诺如病毒GI/GII/GIV核酸检测试剂盒(荧光RT-PCR法)

【产品名称】

通用名：诺如病毒GI/GII/GIV核酸检测试剂盒(荧光RT-PCR法)

英文名：Detection Kit for NorovirusGI/GII/GIV (Real-time RT-PCR Assay)

【包装规格】25人份／50人份

【预期用途】

 诺如病毒分为5个基因组(Genogroup)，感染人的诺如病毒(人诺如病毒)型别分属GI、GII、GIV三组，GI、GII国内常见，GIV相对少见但不排除通过输入随时出现的可能。本试剂盒以单管一步法同时检测这三组诺如病毒，并通过完善的质量控制全程监视检测质量。本试剂盒支持高速扩增，1小时内可完成，具有快速、灵敏、可靠、简便的特点，在人诺如病毒感染辅助诊断和暴发疫情应急检测方面具有重要的应用价值。

【检测原理】

 本试剂盒应用基于荧光探针法的多重实时荧光RT-PCR技术，单管同步检测GI、GII、GIV组诺如病毒核酸RNA，同时引入非竞争性内部对照IC以监控检测质量。

【主要组成】

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂组成 | 主要成分 | 体积(µl) |
| 25人份 | 50人份 |
| 1. Reaction Mix.
 | 反应混合液，及dNTP、Mg2+等 | 350 | 700 |
| 1. Enzyme Mix.
 | 酶混合液，含逆转录酶、DNA聚合酶等 | 50 | 100 |
| 1. Probe Mix.
 | 含检测目标基因和人管家基因IC的引物探针 | 100 | 200 |
| 1. Negative Ctrl.
 | 阴性对照(NC)，含人管家基因片段 | 50 | 100 |
| 1. Positive Ctrl.
 | 阳性对照(PC)，含三组病毒的目标基因片段 | 50 | 100 |

【试剂保存】

长期不用时须避光-20°C保存，有效期6个月；试剂盒须冰袋低温(4-10°C)运输且不能超过7天；使用中尽量减少反复冻融，使用频繁时可4°C避光保存但不宜超过7天。

【适用仪器】

ABI 7500等满足本试剂盒检测通道设置的实时PCR仪。

【样品要求】

1、检测样品为人诺如病毒感染的临床标本（肛拭样、咽试样等）。采集的样品应及时冰袋低温送检，不能及时送检的应低温保存：4°C<3天，-20°C<4月，-70°C<12月，且避免反复冻融。

2、选用可靠的商品核酸提取试剂盒或提取方法于PCR实验室样品处理区进行提取病毒RNA提取，提取的RNA应立即检测，不能立即时应于-70°C以下保存，保存时间不要超过6个月。

【检测方法】

1、试剂准备（试剂准备区）

从冰箱取出试剂，室温彻底融化后悬匀，1000rpm离心20秒将试剂甩至管底，备用。

2、反应体系配制（试剂准备区）

根据样品数n和对照数(PC、NC)确定总反应管数(n+2)，按下表配制25µl反应体系。

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组成 | 用量(µl/反应) |
| 1.Reaction Mix. | 14 |
| 2.Enzyme Mix. | 2 |
| 3. Probe Mix. | 4 |
| 4.预混合，按20µl分管 |
| 5.核酸提取液/PC/NC | 5 |

3、扩增（核酸扩增区）

本试剂盒拥有极高的扩增效率支持高速PCR(需仪器支持)，同时兼容常规标准程序扩增。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准扩增 | 高速扩增 | 检测通道 |
| 50°C10min;95°C10sec;40cycles:95°C10sec,55°C30sec(read data) | 50°C10min;95°C10sec;40cycles:95°C3 sec,55°C5sec(read data) | GI：HEX/JOE/VIC,555nmGII：FAM,520nmGIV：ROX, 608nmIC：Cy5, 668nm |

注：Roche机器请设相应波长；ABI机器参考荧光请设为None；淬灭基因均设为None；不具备全部的以上检测通道者可选择具备的通道检测相应的目标。

4、结果判定

样品出现有效扩增且Ct≤35为阳性，未扩增或Ct>40为阴性，Ct在35-40间为可疑；

结果可疑者需全程复检一次，Ct≤38判为阳性，>38为阴性。

5、质量控制

PC出现GI、GII、GIV目标扩增且均Ct≤35，NC仅出现IC扩增且Ct≤38示实验成立，否则无效，需重做。

内部对照IC以人管家基因为目标（Cy5为检测通道），来自人体的有效标本（肛拭、咽拭样等）均应阳性，因此使用IC可考察人源性标本的采集质量、核酸提取的有效性以及样品中是否存在PCR抑制物；阴性对照中含有IC基因目标片段，故可监视是否存在操作失误所致的假阴性。

【临床参考值】

阴性或未检出（GI、GII、GIV组诺如病毒为病原微生物，健康人体中不存在）

【方法局限性】

检测结果受样本中的病毒载量（过高或过低）、样本的采集质量和本身组分、试剂的运输与保存条件、实验的环境状况（是否污染）、人员的操作情况（是否失误）、仪器的运行状态（是否良好）等因素影响，可能会出现假阴性或假阳性。本试剂盒的质量控制措施有利于发现假阴性，但不能完全排除假阴性或假阳性，因此，本试剂盒检测结果用于诊断时需结合临床或流调资料，不能单独作为诊断或排除诊断之依据。

【产品性能指标】

灵敏度：最小检出限，GI、GII、GIV、IC 分别为30、10、40、5copies/reaction；

 线性检测范围，均在50－2×10^7copies/reaction；

特异性：尚未发现在诺如病毒基因组别间及与其它病毒间存在交叉反应。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，应由经专业培训的人员操作；
2. 检测应在符合条件的PCR实验室中进行，严防操作污染；
3. 本试剂盒所涉及的待测样本应视为传染性物质，所有操作须符合相关法律法规和实验室操作规程；
4. 标准扩增和高速扩增因条件不同Ct值会略有差异，但不会对定性结果造成显著影响；
5. 非人源性标本或人源性标本所含人体细胞极少时，可能出现内部对照阴性的情况；
6. 本试剂盒各组分已经优化，切勿与其它试剂组合混用；
7. 使用频繁时请4°C保存，长时不用时-20°C保存，保存时请注意避光。

【参考文献】

1. [Ao, Y.Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ao%20YY%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25151627).,[Yu, J.M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yu%20JM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25151627).,[Li, L.L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20LL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25151627).,[Jin, M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jin%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25151627).,[Duan, Z.J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Duan%20ZJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25151627), 2014.Detection of humannorovirusGIV.1 in China: a case report. [J Clin Virol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151627)61,:298-301.
2. Mo, X.M.., Gao, D.W., 2010. SYBR Green I real-time polymerase chain reaction for detection of Norovirus II in the shellfish. Chin. J. Biotech. 26, 817-822.
3. Robert, L.A.,Mary, K.E., 2006. The EpidemiologicandClinical Importanceof Norovirus Infection. Gastroenterol.Clin.NAm. 35,275-290.
4. Si, H.L., Wang,J.W., Xu, X.W., WANG, J.H., QU, J.G., Hong, T., 2006. Development of a TaqMan-based Real-time Reverse Transcription PCR forDetecting GenogroupII Norovirus in Clinical Stool samples. Chinese Journal Of Virology. 22,166-170.
5. Vinjé, J., Vennema, H., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S.S., Monroe, S.S., de Bruin, E., Svensson, L., Koopmans, M.P., 2003. International Collaborative Study to Compare Reverse TranscriptasePCR Assays for Detection andGenotyping of Noroviruses. J. Clin. Microbiol.41,1423-1433.
6. Wolf, S., Williamson, W.M., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Lin, S., Ball, A., Scholes, P., Greening, G.E., 2007. Sensitive multiplexReal-time reverse transcription-PCR assay for the detection ofhuman and animal noroviruses in clinical and environmental samples. Appl. Environ.Microbiol. 73,5464-5470.

【研制单位】浙江峰盛生物工程有限公司

【生产单位】无锡纳奥生物医药有限公司

联系地址：无锡市马山梅梁路136号6号楼5楼，邮编：214091

联系电话：0510-85993375，传真：0510-85993372

邮箱：sales@focusgen.com，网址：www.focusgen.com

【生产许可证编号】苏食药监械生产许2012-0104号

【医疗器械注册证编号】

【说明书版本与日期】201505，2015年5月11日