

【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】

大包装，48 人份/盒；大包装，10 人份/盒；单管单人份，10 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用于患者粪便样本中诺如病毒 RNA 的定性检测。

诺如病毒（Norovirus, NV）能引起人类急性胃肠炎，是群居成人和儿童急性感染性腹泻的主要病原之一。根据基因特征，诺如病毒被分为 6 个基因群（Genogroup, GI - GVI），其中，GI 和 GII 是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因群，GIV 也可感染人，但很少被检出。GIII、GV 和 GVI 分别感染牛、鼠和狗。诺如病毒感染全年均有流行，感染对象主要是成人和学龄儿童，主要分布在学校、家庭、医院、军队、幼儿园、旅游区等，多在集体机构以暴发形式出现。粪-口途径是主要传播方式，也可以通过污染的水源、食物、物品、空气等传播。感染后潜伏期多在 24~48 h，少数在 18~72 h。发病突然，主要症状为恶心、呕吐、腹痛和腹泻。儿童患者呕吐普遍，成人患者腹泻为多，24 h 内腹泻 4~8 次，粪便为稀水便或水样便，无粘液脓血，粪检白细胞阴性。原发感染患者的呕吐症状明显多于续发感染者，有些病人仅表现出呕吐症状，故在临床曾有冬季呕吐病诊断。此外，头痛、轻度发热、寒颤和肌肉痛也是常见症状，严重者出现脱水。目前，诺如病毒的检测有 4 种方法：电镜法、免疫学方法、分子生物学方法、基因芯片法。其中 RT-PCR 方法能更准确、灵敏地检测标本中的诺如病毒。

本试剂盒不能对诺如病毒进行分型，检测结果仅供临床参考，不能单独用做确证依据。

【检验原理】

本试剂盒利用一步法实时荧光 PCR 技术，以 GI、GII 和 GIV 型诺如病毒基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行一步法 PCR 扩增，用于标本中 NV RNA 的定性检测。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。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (适用于大包装 10 人份/盒)	NV PCR 反应液 A	170 μL/管	1	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液等
	NV PCR 反应液 B	30 μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	NV 内标溶液	120 μL/管	1	含内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (适用于大包装 48 人份/盒)	NV PCR 反应液 A	816 μL/管	1	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液等
	NV PCR 反应液 B	144 μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	NV 内标溶液	240 μL/管	1	含 NV 内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份)	NV PCR 反应管 (未贴标签管)	1 人份/管	10	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	NV 内标溶液	120 μL/管	1	含 NV 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	400 μL/管	1	生理盐水
	NV 阳性质控品	400 μL/管	1	含 NV 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。

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂。可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170669 号或粤穗械备 20201539 号或粤穗械备 20170583 号）。

质控品说明：NV 阳性质控品为含 NV 片段目的序列的病毒样颗粒，使用时需进行核酸提取，且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。

【储存条件及有效期】

试剂盒保存于-20℃±5℃，有效期 9 个月。

反复冻融次数不超过 4 次；试剂开瓶后，在 4℃储存温度条件下开瓶次数不超过 7 次；试剂在 4℃条件下连续保存不超过 7 天；试剂在 37℃条件下连续保存不超过 72 h。

试剂盒生产日期和有效期见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500, Roche LightCycler480, DA7600。

【样本要求】

- 适用样品类型：粪便。
- 样品采集（注意无菌操作）

采集发病患者的粪便样本，每份粪便样本采集量为 5 mL/5 g 以上，采集后立即置于无菌采样管内。

 - 固体粪便：以灭菌棉签或者枪头取 2 g 左右样本置于灭菌离心管中，加入 500 μL 灭菌生理盐水，枪头剪去尖端部分后吸打样本使其充分悬浮，静置后取上清用于核酸提取操作。
 - 液态粪便：液体粪便（或含病毒维持液/生理盐水）充分悬浮，静置后取上清用于核酸提取操作。

3. 样品保存和运送

参考《手足口病预防控制指南（2009 版）》和《诺如病毒感染爆发调查和预防控制技术指南（2015 版）》中粪便样本保存和运输的要求。待检测样本在 2℃~8℃条件下保存应不超过 12 h；若需长期保存，放置-70℃冰箱，但应避免反复冻融。标本运送：短途运输（1 天以内）采用低温冰壶或加冰并以泡沫箱密封；长途运输（超过 1 天）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）

建议取 200 μL 液体样本进行核酸提取，可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂[如：粤穗械备 20170669 号、粤穗械备 20201539 号或粤穗械备 20170583 号]，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，若提取试剂说明书中未说明内标的使用方法，则可在样本中按样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的阴性质控品和 NV 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 NV PCR 反应液 A、NV PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000 rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+NV 阳性质控品）PCR 反应管。

NV 单人份扩增体系配制如下表：

组分	NV PCR 反应液 A	NV PCR 反应液 B	总体积
用量	17 μL	3 μL	20 μL

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 20 μL 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 NV PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

往上述对应的 NV 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、NV 阳性质控品核酸 5 μL，盖紧管盖，8,000 rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 ABI 7500 仪器设置（DA7600 仪器设置参照此操作）

4.2.1 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 1: FAM, Quencher 1: none; Reporter 2: VIC, Quencher2: none; Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

程序名	循环数	温度(℃)	时间	收集荧光
1	1	50	15: 00	/
2	1	95	15: 00	/
3	45	94	00: 15	/
		55	00: 45	收集荧光

设置完成后，保存文件，运行程序。

4.3 LightCycler480仪器设置

4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM, VIC。

4.3.2 设置循环条件：

Program name	Cycles	Target(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 15: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

5 结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例)

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（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，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品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”窗口读取检测结果。

6 质量控制

6.1 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线；VIC 检测通道有扩增曲线；

6.2 NV 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值≤35；VIC 检测通道有或无扩增曲线；

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

7 结果判断

7.1 如果 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≥43 或 FAM 检测通道无扩增曲线，且在 VIC 检测通道有扩增曲线，可判样品为诺如病毒阴性；

7.2 如果 FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值<43，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为诺如病毒阳性。

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的阳性判断值为 Ct 值等于 43。

【检验结果的解释】

1. 每次实验均需检测阴性质控品，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. 检测通道项目为阳性时，由于体系的竞争关系，内标可能为阴性；
3. 内标结果为阴性时，若该检测管的 FAM 检测通道也为阴性，说明体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检；
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 NV 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 NV 病毒 RNA。

【检验方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果；
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，本试剂盒推荐使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂，用户可根据需求进行选择确认；
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；
6. 浓度超出本试剂盒检测范围的样本无法确保检测结果；
7. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

【产品性能指标】

- 1 产品分析性能评估结果表明：
 - 1.1 本试剂盒的灵敏度可达 1.0×10^3 copies/mL。
 - 1.2 阴阳性参考品符合率：5 份阳性参考品符合率为 100%；10 份阴性参考品符合率为 100%。
 - 1.3 精密度：批内、批间、日内、日间、不同操作者间精密度检测 Ct 值的变异系数（CV）均小于 5%。
 - 1.4 分析特异性：
 - 1.4.1 交叉反应：与粪便中常见的厌氧菌（拟杆菌属、乳酸杆菌、厌氧消化链球菌）、诺如病毒其他基因型（GIII 型、GV 型、GVI 型）以及感染部位相同或感染症状相似的其他病原体（肠道病毒、肠道病毒 71 型、星状病毒、A 组轮状病毒、B 组轮状病毒、C 组轮状病毒、札如病毒、40 型肠道腺病毒、41 型肠道腺病毒、大肠杆菌、幽门螺旋杆菌），在厌氧菌浓度不高于 1×10^6 CFU/mL、诺如病毒其他基因型浓度不高于 1.0×10^6 copies/mL 以及其他病原体浓度不高于 1.0×10^5 copies/mL 时，本试剂盒的检测结果均为阴性，无交叉反应。
 - 1.4.2 干扰实验：样本中可能存在内源性干扰物质粪便中脂肪滴（甘油三酯）、血红蛋白、白细胞、粘蛋白和外源性干扰物质如青霉素（20 U/mL）及氨苄青霉素（6 μ g/mL）、克林霉素（13.11 mg/L）、头孢唑林（106 μ g/mL）、红霉素（12 mg/L）、利巴韦林（2 mg/L）、甲基泼尼松龙（20 mg/L）、诺氟沙星（2.5 mg/L），在本试剂盒的检测条件下，对检测结果的均无干扰。
- 2 临床试验结果：本次临床试验共纳入考核试剂与测序方法对比的检测样本 948 例，包括与对比试剂对比的检测样本 358 例。其中，考核试剂与测序方法相比，考核试剂的检测阳性符合率为 99.38%、阴性符合率为 97.76%、总符合率为 98.31%；kappa 检验一致性表明，考核试剂与测序方法检测粪便样本结果一致性较好（kappa=0.963， $p < 0.001$ ）；与对比试剂相比的 358 例检测样本，考核试剂的检测阳性符合率为 100%，阴性符合率为 98.27%，总符合率为 98.88%。kappa 检验一致性分析表明，考核试剂与对比试剂检测粪便样本结果一致性较好（kappa 值为 0.976， $P < 0.001$ ）。

【注意事项】

1. 本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》和分析《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，8,000 rpm 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 $^{\circ}$ C 待用；
11. 须对每次实验进行质量控制。

【参考文献】

- [1]Mattison K, Grudeski E, Auk B, et al. Analytical performance of norovirus real-time RT-PCR detection protocols in Canadian laboratories. J Clin Virol, 2011, 50(2):109-113.
- [2]Hoehne M, Schreier E. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. BMC Infect Dis, 2006, 6:69.
- [3]Yan Y, Wang HH, Gao L, et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR assay for rapid and simultaneous detection of human norovirus genogroup I, II and IV. J Virol Methods, 2013, 189(2):277-282.

【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：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：<http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 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

【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】