

诺如病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：诺如病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于临床对可疑感染患者的粪便标本中的诺如病毒核酸进行定性检测。

根据相关文献研究^[1,2,3,4]，诺如病毒(Norovirus, NoV)是一种单股正链 RNA 病毒，基因组全长约为 7.7~8.0kb，电子显微镜下为呈圆形、无包膜、直径约为 27~32nm 的二十面体对称球状的病毒颗粒，负染电镜照片具有典型的羽状外缘且表面有凹痕。诺如病毒感染性腹泻全世界范围内均有流行，全年均可发生感染事件，60-80%的非细菌性腹泻感染均是由诺如病毒引起的。诺如病毒可感染各个年龄段的人，但易感人群主要分布在年龄小于 5 岁的幼儿，轻度感染者多表现为发热、恶心、呕吐、腹泻或腹部绞痛等症状，严重者会导致患者死亡。

目前临床或实验室用于 NoV 检测的方法有：抗体中和检测、免疫组化检测、间接免疫荧光检测、酶联免疫吸附试验、基因芯片、核苷酸序列测定及荧光定量 PCR 技术等。

【检测原理】

本试剂盒根据 RT-PCR 原理，针对诺如病毒特异性保守区域设计相应的引物及探针，配以逆转录酶、TaqDNA 聚合酶以及核苷酸单体，扩增前先将诺如病毒经逆转录酶作用后变为 cDNA，然后进入 PCR 扩增。PCR 扩增时加入一对引物及一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸序列，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭基团。未发生 PCR 扩增时，荧光探针保持完整，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团所吸收，无荧光信号产生。当 PCR 扩增时，探针结合到靶序列相应的模板上，Taq 酶的 5'端至 3'端外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭基团分离，从而使荧光监测系统可监测到荧光信号，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 产物完全同步，从而实现检测结果的定性分析。

【主要组成成分】

组分名称	规格	数 量 (管)	主要组成成分
逆转录-聚合酶链式反应液	1mL/管	1	诺如病毒引物、荧光探针、缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、内标引物、内标探针及焦碳酸二乙酯水
聚合酶链式反应酶液	115μL/管	1	热聚合酶、逆转录酶、RNA 酶抑制剂
内标	150μL/管	1	含有内标扩增序列的非传染性 DNA 片段
阴性质控品	100μL/管	1	生理盐水
阳性质控品	100μL/管	1	含高浓度诺如病毒片段的假病毒
临界阳性质控品	100μL/管	1	含低浓度诺如病毒片段的假病毒

注：不同批号组分不可互换使用。

【储存条件及有效期】-10℃以下避光保存，有效期 12 个月，反复冻融不超过 3 次。

本试剂盒需低温（0-8℃）运输，运输时间不超过 6 天；试剂盒开瓶后请于 48 小时之内使用完，如不立即使用可在 4℃条件下保存。

【适用仪器】Roche LightCycler480（罗氏 480 型）、ABI7500（应用生物系统 7500 型）

【样本要求】^[5]

1.适用标本类型：疑似病人的粪便标本。

2.标本采集：

粪便标本：用棉拭子拭取粪便或腹泻物置入无菌玻璃管（含 0.4mL 无菌生理盐水），用无菌棉球将试管塞紧后，密封送检。

注：棉拭子材料要求：使用一次性无菌采样拭子，拭子塞采用高压聚乙烯材料制作，拭杆采用竹子材料制作；拭子头采用脱脂药棉制作。

3.标本保存与运输：样本可立即用于检测；如不立即检测，样本在 4℃ 保存应不超过 24 小时；-20℃ 保存不超过 3 个月，-70℃ 可长期保存，反复冻融不超过 5 次。标本长途运送应采用 0℃ 冰壶，运输时间不超过 6 天。

【检验方法】

一 试验前准备

1.试剂准备（试剂准备区）

取出试剂盒内内标模板、阴性质控品、阳性质控品和临界阳性质控品待室温溶解。

2.标本处理（标本处理区）

吸取 0.4mL 粪便标本置于 1.5mL 离心管中，12000rpm，离心 3min；吸取 200μL 标本上清液进行核酸提取。采用商品化的 RNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司的磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒）提取样本，具体操作方法参见试剂盒说明书。提取前每个样本中添加 5μL 内标。

3.质控品处理（样本处理区）

取阴性质控品、阳性质控品以及临界阳性质控品各 25μL，补加生理盐水至 200μL，然后添加 5μL 内标参与核酸提取，提取步骤同上。

4.加样（样本处理区）

按所需检测样品及质控品数目 N，取出需配置的 PCR 反应管。用一适当体积的离心管按照 $(35.8\mu\text{L 反应液} + 4.2\mu\text{L 酶}) \times N$ 的公式配置好反应体系，混匀后向 N 个 PCR 反应管中每管分装 40μL，加入样本及质控品的核酸提取物 10μL，短暂离心片刻后上机检测。

二 荧光定量 PCR 扩增（扩增区）

a) Roche LightCycler480 操作

1. 仪器设置

1.1 打开仪器进行自检

每次开机时，仪器会自动进行初始化自检程序。自检通过，仪器左侧指示灯变绿。如放置了样本，仪器右侧指示灯变绿。在自检时，不能放置反应板，否则自检无法通过。

1.2 设置反应条件

打开 LightCycler480 操作软件，成功登录后进入 New Experiment 程序设置界面。在“Detection Format”一栏中选择“Dual Color Hydrolysis Probe”项，即双色 TaqMan 水解探针。

在“Programs”界面中设置实验程序如下：

42℃ 30 分钟，95℃ 3 分钟；

95℃ 10 秒、60℃ 1 分钟（收集荧光信号），40 个循环。

点击“Start Run”按钮开始 PCR 扩增。

2.结果分析

2.1 样本设置

点击左侧“Subset Editor”按钮，进入 Subset 设置界面，点击“+”按钮新建亚组，并给其命名。选定要设置的亚组，在右边反应板孔位处选定该亚组所包含的孔位，使所选定的孔位中

都出现深兰色凹陷，点击下方“Apply”按钮加以确认。

点击左侧“Sample Editor”按钮，点击左上角的“Abs Quant”按钮，再在“Quantification Sample Type”一栏内对各样本的类型进行编辑（阴性质控品选 Negative Control、阳性/临界阳性质控品选 Positive Control、未知样本选 Unknown）。

2.2 数据分析

点击左侧“Analysis”按钮分析数据，在 Analysis 界面中选择“Abs Quant/Fit Points”，点击“Calculate”按钮，生成 Cp 值（即 Ct 值）。

2.3 到 Report 窗口，点击“Generate”按钮生成报告。

b) ABI7500 操作

1. 仪器设置

1.1 定义样品孔

选定样品孔，选择 FAM 检测通道（荧光淬灭基团设为 none）检测 NoV；选择 HEX 或 VIC（荧光淬灭基团设为 none）检测内标。同时 Passive Reference 设为 none。定义样品孔：阴性质控品选 NTC；待检样品和阳性质控品选 Unknown。

1.2 打开 instrument 设置反应条件

42℃30 分钟，95℃3 分钟；

95℃10 秒、60℃1 分钟（收集荧光信号），40 个循环。

2. 结果分析

2.1 反应结束后保存反应结果；

2.2 调整 Baseline 的 start 值、stop 值以及 Threshold 的 Value 值使曲线达到最佳。在 Analysis 菜单下选择 Analysis 自动分析反应结果。

2.3 到 Report 窗口，记录标本数值。

三. 质量控制

NoV 阴性质控品 FAM 检测通道检测结果应为阴性且无 Ct 值，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

NoV 阳性质控品 FAM 检测通道检测结果应为有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 30.00 ，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

NoV 临界阳性质控品 FAM 检测通道检测结果应为有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

基线设置：取 3-15 循环的荧光信号作为基线调整的范围，使扩增曲线达到最佳“S”型；以上要求需在同一次实验中同时满足，否则实验视为无效。

【检测结果的解释】

在质控品及内标实验结果均有效的前提下，按以下标准判定实验结果：

1. 如果扩增曲线呈 S 型且 Ct 值 ≤ 36.00 ，则结果为阳性。
2. 如果扩增曲线 S 型不明显或 $36.00 < \text{Ct 值} < 40.00$ ，则应对该样本进行重新检测，若复检结果仍是 $36.00 < \text{Ct 值} < 40.00$ ，则为阴性。
3. 如果扩增曲线不呈 S 型、Ct 值为 UNDET 或者无 Ct 值，则结果为阴性。

【检验方法的局限性】

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能作为对诸如病毒感染患者治疗或者其他临床管理的唯一依据，需结合其他实验室检测、临床情况综合考虑。当实验室发生 PCR 产物气溶胶污染、试剂污染或样品交叉污染时，检测结果会出现假阳性；当试剂运输、保存不当引起的试剂检测效能下降时，检测结果会出现假阴性；当检测样本中被检核酸浓度含量低于 $1.0 \times 10^4 \text{ pfu/mL}$ 时，也可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

根据临床考核结果，本试剂盒对处理后样本的检测下限为 $1.0 \times 10^4 \text{ pfu/mL}$ ，精密度 CV%



小于 5%。特异性试验表明本试剂盒与选取人轮状病毒、人肠道病毒 71 型、人埃可病毒、柯萨奇病毒 A-16 型、柯萨奇病毒 B1 型、柯萨奇病毒 B2 型、伤寒沙门菌、宋内氏志贺菌、弧菌和嗜水气单胞菌特异性参考品均无交叉反应。粘蛋白 (2.5mg/mL) 等对样本中诺如病毒测定结果无显著影响。本试剂盒对诺如病毒的检测结果与测序方法相比, 各项指标为: 阳性符合率 99.37%、阴性符合率 99.72%、总符合率 99.62%、一致性系数 (Kappa) 0.9909。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。实验人员必须经过严格培训, 实验前仔细阅读此说明书。
2. 实验过程分区进行 (试剂准备区、样本处理区、PCR 基因扩增区), 每个分区有专用仪器和试剂, 防止交叉污染。
3. 实验过程中应穿工作服, 使用一次性不含荧光手套并经常更换, 使用自卸式移液器。
4. 应使用洁净 1.5mL 离心管, 移液器吸头不可以重复使用。
5. 向离心管中加样时, 所有液体都要缓慢加至管底, 不要残留在管壁上, 完成后 5000rpm 离心数秒。
6. 不同批号的试剂, 切勿混用, 有效期内使用试剂盒。
7. 试剂使用前完全解冻, 避免反复冻融。
8. 每次试验完毕用 75% 酒精或紫外灯处理工作台和移液器。
9. 检测过程中遗留的样品、扩增产物及污染的试剂等, 应有专门的容器和人员进行处理。
10. 为保证检测准确性, 务必使用经过校准的移液器标准加样。
11. 本试剂盒内阳性质控品应视为具有传染性物质, 操作和处理均需符合相关法规要求: 《医疗废弃物管理条例》。

【参考文献】

1. 金奇主编. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
2. 何金林. 诺如病毒检验进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 033-045.
3. 李丹地, 程卫霞, 刘娜等. 2008 年 11 月至 2009 年 1 月广东省 5 岁以下儿童其他感染性腹泻异常增高的病原学研究[N]. 病毒学报, 2010, 26(2): 1000-1021.
4. 薛华, 翟菊萍. 急性腹泻患儿诺如病毒检测和分型[J]. 中国现代医生, 2011, 31.
5. 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程(第 3 版)[M]. 中华人民共和国卫生部医政司, 323-325.

【基本信息】

企业名称: 湖北朗德医疗科技有限公司

注册地址: 湖北省宜昌市西陵经济开发区西湖路

生产地址: 湖北省宜昌市西陵经济开发区西湖路

邮政编码:

电话:

传真:

网址:

【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】