用上清接种到细胞上或直接提取 RNA。如果发现有细菌污染，须用滤器过滤除菌。

4. 接种和观察（病毒分离）

(1) 通常使用 8 ml 的斜面试管培养细胞，传细胞时，每管加细胞培养液 1.5ml。显微镜下观察单层细胞，以确保细胞是健康、无污染的。一个健康的单层细胞会在传代后 48 小时左右形成；

(2) 倒掉生长液（GM），换上 1-1.2ml 的维持液（MM）；

(3) 每一份标本需要同时接种 2 支 RD 细胞和 2 支 HEp-2 细胞，正确标记每支细胞培养管（包括标本的编号、日期、传代数）；

(4) 每一种细胞至少标记一管作为阴性对照；

(5) 每支试管接种 0.2ml 的标本悬液，培养温度要求 36℃。

（或者使用吸附的方法接种病毒：接种标本前，倒掉生长液（GM），每支试管接种 0.2ml 的标本悬液，培养温度为 36℃；吸附 1 小时后，换上 1.5ml 的维持液（MM）。同样每份标本需同时接种 2 支 RD 细胞和 2 支 HEp-2 细胞。

(6) 使用倒置显微镜每天观察细胞培养管，以观察有特征性的肠道病毒致细胞病变效应 (CPE) 的出现 (如细胞变圆，折光增强并脱离管壁等)；

(7) 记录接种管和对照管细胞所发生的变化至少一周，记录 CPE (1+—4+)、提示细胞受毒性反应、老化或污染的影响而发生的变化 (1+, <25%; 2+, 25%—50%; 3+, 50%—75%; 4+, 75%—100%);

(8) 如果有特征性的肠道病毒 CPE 出现，要如实记录，并观察直到 75% 的细胞发生变化 (3+ CPE)，然后储藏在 -20℃ 以备二次传代；

(9) 第一代培养见可疑细胞病变时应继续传代，待细胞病变稳定出现后 -20℃ 或 -70℃ 冻存；

(10) 一代阳性分离物再传二代，如果又有明显的 CPE 出现，将病毒保存在 -20℃ 冰箱 (二代病毒)。因二代病毒滴度高于一代病毒，所以选用二代病毒进行鉴定；

(11) 如果 7d 之后没有 CPE 出现，那么盲传 1 代继续观察 7d。(注意：同一病例标本的细胞培养物不能混在一起再传代，例如：不同细胞的培养物应单独传代)；

(12) 盲传两代后，仍然没有出现 CPE 的，则判定为阴性；

(13) 注意：如果接种后 24h 内出现 CPE，很可能是标本中的非特异性成分导致的毒性反应。取 100 μ l 阳性分离物传二代，继续观察；或者在接种标本吸附 1h 后用维持液清洗细胞层，可能会降低毒性反应；

(14) 几个概念：

A: 毒性反应：如果在接种后 1-2d 内细胞快速凋亡，这可能是由于标本中含有毒性物质而导致的非特异性毒性反应。这些已接种标本的试管应在 -20℃ 冻存，融化后取 0.2ml 接种到同一类型细胞中 (此

时是第二代)。如果又出现了毒性反应,那么应该取原始标本用 PBS 稀释 10 倍,再次接种到同种细胞中。这时应被认为是第一代。

B: 微生物污染: 由于细菌污染而造成培养液混浊或细胞死亡经常使病毒造成的 CPE 无法确定或根本无法出现。重新取原始标本,用氯仿或抗生素处理,按上述步骤重新接种到新鲜细胞上。

C: 盲传: 有时一周之后传代细胞会老化,甚至细胞对照也出现了病变。这时已接种标本的试管应在 -20°C 冻存,融化后取 0.2ml 接种到同一类型的新鲜单层细胞中,再观察 7-10d。如果盲传两代后仍然没有产生 CPE,那么认为这个标本是阴性的。

5. 病毒分离结果解释

RD 细胞支持 HFMD 的主要病原体——CVA16 和 EV71 等多种肠道病毒的复制,CVA16 和 EV71 均能在 RD 细胞培养中引起特殊的肠道病毒致细胞病变效应(CPE),表现为细胞圆缩、分散、胞浆内颗粒增加,最后细胞自管壁脱落。但相同滴度的 CVA16 和 EV71 在 RD 细胞中生长的速度不同, EV71 的生长速度要快于 CVA16,表现为 EV71 感染 RD 细胞后出现 CPE 的时间比 CVA16 早, EV71 接种细胞后出现 CPE 很快,但 CVA16 一般要经过 2 次以上传代才出现明显的 CPE。

若在使用 RD 细胞分离的同时再增加 HEp-2 细胞,可提高肠道病毒的分离率(分离出其他可能致 HFMD 的病原体,如一些柯萨奇 B 组病毒)。但 CVA16 和 EV71 在 HEp-2 细胞中均不繁殖。

(二) 测定人双份血清标本的中和抗体滴度。

比较患者急性期血清与恢复期血清中和抗体滴度,可作为肠道病毒感染血清学诊断方法,最常用的是中和实验,即用微量板法测定抗体滴度,是目前人肠道病毒抗体检测的最常用方法,该方法精确且

具有型特异性。

作为肠道病毒感染的诊断方法之一，可以测定血清中肠道病毒中和抗体的滴度，通常用急性期血清与恢复期血清滴度进行比较，抗体滴度 4 倍或 4 倍以上增高证明病毒感染。但是，肠道病毒隐性感染也很常见，所以在评估检测结果时就要小心一些。在中和实验中，一般要用人肠道病毒参考毒株（即原型株，EV71 原型株为 BrCr 株，CVA16 原型株为 G-10 株）或流行株，有时同时（或单独）使用临床分离株会有助于得到更准确的检测结果。

使用对肠道病毒敏感的细胞，如 RD 细胞。用病毒（血清）稀释液（下面液体配制中的 C 液，可用维持液代替）稀释血清和制备病毒悬液，因为是用病毒来确定血清中抗体的滴度，所以要使用参考病毒（原型株），但有时使用所分离到的毒株（临床分离株）有助于得到更准确的检测结果，但分离株的滴度（100 CCID₅₀/0.05ml）要事先测定。

中和实验的检测原理：病毒感染敏感靶细胞后，引起细胞形态学变化，出现 CPE，特异性中和抗体与病毒结合后，可使病毒颗粒失去感染性，抑制 CPE 的出现。

1. 液体配制

A 液：血清处理液：（100ml 中含下列试剂成份）

MEM	85ml
3% L-谷氨酰胺	1ml
7.5%碳酸氢钠	2ml
胎牛血清	2ml
青、链霉素（各 10000U/ml）	10ml

B 液：细胞营养液：（按生长液配方配制，100ml 中含下列试剂成

份)

MEM	85ml
3% L-谷氨酰胺	1ml
7.5%碳酸氢钠	2ml
HEPES	1ml
胎牛血清	10ml
青、链霉素 (各 10000U/ml)	1ml

C 液: 病毒 (血清) 稀释液: (按维持液配方配制, 100ml 中含下列液体)

MEM	93ml
3% L-谷氨酰胺	1ml
7.5%碳酸氢钠	2ml
HEPES	1ml
胎牛血清	2ml
青、链霉素 (各 10000U/ml)	1ml

2. 攻击病毒 CCID₅₀ 滴定和滴度梯度制备

(1) 将增殖后的病毒悬液冻融 3 次, 然后在 4℃、12000rpm 条件下离心 10min, 取上清液分装于 10 支冻存管中, 每管 1.5ml, 一般每管应在一次试验中用完, 有剩余应高压后废弃;

(2) 加 Eagle 液 10 倍系列稀释为 10⁻¹ 至 10⁻⁸ 病毒液, 各加入细胞板内, 每孔 50μl, 每稀释度 4 孔细胞;

(3) 每孔加细胞悬液 50μl, 同时设细胞对照 (50μl 稀释液+50μl 细胞悬液), 36℃培养 7d, 观察细胞病变;

(4) 按 Behrens-Kärber 公式计算出分离病毒株的 CCID₅₀;

$\log \text{CCID}_{50} = L - d (S - 0.5)$, 其中:

L = 实验中使用的最低稀释度的对数值;

d = 稀释梯度的对数值;

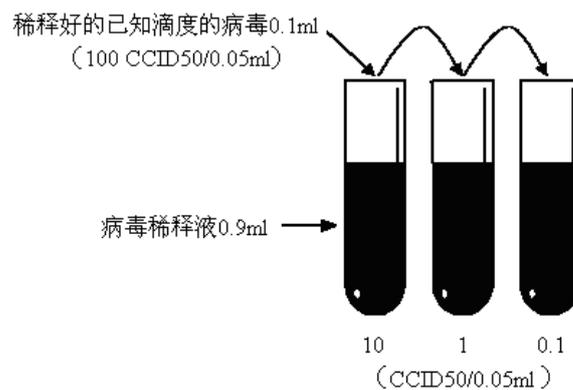
S = 终判时阳性部分的总和 (即出现 CPE 的细胞孔所占的比例之和)。

(5) 正式试验前应先滴定攻击病毒 2-3 次, 取其平均值, 求出每 0.05ml 中含 100 CCID_{50} 的病毒载量;

(6) 按照计算好的稀释比例配制攻击病毒, 求出试验所需的病毒总量 (即 100 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$);

(7) 取 3 支小试管, 每只加病毒稀释液 (液体配制中的 C 液) 0.9ml;

(8) 用带滤芯的吸尖 (ART 吸尖) 吸 0.1ml 已经稀释好的攻击病毒液 (即 100 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$) 到第一支小试管中, 换另一支 ART 吸尖, 轻轻并彻底地混匀, 避免产生大量气溶胶, 按照此方法依次稀释至 1 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$ 和 0.1 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$ 。



3. 稀释血清

(1) 发病 1-3d 内采取患者急性期血清, 发病后 2-4 周采取恢复期血清, 分别冻存在 -20°C 备检。

(2) 取无菌小试管若干支 (每份血清使用一支) 置试管架上, 每

管加血清处理液(上面液体配制中的 A 液) 0.3ml, 加待测血清 0.1ml, 盖紧塞子, 震摇混匀, 放 4℃ 冰箱过夜, 即为 1:4 稀释血清。次日 56℃、30min 灭活。

(3) 打开独立无菌包装 48 孔组织培养板, 纵向使用, 每孔加血清稀释液(上面液体配制中的 C 液) 0.3ml, 每份血清使用一排, 每排 4 孔。使用移液器吸取处理过的血清 0.1ml 加入第一孔(即为 1:16), 吹吸 8-10 次, 吸 0.1ml 加入第二孔(即为 1:64), 依次至 1:1024, 血清稀释的过程中不必更换吸尖。即每份血清标本进行 4 倍倍比稀释, 即 1:4、1:16、1:64、1:256、1:1024。

(4) 每份血清标本的每个稀释度都要平行做两孔。

4. 病毒中和抗体测定的操作步骤:

(1) 取一块 96 孔板横向使用, 每块板可以做 8 份(4 对)待测血清, 版面设计如下图所示。A1-A2 孔(B1-B2、C1-C2、D1-D2、E1-E2、F1-F2、G1-G2、H1-H2)中每孔加入 1:1024 稀释度的待测血清 0.05ml, 不必更换吸尖, 在 A3-A4 孔(B3-B4、C3-C4、D3-D4、E3-E4、F3-F4、G3-G4、H3-H4)中每孔加入 1:256 稀释度的待测血清 0.05ml, A5-A6 孔(B5-B6、C5-C6、D5-D6、E5-E6、F5-F6、G5-G6、H5-H6)中每孔加入 1:64 稀释度的待测血清 0.05ml, A7-A8 孔(B7-B8、C7-C8、D7-D8、E7-E8、F7-F8、G7-G8、H7-H8)中每孔加入 1:16 稀释度的待测血清 0.05ml, A9-A10 孔(B9-B10、C9-C10、D9-D10、E9-E10、F9-F10、G9-G10、H9-H10)中每孔加入 1:4 稀释度的待测血清 0.05ml, A11-A12 孔(B11-B12、C11-C12、D11-D12、E11-E12、F11-F12、G11-G12、H11-H12)为每份待测血清对照孔, 每孔中补加稀释液 0.05ml;

(2) 上述孔中分别加入病毒 0.05ml(病毒滴度事先已经稀释为

100 CCID₅₀/0.05ml);

(3) 盖好盖子后用微量板混匀器混匀，放入 36℃ CO₂ 孵箱中孵育 2h;

标本检测		1:1024		1:256		1:64		1:16		1:4		1:4血清对照	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1号标本	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
2号标本	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
3号标本	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
4号标本	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
5号标本	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
6号标本	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
7号标本	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
8号标本	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○

(4) 另取一块 96 孔板纵向使用，做 100 CCID₅₀/0.05ml 病毒滴度的核实（每次实验都必须做）。每孔先加病毒稀释液（试剂配制中的 C 液）0.05ml，然后从 0.1 CCID₅₀/0.05ml 加起，每孔 0.05ml，每个稀释度 8 孔，不必更换吸尖，一直加至 100 CCID₅₀/0.05ml；同时留出 4 孔做为细胞对照孔，每孔加入 0.1ml 病毒稀释液，然后放入 4℃ 冰箱中暂存；

标本检测		1:1024		1:256		1:64		1:16		1:4		1:4血清对照	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1号标本	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
2号标本	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
3号标本	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
4号标本	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
5号标本	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
6号标本	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
7号标本	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
8号标本	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○

(5) 在孵育期间，用消化液消化细胞，准备细胞悬液，细胞悬液的浓度为 2×10^5 个/ml，每块 96 孔板至少需要准备 10ml；

(6) 孵育结束后每个待测血清孔、血清对照孔（待检标本板）和病毒回滴孔和细胞对照孔（病毒回滴板）分别加入 0.1ml 细胞悬液，

然后用微量板混匀器混匀，放入 36℃ CO₂ 孵箱中孵育培养；

(7) 使用倒置显微镜每天观察 CPE，并记录病毒滴定结果，以不产生细胞病变的血清最高稀释度的倒数为终点效价。当 100 CCID₅₀/0.05ml 的病毒对照孔出现完全病变时，判定最终结果(约 5⁻7d)；

(8) 注意：如果病毒对照结果（病毒回滴）不在 32⁻320 CCID₅₀/0.05ml 的范围内，实验无效，就要重复实验。

5. 结果判定

当最高稀释度血清的 2 孔中有 1 孔出现细胞病变，另一孔不出现细胞病变，该稀释度的倒数计即为该血清标本的中和抗体效价；当高稀释度 2 孔完全病变，相邻低稀释度 2 孔完全不病变，则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价；当两个相邻稀释度血清均出现 1 孔细胞病变，另 1 孔不出现细胞病变，则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价。

对于 HFMD 的双份血清中和实验结果来说，如果恢复期血清较急性期血清 EV71 或 CVA16 中和抗体滴度出现 4 倍或 4 倍以上增高即可确诊；如果恢复期血清较急性期血清其它肠道病毒中和抗体滴度出现 4 倍或 4 倍以上增高可证实该肠道病毒感染，是否为病因需要其它相关实验证实；如果单份血清中和抗体滴度大于 1:256 也有诊断意义，血清中和抗体滴度为 1:128 判定为可疑阳性。

(三) 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)。

1. RNA 提取

可使用多种商业化试剂盒来提取 RNA，针对临床标本应选择质量较高的“用于临床标本病毒 RNA 提取的试剂盒”，也可使用全自动 RNA 提取仪进行提取。针对病毒分离物，核酸提取比较容易，大部分商业化

RNA 提取试剂盒都可有效的提取到 RNA。RNA 提取依据使用的试剂不同，严格按说明书进行操作。

2. 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

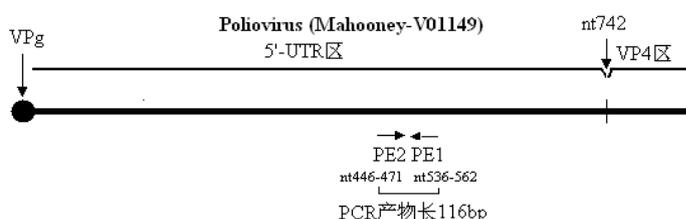
(1) 引物序列合成

国家脊灰实验室自行设计 3 对引物,分别为人肠道病毒通用引物、EV71 特异性引物和 CVA16 特异性引物。各省 CDC 依据引物序列在质量有保证的公司合成,引物合成后,需要做预实验,保证引物合成没有质量问题后,分发给地市级 CDC。

1) 人肠道病毒 (包括 EV71、CVA16) 核酸检测通用引物序列:

PE2 (上游): 5'- TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C -3'

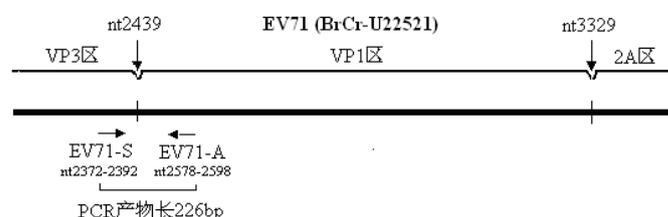
PE1 (下游): 5'- ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT CC -3'



2) EV71 核酸检测引物序列:

EV71-S (上游): 5'- GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC -3'

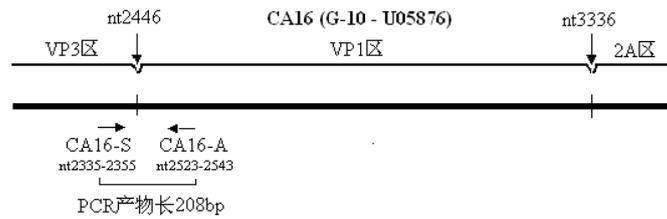
EV71-A (下游): 5'- ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC -3'



3) CVA16 核酸检测引物序列:

CVA16-S (上游): 5'-ATT GGT GCT CCC ACT ACA GC-3'

CVA16-A (下游); 5'-TCA GTG TTG GCA GCT GTA GG-3'



(2) 实验设计

1) 在 PCR 记录纸 (实验记录纸) 上记录本次实验操作者姓名, 实验日期, 所鉴定标本的名称以及标本的顺序, 与 PCR 仪排列的顺序一致。

2) 标记好加标本和对照的 PCR 管 (阳性对照, 阴性对照和试剂对照)。

A: 阳性对照: 参比 RNA, 省级 CDC 提供 (只是在初次使用, 常规不建议使用, 以防污染)。

B: 阴性对照: 使用正常细胞 RNA 或临床标本肠道病毒阴性的 RNA (每次实验要设立)。

C: 试剂对照: 用去离子水代替标本 (试剂初次使用时必须做)。

(3) RT-PCR 扩增反应和条件

1) 从临床标本或病毒中提取的 RNA 和各种 RT-PCR 试剂应该一直放在冰浴盒上;

2) 配下列试剂主溶液:

10×PCR Buffer	5.0μl
dNTPs (2.5mM each)	2.0μl
上游引物 (0.1μg/μl)	1.0μl
下游引物 (0.1μg/μl)	1.0μl
RNA 酶抑制剂 (RNasin, 40U/μl)	0.5μl

Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ l)	0.5 μ l
AMV 逆转录酶 (10U/ μ l)	1.0 μ l
模板 RNA.....	3.0 μ l
RNase Free dH ₂ O.....	36.0 μ l
	50.0 μ l

3) 在 PCR 仪上进行 RT-PCR 反应，反应步骤如下：

42°C.....	45min	
95°C.....	3min	
95°C.....	20s	} ×32 个循环
45°C.....	25s	
72°C.....	30s	
72°C.....	10min	
4°C.....	Soak	

3. 电泳分析

(1) 将已经聚合的 3%的琼脂糖凝胶放在电泳装置上；

(2) 在帕拉膜 (Parafilm) 上加上 6 × 电泳载样缓冲液 (每个反应需 1 μ l)。再加上 5 μ l 的 PCR 反应产物与之混合；

(3) 将电泳缓冲液倒在电泳装置中，用吸尖将样品与载样缓冲液的混合溶液加到孔中；

(4) 盖上盖子，接通电源，以 10V/cm 电压 (恒定电压) 电泳，大约 35-40min，直到溴酚蓝跑到凝胶的底部的时候，停止电泳；

(5) 将胶取出，并注意保持凝胶的方向；

(6) 在 1 μ g/ml 的溴化乙锭溶液中染色 15min，

注意：溴化乙锭溶液是有毒、致畸、并且致肿瘤的物质，操作时要加小心，并戴双层手套。如果储存在避光的容器中，溴化乙锭溶液可以重复使用。溴化乙锭废弃物按医疗废弃物中化学品的有关规定处理。

(7) 在蒸馏水中涮一下凝胶；

(8) 在紫外透射仪下观察 PCR 产物电泳结果，并照相作记录。

有条件的实验室可以使用全自动电泳分析仪。

4. 结果解释

使用全自动电泳分析仪的实验室可以通过仪器自动读取 PCR 产物大小，来判断结果。通过琼脂糖凝胶做 PCR 产物电泳的实验室，需要参照 DNA 分子量对照对照，比较标本的 PCR 产物与阳性对照的 PCR 产物在凝胶上的位置以及大小来解释结果。

RT-PCR 实验结果解释表

待检标本 RT-PCR 结果	鉴定结果
HEV(-), EV71(-), CVA16(-)	非肠道病毒 (NEV)
HEV(+), EV71(-), CVA16(-)	非 EV71、CVA16 的其它肠道病毒
HEV(+), EV71(+), CVA16(-)	EV71
HEV(+), EV71(-), CVA16(+)	CVA16

(四) Real-time RT-PCR (rRT-PCR)

1. 病毒核酸提取

参考常规 RT-PCR 病毒核酸提取步骤和注意事项。

2. Real-time RT-PCR (rRT-PCR)

依据不同厂家的试剂盒，严格按相应说明书操作和判断结果。有 5

种试剂盒，分别为 One Step Real-time PCR 法检测 EV71 病毒核酸（单通道检测）；One Step Real-time PCR 法检测 CVA16 核酸（单通道检测）；One Step Real-time PCR 法检测肠道病毒核酸（单通道检测）；One Step Real-time PCR 法同时检测 EV71 和 CVA16 核酸（双通道检测）；One Step Real-time PCR 法同时检测 EV71 和肠道病毒核酸（双通道检测）。下面举 2 个例子来说明单通道检测和双通道检测的操作规程和注意事项。

（1）One Step Real-time PCR 法检测 EV71 病毒核酸（单通道检测）

①反应体系配置：反应体系共 25 μ l，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用 5 μ l 的 RNA 模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

a. 从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按 n+1 配置反应体系（n=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

试剂组成	1 份样品的量
荧光 RT-PCR 反应液	12.5 μ l
逆转录酶	0.5 μ l
Taq 酶	0.5 μ l
引物和探针	1.5 μ l
H2O	5 μ l

b. 将上述反应液混匀离心后，按照每管 20 μ L 分装于各荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

c. 加样：将提取好的样本 RNA，分别加入上述分装好的 PCR 反应管中，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用 5 μ l 模板量），

不够部分以水补足。总反应体积 25 μ L。

② 荧光 RT-PCR 循环条件设置

程序	循环数	温度 (摄氏度)	反应时间 (分钟: 秒)
1	1	42 $^{\circ}$ C	30min
2	1	95 $^{\circ}$ C	2min
3	40	95 $^{\circ}$ C	10sec
		60 $^{\circ}$ C	35sec
		60 $^{\circ}$ C 时收集荧光信号	

③ 对照设置

阴性对照: 核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本, 每次实验应设立。

阳性对照: 由省级实验室提供 EV71 阳性核酸 (只在评价试剂时使用)

④ 结果分析条件设定和结果判断

阈值设定

原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 结果显示阴性为准, 或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct 值 \leq 35.0 的样本为阳性。

38.0 > Ct 值 > 35.0 的样本为临界值。

Ct 值 \geq 38.0 的样本或无数值的标本为阴性。

(2) One Step Real-time PCR 法同时检测 EV71 和 CVA16 核酸 (双通道检测)

双通道可以同时检测 EV71 和 CVA16 核酸, 在提取核酸后短时间 (2.5 小时) 内检测到标本中是否含 EV71 或 CVA16 核酸。

① 反应体系配置

反应体系共 25 μ l, 模板量可根据样本情况自行决定 (临床标本通常使用 5 μ l 模板量), 不够部分以水补足。如选用另外试剂盒, 反应体系及条件随之变化。

a. 先将试剂解冻, 从试剂盒中取出相应的试剂, 反应液在室温融化后, 瞬时离心, 按 n+1 配置 25 μ l 反应体系 (n=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照), 每个测量反应体系配置如下表:

b. 将下述反应液混匀离心后, 按照每管 20 μ L 分装于适用的 PCR 管中。

试剂组成	1 份样品的量
荧光 RT-PCR 反应液	12.5 μ l
逆转录酶	0.5 μ l
Taq 酶	0.5 μ l
引物和探针	3 μ l
H2O	3.5 μ l

c. 加样: 将提取好的样本 RNA, 分别加入上述分装好的 PCR 反应管中, 模板量可根据样本情况自行决定 (临床标本通常使用 5 μ l 模板量), 不够部分以水补足。总反应体积 25 μ L。

② 荧光 RT-PCR 循环条件设置

程序	循环数	温度(摄氏度)	反应时间
1	1	42 $^{\circ}$ C	30 min
2	1	95 $^{\circ}$ C	2 min
3	40	95 $^{\circ}$ C	10 s
		60 $^{\circ}$ C	35 s
		60 $^{\circ}$ C 时收集荧光信号	

③ 结果分析条件设定和结果判断

阴性对照: 核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。

阳性对照: 提取好的阳性核酸作为模板 RNA。

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct 值 ≤ 35.0 的样本为阳性。

Ct 值无数值的标本和 Ct 值 ≥ 38.0 的样本为阴性样本。

$38.0 > \text{Ct 值} > 35.0$ 的样本为临界值。

注：荧光 PCR 同时读取 FAM 和 HEX，进行双通道检测，FAM 荧光 Ct 值为 CVA16 的结果，HEX 荧光 Ct 值为 EV71 的结果。

四、生物安全

根据 2006 年 1 月 11 日卫生部制定的《人间传染的病原微生物名录》，柯萨奇病毒、埃可病毒、EV71 型和目前分类未定的其他肠道病毒均属于危害程度第三类的病原微生物。因此在保证安全的前提下，对临床和现场的未知样本检测操作可在生物安全 II 级或以上防护级别的实验室进行，涉及病毒分离培养的操作，应加强个体防护和环境保护。

操作粪便、脑脊液和血液等临床标本时要特别注意生物安全，要在 II 级生物安全柜中进行标本处理、病毒分离和病毒鉴定，无脊灰疫苗免疫史的人员要进行脊灰疫苗免疫。

灭活后的血清抗体检测与 PCR 检测可在生物安全 I 级实验室进行。

所有操作应遵守国家相关法律法规。

附表：1. 手足口病病例临床标本采样登记表

2. 手足口病病例临床标本检测结果登记表

