

T/BPMA

北京预防医学会团体标准

T/BPMA 24—2024

生活饮用水中诺如病毒定量检测 实时荧光 PCR 方法

Quantitative detection of Norovirus in drinking water—
Real-time PCR Method

2024 - 04 - 23 发布

2024 - 04 - 23 实施

北京预防医学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由北京市通州区疾病预防控制中心提出。

本文件由北京预防医学会归口。

本文件起草单位：北京市通州区疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、北京市疾病预防控制中心、北京市朝阳区疾病预防控制中心、北京市丰台区疾病预防控制中心、北京市怀柔区疾病预防控制中心、北京市昌平区疾病预防控制中心、北京市大兴区疾病预防控制中心

本文件主要起草人：高翔、张晓、李晓辉、钱城、赵剑虹、秦萌、姬莉莉、舒高林、王希峰、王艳春、杨冬梅、赵春艳、王建国、刘波、邢方潇、孙灵利、高艳青、邹林、张萍、甄博珺、高洁、周景林、李冬梅、侯宛祺、邓富昌、侯敏、郑旭、周少磊、张建明、崔燕、郑燃燃、郭晓晨、赵凤玲、罗宇馨、韩桃利、颜涛、王艺鎔、马琳、李东迅、彭华、银安琪、黄震、王润萍、刘杨、常馨、李秋虹、邵春昕、王凤君

生活饮用水中诺如病毒定量检测 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本文件描述了生活饮用水中诺如病毒富集和实时荧光定量检测方法。
本文件适用于市政管网末梢水、二次供水、自备井水中诺如病毒GI/GII群的定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 5750.2 生活饮用水标准检测方法 水样的采集与保存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

诺如病毒 Norovirus, NoV

杯状病毒科，诺如病毒属，分子结构为单股正链RNA病毒，基因组长度为7 kb~7.5 kb，病毒直径约为26 nm~35 nm，无包膜，表面粗糙，球形，呈二十面体对称。

注：诺如病毒分10个基因群GI~GX，GI、GII是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因群。

4 设备和材料

4.1 实时荧光 PCR 仪。

4.2 微生物快速富集系统：配套使用中空纤维型滤膜，孔径 0.05 μm。

4.3 涡旋振荡器。

4.4 核酸提取仪。

4.5 微量移液器及其无 RNase 带滤芯移液器吸头：10 μL、20 μL、200 μL、1 mL。

4.6 1.5 mL 无 RNase 离心管、无 RNase PCR 管或 PCR 板。

5 试剂

5.1 诺如病毒 GI/ GII 基因组引物、探针如下：

诺如病毒 GI 基因组引物、探针：

GI上游引物：5' -CGC TGG ATG CGN TTC CAT-3'

GI下游引物：5' -CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC-3'

GI探针：5' -VIC-TGG ACA GGA GAY CGC-MGB-3'

诺如病毒 GII 基因组引物、探针：

GII上游引物：5' -ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA-3'

GII下游引物：5' -TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3'

GII探针：5' -FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-BHQ1-3'

5.2 RNA 提取试剂盒。

5.3 一步法 RT-qPCR Mix (Taqman) 试剂盒。

注：可选用诺如病毒核酸检测试剂盒。

5.4 诺如病毒核酸标准品试剂盒：线性化标准质粒。如：

a) GI 诺如病毒 (GenBank 登录号 m87661) 的 5291~5376 86 bp；

b) GII 诺如病毒病毒 (GenBank 登录号 x86557) 的 5012~5100 89 bp。

6 检测步骤

6.1 采样

水样采集按照 GB/T 5750.2 执行，采样量 1 L。

6.2 样本的运输与保存

0 °C~4 °C 条件下储存和运输，于 2 h 内运送到实验室。24 h 内完成混匀、病毒富集处理、核酸提取及实时荧光反转录聚合酶链式反应 (Real-time RT-PCR) 检测。

6.3 病毒富集

用微生物快速富集系统，富集过程始终保持富集管尖端插入液面以下，待生活饮用水全部富集后洗脱，洗脱液收集于 1.5 mL 无 RNase 离心管中，体积 300 μL (V_3)。

6.4 核酸检测

6.4.1 核酸提取

按照 RNA 提取试剂盒说明书，取 200 μL 洗脱液 (V_2) 进行核酸提取，提取的 RNA 存在于洗脱液中，洗脱液体积 (V_1)，提取完成后应立即封盖，置于冰上，并马上进行 Real-time RT-PCR 检测。剩余的洗脱液和 RNA 样本应置于 -86 °C~-40 °C 冰箱冻存，避免反复冻融。

6.4.2 Real-time RT-PCR 检测

6.4.2.1 参照诺如病毒核酸检测试剂盒说明书或反应体系见表 1。

表1 反应体系

试剂	终浓度 (在 25 μL 体系中)	体积 (μL)
2×RT-缓冲液	1×	12.5
RT-PCR Enzyme Mix	—	1.0
GI 上游引物 (20 μmol/L)	0.5 pmol/μL	0.625
GI 下游引物 (20 μmol/L)	0.9 pmol/μL	1.125
GII 上游引物 (20 μmol/L)	0.5 pmol/μL	0.625
GII 下游引物 (20 μmol/L)	0.9 pmol/μL	1.125
GI 探针 (10 μmol/L)	0.25 pmol/μL	0.625
GII 探针 (10 μmol/L)	0.25 pmol/μL	0.625
无核酸酶水	—	1.75
样本/空白对照/阴性对照/阳性对照	—	5.0

6.4.2.2 参照诺如病毒核酸检测试剂盒说明书或扩增循环参数见表2。

表2 扩增循环参数

程序	循环数	温度 (°C)	反应时间
1	1	50	30 min
2	1	95	5 min
3	45	95	15 s
		60	30 s 采集荧光
		65	30 s

6.4.2.3 检测过程(包括 RNA 模板制备), 均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中阳性对照模板为诺如病毒核酸标准品, 阴性对照模板为不含诺如病毒样本 RNA, 空白对照模板为无 RNase 超纯水。若选用诺如病毒核酸检测试剂盒, 则依据试剂盒说明书操作。

6.5 标准曲线

将诺如病毒核酸标准品稀释为 $3.2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 、 $16 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 、 $8 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 、 $4 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 、 $2 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 5个稀释度, 每个稀释度做3个平行, 进行Real-time RT-PCR检测。根据诺如病毒核酸标准品的扩增Ct值与标准品初始模板拷贝数的对数值间的线性关系, 以诺如病毒核酸标准品初始拷贝数的对数作为横坐标, Ct值作为纵坐标, 分别绘制诺如病毒GI基因组和诺如病毒GII基因组的标准曲线。 $R^2 \geq 0.99$ 时, 标准曲线有效。标准曲线公式见公式(1)。

$$y = ax + b \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- y—待测样品的Ct值;
- a—标准曲线的斜率;
- x—样本RNA浓度以10为底数的对数;
- b—标准曲线的截距。

7 结果与报告

7.1 结果

根据公式(2)计算样本RNA浓度, 单位为copies/ μL 。

$$C_0 = 10^{\frac{y-b}{a}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- C_0 —扩增起始拷贝浓度;
- y—待测样品的Ct值;
- a—标准曲线的斜率;
- b—标准曲线的截距。

7.2 结果判定

需满足以下质量控制要求, 阳性对照应出现典型扩增曲线, 且 $Ct \leq 30$; 阴性对照无典型扩增曲线或 $Ct \geq 45$; 空白对照无典型扩增曲线或 $Ct \geq 45$ 。否则, 检验结果无效。待测样品的Ct值大于等于45时, 判定为诺如病毒阴性。待测样品的Ct值 ≤ 38 时, 曲线为S型, 判定为诺如病毒阳性。待测样品的Ct值 $> 38, < 45$ 时, 应重新检测; 重新检测结果 ≥ 45 时, 判定为诺如病毒阴性; 若重新检测结果 < 45 , 曲线为S型, 则判定为诺如病毒阳性。阳性结果依据标准曲线, 计算扩增起始拷贝浓度。

注: 若使用诺如病毒核酸检测试剂盒则参照试剂盒说明书进行判定。

根据公式(3)计算生活饮用水样本中的诺如拷贝浓度, 单位为copies/mL。

$$C = \frac{C_0 \times V_1 \times V_3}{V_2 \times 1} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

C—样本中诺如拷贝浓度, 单位: copies/L。

C_0 —扩增起始拷贝浓度, 由标准曲线公式带入得出, 单位: copies/ μ L。

V_1 —核酸提取后RNA模板的体积, 单位: μ L。

V_2 —核酸提取上样体积, 在此方法中为200 μ L, 单位: μ L。

V_3 —1L生活饮用水病毒富集后体积, 在此方法中为300 μ L, 单位: μ L。

1—原始生活饮用水样本体积1 L, 单位: L。

7.3 检出限

病毒富集采用膜过滤(0.05 μ m滤膜)方法时, 方法检出限为 8.25×10^4 copies/L水。

7.4 报告

根据检测结果, 报告“检出诺如病毒基因, 含量为 $\times \times$ copies/L水”或“未检出诺如病毒基因/L水”。

参 考 文 献

[1]GB 4789.42-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验

全国团体标准信息平台