

诺如病毒 (NV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【产品名称】

商品名称: 诺如病毒 (NV) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

Name : Norwalk Virus RNA Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】 25T/盒、50T/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于检测的粪便或腹泻物等标本中诺如病毒 RNA, 适用于诺如病毒感染的辅助诊断。其检测结果仅供参考。

【检验原理】

本试剂盒用一对诺如病毒特异性引物, 结合一条特异性荧光探针, 用一步法荧光 RT-PCR 技术对诺如病毒 RNA 进行体外扩增检测, 用于临床上对可疑感染者的病原学诊断^[2]。

【试剂组成】

| 包装规格 | 25T/盒 | 50T/盒 |
|----------|--------------------------|--------------------------|
| NV 反应液 | 500 μ L \times 1 管 | 500 μ L \times 2 管 |
| 酶液 | 25 μ L \times 1 管 | 50 μ L \times 1 管 |
| NV 阳性质控品 | 50 μ L \times 1 管 | 50 μ L \times 1 管 |
| 阴性质控品 | 250 μ L \times 1 管 | 250 μ L \times 1 管 |

注:

- 1) 不同批号试剂不能混用。
- 2) 试剂盒内各试剂组份足够包装规格所标示的检测次数。

【储存条件及有效期】

-20 \pm 5 $^{\circ}$ C, 避光保存、运输、反复冻融次数不超过 5 次, 有效期 12 个月。

【适用仪器】

ABI、安捷伦 MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf 等系列荧光定量 PCR 检测仪。

【标本采集】

取粪便或腹泻物置入无菌玻璃管中, 用无菌棉球将试管塞紧后, 密闭送检。

【保存和运输】

上述标本短期内可保存于-20 $^{\circ}$ C, 长期保存可置-70 $^{\circ}$ C, 但不能超过 6 个月, 标本运送应采用 2~8 $^{\circ}$ C 冰袋运输, 严禁反复冻融。

【使用方法】

1. 样品处理 (样本处理区)

1.1 样本前处理

取适量黄豆颗粒大小粪便或水样腹物置于 1.5mL 离心管中, 按 RNA 提取试剂盒说明书进行提取。

1.2 核酸提取

推荐采用上海将来实业股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (磁珠法或离心柱法) 进行核酸提取, 请按照试剂说明书进行操作。

2. 试剂配制 (试剂准备区)

根据待检测样本总数, 设所需要的 PCR 反应管数为 N(N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照; 反应管数每满 10 份, 多配制 1 份), 每测试反应体系配制如下表:

| 试剂 | NV 反应液 | 酶液 |
|----|------------|-----------|
| 用量 | 20 μ L | 1 μ L |

将混合好的测试反应液分装到 PCR 反应管中, 21 μ L/管。

3. 加样 (样本处理区)

将步骤 1 提取的核酸、阳性质控品、阴性质控品各取 4 μ L, 分别加入相应的反应管中, 盖好管盖, 混匀, 短暂离心。

4. PCR 扩增 (核酸扩增区)

4.1 将待检测反应管置于荧光定量 PCR 仪反应槽内;

4.2 设置好通道、样品信息, 反应体系设置为 25 μ L; 荧光通道选择: 检测通道 (Reporter Dye) FAM, 淬灭通道 (Quencher Dye) NONE, ABI 系列仪器请勿选择 ROX 参比荧光, 选择 None 即可。

4.3 推荐循环参数设置:

| 步骤 | 循环数 | 温度 | 时间 | 收集荧光信号 |
|----|-----------|-----|-------|--------|
| 1 | 1 cycle | 42℃ | 20min | 否 |
| 2 | 1 cycle | 95℃ | 10min | 否 |
| 3 | 40 cycles | 94℃ | 15sec | 否 |
| | | 55℃ | 30sec | 是 |

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定

设置 Baseline 和 Threshold: 一般直接按机器自动分析的结果分析, 当曲线出现整体倾斜时, 根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值(一般可在 3~15 范围内调节)、stop 值(一般可在 5~20 范围内调节), 以及 Threshold 的 Value 值(上下拖动阈值线至高于阴性对照), 重新分析结果。

5.2 结果判断

阳性: 检测通道 Ct 值 \leq 35, 且曲线有明显的指数增长曲线;

可疑: 检测通道 35<Ct 值 \leq 38, 建议重复检测, 如果检测通道仍为 35<Ct 值 \leq 38, 且曲线有明显的增长曲线, 判定为阳性, 否则为阴性;

阴性: 样本检测结果 Ct 值>38 或无 Ct 值。

6. 质控标准

阴性质控品: Ct>38 或无 Ct 值显示;

阳性质控品: 扩增曲线有明显指数生长期, 且 Ct 值 \leq 32;

以上条件应同时满足, 否则实验视为无效。

7. 检测方法的局限性

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关;
2. 样本提取过程中没有控制好交叉污染, 会出现假阳性结果;
3. 阳性对照、扩增产物泄漏, 会导致假阳性结果;
4. 病原体在流行过程中基因突变、重组, 会导致假阴性结果;
5. 不同的提取方法存在提取效率差异, 会导致假阴性结果;
6. 试剂运输, 保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降, 出现假阴性或定量检测不准确的结果;
7. 本检测结果仅供参考, 如须确诊请结合临床症状以及其他检测手段。

【注意事项】

1. 所有操作严格按照说明书进行;
2. 试剂盒内各种组分使用前应自然融化, 完全混匀并短暂离心;
3. 反应液应避光保存;
4. 反应中尽量避免气泡存在, 管盖需盖紧;
5. 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服;
6. 样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行, 以免交叉污染;
7. 实验完毕后用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器;
8. 试剂盒里所有物品应视为污染物对待, 并按照《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。