

诺如病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法） 说明书

【产品名称】 诺如病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【货号】 JC50108N

【包装规格】 24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测粪便样本中诺如病毒 GI 和 GII 型核 RNA。

本产品用于诺如病毒感染的辅助诊断。诺如病毒（Norovirus, NV）是一种单股正链 RNA 病毒,基因组全长约为 7.5-7.7kb, 电子显微镜下为圆形、无包膜、直径约为 27~40nm 的二十面体对称的病毒颗粒,负染电镜显示具有典型的羽状外缘。根据 RNA 多聚酶区核苷酸序列的相似性,将诺如分为十个基因组型（GI-GX）,其中感染人的包括基因组 GI、GII、GIV、GVIII 及 GIX,我国最常见诺如病毒感染主要为 GI、GII 型, GIV 型很少检出。诺如病毒感染性腹泻在全世界范围内均有流行,全年均可发生感染事件。诺如病毒感染各个年龄段的人,感染对象主要是成人和学龄儿童,5 岁以下的儿童、老年人和免疫力较弱的人容易受到严重感染,主要通过粪口途径以及人与人接触传播,诺如病毒感染主要临床表现为恶心、呕吐、腹痛和腹泻,病程一般呈自限性。实验室检测技术有免疫法实验、电镜检查法以及荧光定量 PCR 技术等。

实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训,具备相关的实验操作资格,实验室应具备合理的生物安全防务设施及防护程序。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术,以诺如病毒的保守区域 VP1 设计引物和探针,探针采用 FAM 荧光素标记,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,从而实现对诺如病毒在核酸水平上的定性检测。

本试剂盒设置人核糖核酸酶 P（RNase P）作为内标,采用 VIC 荧光素标记,通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程中进行监控,避免检测结果的假阴性。

【主要组成成分】

组份名称	24 人份/盒	48 人份/盒	主要成分
核酸扩增反应液	180μL×1 管	360μL×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液
酶混合液	120μL×1 管	240μL×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚合酶
诺如病毒反应液	180μL×1 管	360μL×1 管	含诺如病毒和 RNase P 的引物、探针
阳性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	含诺如病毒片段和 RNase P 的病毒样颗粒
弱阳性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	含诺如病毒片段和 RNase P 的病毒样颗粒
阴性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	含轮状病毒 A 组片段和 RNase P 的病毒样颗粒

备注：不同批号间的试剂不能互换。

本试剂盒需要但未提供试剂：使用江苏硕世生物科技股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂盒（货号：SDK60102, SDK60103, SDK60104, SDK60105；备案号分别为苏泰械备 20140001 号、苏泰械备 20140002 号、苏泰械备 20150182 号、苏泰械备 20150256 号）；Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit（货号：52904, 52906）提取试剂盒,按照说明书进行操作。

【储存条件及有效期】

避光-20℃±5℃保存,有效期 12 个月。

开封后避光-20℃±5℃储存不影响产品有效期。反复冻融不超过 5 次、泡沫箱加冰袋低温运输（温度控制在 8℃ 以内）4 天不影响有效期。

生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500、Roche LightCycler480 II 和上海宏石 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：粪便样本。
2. 样本采集方法：采集粪便样本 5g 或 5mL 以上,直接放置于清洁、无菌、干燥的密闭容器内,容器内不可加入任何保护剂、培养基、去污剂或金属离子,不可稀释。
3. 样本保存运输：样本采集后应及时检测,2~8℃ 保存不超过 3 天。-20±5℃ 保存不超过 4 个月,-70℃ 可保存 12 个月。反复冻融不超过 4 次。采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

试剂盒融化后振荡混匀,低速离心 10 秒,根据所需反应数 N（N=样本数+阳性对照+弱阳性对照+阴性对照）,按照下表配制反应混合液：

反应混合液组份	每人份用量
核酸扩增反应液	7.5 μL
酶混合液	5 μL
诺如病毒反应液	7.5 μL
总体积	20 μL

将反应混合液充分混匀后,按照 20μL/管分装到 N 个 PCR 反应管中。

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 核酸提取

取 0.1-0.2g 粪便或 200μL 粪便上清液进行核酸提取,提取过程按照核酸提取试剂说明书进行操作,提取的核酸溶液保存备用。

注：本试剂盒的阳性对照、弱阳性对照、阴性对照分别取 200μL 同步参与核酸提取,用于对环境的监控和试剂的质控。

2.2 加样

在上述准备好的反应混合液（20μL/管）,分别加入处理好的待测样本、阳性对照、弱阳性对照和阴性对照核酸各 5μL,总体积为 25μL/管,盖紧管盖,瞬时低速离心。

3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 循环参数设定（请参照各类仪器的操作说明进行设置）

步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录反应	50℃	30 min	1 cycle
2	预变性	95℃	5 min	1 cycle
3	变性	95℃	10 s	45 cycles
	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, VIC				

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

3.3 结果分析

（1）ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

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。

（2）Roche LightCycler480 荧光定量 PCR 仪

反应结束自动保存结果,根据分析后图像调节 Noise Band 值,可设置在指数增长期的起始区域,略高于阴性对照即可；点击左侧“Analysis”按钮分析数据,在 Analysis 界面中选择“Abs Quant/2nd

Derivative Max”，点击“Calculate”按钮，生成Cp值（即CT值）。在Report界面点击“Generate”按钮生成报告。

（3）上海宏石SLAN-96P荧光定量PCR仪

反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节基线起点、终点、阈值；也可由仪器进行自动判读，默认起始循环为 6、终止循环为 12、阈值为 0.12），点击分析自动获得分析结果，在同一界面察看结果。

【阳性判断值】

利用受试者工作特征曲线（ROC）确定本试剂盒诺如病毒的阳性判断CT值为37.5。

【检验结果的解释】

质量控制

通道	CT值	
	FAM通道	VIC通道
阴性对照	Undet.	CT≤33.0
阳性对照	CT≤30.0	CT≤33.0
弱阳性对照	CT≤35.0	CT≤33.0

注：以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

结果判读

在仪器正常，阳性对照、弱阳性对照和阴性对照均正常的情况下进行结果分析（FAM通道代表诺如病毒，VIC通道代表内标）

	FAM通道	VIC通道	结果判读
1	CT≤37.5	不做要求	诺如病毒阳性
2	CT>39.0或Undet.	CT≤38.0	诺如病毒阴性
3	37.5<CT≤39.0	CT≤38.0	复检，如仍在此范围内，且曲线呈标准S型且有明显指数扩增期，则判为诺如病毒阳性
4	CT>39.0或Undet.	CT>38.0	无效结果，需重新采样检测

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒用于体外定性检测人粪便样本中的诺如病毒核酸，对于检测出的结果不能用于区分亚型。对于检测结果为阳性的情况，可提示所检样本中存在病毒；但是，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。检测结果仅供临床参考，对患者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。

2. 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。对于临床高度怀疑的阴性结果，建议采用多种样本类型或多次采样进行检测，必要时可考虑采用其他试剂进行检测。

3. 有关假阴性结果的可能性分析

3.1 不正确的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。

3.2 诺如病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。

3.3 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：2.0×10³ copies/mL。

2. 准确性：阳性参考品符合率100%（6/6）、阴性参考品符合率100%（6/6）。

3. 亚型检测能力：亚型参考品（GI：T1-T7，GII：T8-T16）进行检测，结果应均为阳性。

4. 特异性：与1×10⁵TCID₅₀/mL轮状病毒A型、肠道腺病毒40和41型、札如病毒、星状病毒、柯萨奇病毒CA16型、柯萨奇病毒CA6型、柯萨奇病毒CA10型、肠道病毒EV71型，1×10⁸ CFU/mL肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、福氏

志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、致泻性大肠杆菌EPEC、ETEC、EAEC、EHEC、EIEC、B族链球菌、空肠弯曲杆菌、副溶血弧菌、小肠结肠耶尔森菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、艰难芽孢梭状杆菌、产气荚膜杆菌以及人类白细胞的总核酸无交叉反应。

5. 干扰物质：12.5%血红蛋白、10%全血、5%胆固醇、5%甘油三酯、5%对乙酰氨基酚、150μmol/L氨苄青霉素、50%制霉菌素、5mg/mL氯化可的松、1×10⁹/L白细胞、5%（V/V）肠道炎性分泌液和2g/dL粘蛋白对检测结果均没有影响。

6. 精密性：检测精密性参考品的变异系数均不大于5%。

7. 临床评价：在三家临床机构完成640例样本的临床试验，其中与测序法对比590例，已上市试剂（朗德）一致性对比183例。考核试剂与测序法相比：（1）阳性符合率100%；（2）阴性符合率99.23%；（3）总符合率99.49%。考核试剂与对照试剂（湖北朗德）相比：（1）阳性符合率98.72%；（2）阴性符合率99.05%；（3）总符合率98.91%。

【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应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. 实验需严格分区操作；各区物品、工作服、鞋等均应专用，实验后应立即清洁工作台。

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. 每次实验应设置阴性对照、阳性对照和弱阳性对照。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封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]Hoa Trana TN, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and G II.4 variants [J]. Clin Virology, 2013, 56(3): 185-193.

[2]Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, et al. Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(2 1): 6585-6592

[3]Thongprachum A, Khamrin P, Tran DN, et al. Evaluation and comparison of the efficiency of immunochromatography methods for norovirus detection[J]. Clinical Laboratory, 2012, 58(5/6): 489-493.

【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：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
联系方式：电话 0523-86201616 传真 0523-86201617 邮编 225300 网址 www.bioperfectus.cn
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 邮编 225300 网址 www.bioperfectus.cn
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），泰州市国家医药高新技术产业园寺巷富野村、帅于村（G20）
生产许可证编号：苏药监械生产许 20100121 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准

20233401439

【说明书核准日期及修改日期】2023年10月11日