



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3661—2013

---

## 口岸食源性疾病轮状病毒(A组) 荧光 PCR 检测

Detection for rotavirus (group A) of foodborne disease by  
real-time fluorescence PCR at ports

2013-08-30 发布

2014-03-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：史玲莉、韩伟、闫冀焕、沈军、王惠兰、董辉、崔鹰。

## 口岸食源性疾病轮状病毒(A组) 荧光 PCR 检测

### 1 范围

本标准规定了国境口岸食源性轮状病毒(A组)的荧光 PCR 快速检测方法,包括标本采集、运输与保存、处理、核酸提取与检测、结果分析以及相应的生物安全措施。

本标准适用于国境口岸出入境腹泻患者粪便样本、呕吐物和可疑食品的轮状病毒(A组)筛查检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 4789.1—2003 食品卫生微生物学检验 总则

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1720—2006 出入境口岸轮状病毒感染监测规程

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**轮状病毒 rotavirus**

属于呼肠孤病毒科轮状病毒属,是引起哺乳动物类和鸟类腹泻的主要病原体。轮状病毒是双链 RNA 病毒,基因组分 11 个节段,轮状病毒有 7 个血清组(A-G),其中 A、B、C 组与人类疾病有关,A 组轮状病毒主要引起儿童腹泻,B 组轮状病毒主要引起成人腹泻。

#### 3.2

**荧光 PCR fluorescence polymerase chain reaction**

又称为实时 PCR(real-time PCR),是在普通 PCR 的基础上利用荧光染料在激发光作用下所释放的荧光光能的变化来直接反映 PCR 扩增产物量变化的技术。本标准所采用的是 Taq Man 水解探针法,其原理是在常规 RT-PCR(反转录聚合酶链式反应)的基础上,加入一条特异性的荧光探针,该探针为一段寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,PCR 扩增时,利用 Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切水解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可以接收到荧光信号,实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成同步。

#### 3.3

**Ct 值 cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

### 4 仪器和设备

#### 4.1 荧光定量 PCR 仪。

- 4.2 生物安全柜。
- 4.3 普通冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)。
- 4.4 超低温冰箱(-70℃)。
- 4.5 低速低温离心机(离心转速 $\geq 6\,200\text{ g}$ )。
- 4.6 高速冷冻离心机(离心转速 $\geq 13\,800\text{ g}$ , 4℃低温)。
- 4.7 微量可调移液器(10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ )及配套带滤芯吸头。
- 4.8 离心管(1.5 mL)。
- 4.9 涡旋振荡器。

## 5 试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,所用试剂均采用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

### 5.1 样本稀释液

商品化磷酸盐缓冲液(PBS:Phosphate Buffered Saline)(含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ), pH 7.2~7.4。也可参见附录 A.3 配制。

### 5.2 核酸提取试剂

选用病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Kit 试剂盒,德国 Qiagen 公司产品<sup>1)</sup>,内含 AVL、AW1、AW2、AVE 等成分。

### 5.3 核酸检测试剂

迅必达轮状病毒(A组)核酸检测试剂盒,成都新基因格生物科技有限公司产品<sup>1)</sup>。

## 6 标本的采集

### 6.1 粪便标本

采用无菌螺口便盒采集腹泻患者粪便标本,每份标本 5 mL~10 mL,用耐低温油性记号笔在便盒上做好标记,置于-20℃保存。轮状病毒感染者出现症状后 1 d~3 d 内粪便排毒量最大,因此应尽可能在此期间收集标本。

### 6.2 呕吐物标本

需要进行呕吐物中是否含有轮状病毒时,按照 SN/T 1720—2006 中 6.2.3.3 进行采样,置 4℃保存并立即送检。

### 6.3 可疑食品样本

需要调查食品是否被轮状病毒污染时,按照 GB/T 4789.1—2003 中第 3 章进行采样,置 4℃保存并立即送检。

---

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。



## 7 检测方法

### 7.1 样本处理和保存

#### 7.1.1 粪便样本的处理

取适量粪便标本加到 1.5 mL 离心管中,加入 PBS 样本稀释液,制备成 10% 的便悬液,振荡 3 次,每次 10 s,然后静置 10 min,4 ℃,6 200 g 离心 5 min,吸取上清液进行下一步试验或-20 ℃短期保存。

#### 7.1.2 呕吐物及可疑食品

呕吐物和可疑食品用 PBS 样本稀释液,制备成 20% 的悬液,4 ℃,6 200 g 离心 5 min,吸取上清进行下一步试验或-20 ℃短期保存。

#### 7.1.3 标本保存

标本如需长期保存,建议存放于-70 ℃冰箱。

### 7.2 核酸提取

按照病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取。

### 7.3 荧光 PCR 扩增

#### 7.3.1 引物和探针序列

以轮状病毒 VP7 区为检测靶序列,引物和探针序列如下:

——上游引物:5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC-3'

——下游引物:5'-AA(C/T)TG(C/T)GGTATATTCAATACCATACA-3'

——探针:5'-(Fam)-AA(A/G)GAGCTA(A/T)CCG(C/T)TAGCCAGACGG-(eclipse)-3'

#### 7.3.2 阳性对照和空白对照设置

每次检测分别设阳性对照和空白对照。阳性对照选用含有检测序列的轮状病毒(A组)的 RNA 作为荧光 PCR 反应的模板,空白对照用无菌超纯水作为荧光 PCR 反应的模板。

#### 7.3.3 荧光 PCR 反应体系

轮状病毒(A组)反应体系采用如下参数:氯化镁( $MgCl_2$ )2.5 mmol/L、dNTP 各 0.4 mmol/L、上下游引物各 0.4  $\mu$ mol/L、探针 0.2  $\mu$ mol/L、逆转录酶(M-MLV,200 U/ $\mu$ L)100 U、DNA 聚合酶(热启动 Taq 酶,5 U/ $\mu$ L)2.5 U、模板 RNA 2.0  $\mu$ L,加无菌超纯水至 20  $\mu$ L。

逆转录酶 M-MLV 应去除 Rnase H 活性。每个样品做两个平行样对照。

#### 7.3.4 荧光 PCR 反应程序

若仪器为 ABI 7500 型实时荧光 PCR 仪<sup>2)</sup>,荧光 PCR 反应程序采用如下参数:逆转录阶段:42 ℃,

2) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

## SN/T 3661—2013

10 min;预变性阶段:94 ℃,10 s;循环阶段(共40个循环);变性94 ℃,5 s,退火及延伸56 ℃,60 s。在退火及延伸过程中检测荧光信号。信号采集设为Fam荧光素。

由于不同的荧光定量PCR仪的性能存在差异,可通过条件优化适当调整PCR循环的退火温度及时间。

## 8 结果分析

### 8.1 基线范围设定

如果仪器要求设置基线(baseline)范围,起始循环设置一般大于3,结束循环设置一般比最早出现的扩增曲线提前1~2个循环。

### 8.2 阈值的设定

如果仪器要求设置阈值,设定阈值的一般原则是令阈值线刚好超过阴性对照的扩增曲线的最高点,也可根据仪器噪音情况进行调整。

### 8.3 荧光PCR反应系统的质量控制

反应结果应同时符合以下2个条件,否则试验结果无效:

- 空白对照:无Ct值(无扩增曲线);
- 阳性对照:Ct值小于30。

### 8.4 荧光PCR检测结果判定及报告

荧光PCR检测结果判定及报告:

- 阴性:无Ct值或Ct值>35,且没有出现S形扩增曲线,报告为轮状病毒(A组)荧光PCR检测阴性。
- 阳性:Ct值<35,且出现S形扩增曲线,报告为轮状病毒(A组)荧光PCR检测阳性。
- 可疑:Ct值在35~40之间且出现S形扩增曲线,可重复实验,如果重复实验仍有明显S形扩增曲线且阴性对照没有污染,可报告为轮状病毒(A组)荧光PCR检测阳性,否则为报告为阴性。

## 9 生物安全措施

实验室生物安全要求按照GB 19489和附录B执行。

附 录 A  
(规范性附录)  
样品稀释液配方

A.1 PBS(A) × 10 的配方

氯化钠 80 g, 氯化钾 2 g, 无水磷酸二氢钠 11.5 g, 磷酸二氢钾 2 g, 加去离子超纯水(DDW)至 1 000 mL。

A.2 PBS(B+C) × 50 的配方

氯化钙 25 g, 氯化镁 25 g, 加去离子超纯水(DDW)至 1 000 mL。

A.3 PBS(A+B+C)的配方

50 × PBS(B+C) 1.8 mL, 10 × PBS(A) 45 mL, 加去离子超纯水(DDW)至 400 mL 后用作样品稀释液。样品稀释液可以高压灭菌后分装于 4 °C 保存。

SN/T 3661—2013

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**生物安全要求**

中华人民共和国卫生部发布的《人间传染的病原微生物名录》规定,轮状病毒危害程度分类为第三类,所有有关轮状病毒的实验室操作应按照规定执行。

- a) 未经培养的轮状病毒感染性材料的操作须在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行。
  - b) 轮状病毒相关的灭活材料和无感染性材料操作可在生物安全一级(BSL-1)实验室内进行。
  - c) 轮状病毒感染性材料运输包装分类为B类,UN 编号为 UN3373。
-