

- 2.1 取出试剂盒，在室温下解冻震荡后，在离心机上低速瞬时离心备用。
- 2.2 根据待扩增样本测试数配制反应液，每测试反应液配制方案见下表：

组分名称	体积 (μL)
RT-PCR 反应液	18
酶混合物	3
新型冠状病毒引物探针	2
流感 A/B 引物探针	2
总体系	25

- 2.3 配好的反应液按每个测试 25μL 加入到扩增反应管中。
- 2.4 在加好反应液的反应管中分别加入 25μL 提取好的待测样本核酸、阴性对照和阳性对照，盖上管盖（若为 PCR 反应板则封膜），瞬时离心，室温放置 5 分钟后转移到扩增检测区。

3. PCR 扩增（扩增检测区）

- 3.1 将 PCR 反应管（板）放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。
- 3.2 扩增检测参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1 逆转录	50°C	10min	1
2 预变性	95°C	2min	1
3 变性	95°C	5s	45
退火、延伸及荧光检测	60°C	35s	

步骤3中60°C时荧光检测，检测通道为FAM、VIC、CY5、ROX。

4. 结果分析

反应结束后自动保存结果，根据分析后扩增曲线调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，同时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”窗口读取结果。

【阳性判断值】

采用ROC曲线法统计确定本试剂盒各通道的Cut-Off值如下：

通道	Cut-Off	扩增靶标
FAM	39	N/E基因
ROX	40	ORF1ab
CY5	38	甲型/乙型流感病毒
VIC	40	MS2

【检验结果的解释】

质量控制

1. 阴性对照（NC）的检测结果为FAM、ROX和CY5通道均为阴性、内标VIC通道为阳性。
2. 阳性对照（PC）的检测结果为FAM、ROX、CY5和VIC通道均为阳性。
3. 以上结果应在同一次实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新实验。

结果判读

1. N/E基因检测通道Ct值<39或ORF1ab Ct值<40，为新型冠状病毒阳性；
2. N/E基因检测通道Ct值≥39或无数值，且ORF1ab检测通道Ct值≥40或无数值，且内标检测通道Ct值≤40，为新型冠状病毒阴性；
3. 甲型/乙型流感病毒检测通道Ct值≤38，为甲型/乙型流感病毒阳性；
4. 甲型/乙型流感病毒检测通道Ct值≥40，且内标检测通道Ct值≤40，为甲型/乙型流感病毒阴性；
5. 38<甲型/乙型流感病毒检测通道Ct值<40，建议重新提取核酸后复测，复测后Ct值<40，且内标检测通道Ct值≤40，判为甲型/乙型流感病毒阳性；复测后Ct值≥40或无数值，且内标检测通道Ct值≤40，判为甲型/乙型流感病毒阴性。

【检验方法的局限性】

1. 阴性结果不能完全排除靶基因的存在，样本中病毒含量过低、样本降解、样本污染、样本中存在过量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期等亦可能产生阴性检测结果。
2. 本试剂盒主要针对样本核酸的定性检测，结果不能反映原始样本中病毒核酸含量。
3. 本试剂盒检测的靶序列在各毒株间都是高度保守且较稳定，但如果在靶序列处发生基因突变，则有可能造成假阴性结果。
4. 低于检测限的样本可能无法检出，故检测结果不作为临床诊断或排除病例的唯一依据，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
5. 核酸检测从理论上并不能完全检测出“窗口期”感染。
6. 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统。
7. 本试剂盒检测结果与临床诊断结论不一致时，建议对检验结果进行复检，并最终临床诊断结论为准。
8. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况，综合考虑。
9. 本试剂盒检测结果只提示流感病毒阳性，无法区分型别。
10. 本试剂盒内标为外源性质控，无法监控采样过程。

【产品性能指标】

1. 阴性参考品符合率：使用国家参考品或企业阴性参考品进行检测，结果应符合国家参考品规定或企业阴性参考品检测结果要求。
2. 阳性参考品符合率：使用国家参考品或企业阳性参考品进行检测，结果应符合国家参考品规定或企业阳性参考品检测结果要求。
3. 最低检测限：新型冠状病毒不高于200 copies/mL、甲型流感病毒不高于400 copies/mL，乙型流感病毒不高于1400 copies/mL。

4. 精密性：批内/批间精密性，日内/日间精密性，实验室内/间精密性，不同操作者之间的精密性变异系数均不大于5%。
5. 干扰物质：经研究在以下浓度的干扰物质存在时，不对检测结果造成干扰。

干扰物	研究浓度 μg/mL	干扰物	研究浓度 μg/mL	干扰物	研究浓度 μg/mL
粘蛋白	100	布地奈德	150	洛匹那韦	100
人血液	1000	莫米松	1	利托那韦	1
苯福林	10	氟替卡松	1	阿比多尔	200
羟甲唑啉	1	盐酸组胺	25	左氧氟沙星	750
氯化钠（含防腐剂）	1000	α-干扰素	1000	妥布霉素	1.5
倍氯美松	1000	扎那米韦	10	阿奇霉素	500
地塞米松	500	利巴韦林	300	头孢曲松	200
氟尼缩松	10	奥司他韦	75	美罗培南	20
曲安奈德	1	帕拉米韦	10	/	/

6. 交叉反应：人冠状病毒病毒229E、HKU1、OC43、NL63核酸、SARS、MERS、呼吸道合胞病毒A、B型、副流感病毒1、2、3型、鼻病毒A、B、C组、腺病毒1、2、3、4、5、7、55型、肠道病毒A、B、C、D组、人偏肺病毒、EB病毒、麻疹病毒、人巨细胞病毒、轮状病毒、诺如病毒、腮腺炎病毒、水痘-带状疱疹病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、军团菌、百日咳杆菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、肺炎克雷伯菌、结核分枝杆菌、烟曲霉、白色念珠菌、光滑念珠菌、新生隐球菌病原体核酸以及人基因组核酸在试验浓度条件下，均无交叉反应。
7. 包容性：对不同时间、不同区域特征性的不同来源的咽拭子临床样本进行最低检出限和重复性能验证，符合要求。
8. 临床试验：在4家机构开展的临床试验结果显示，与同类产品相比，检测741例2019-nCoV临床样本，阳性一致率为99.1%；阴性一致率为99.0%，总体一致率为99.0%；检测740例2019-nCoV临

新型冠状病毒 2019-nCoV 和甲型乙型流感病毒核酸联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：新型冠状病毒 2019-nCoV 和甲型乙型流感病毒核酸联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

50 测试/盒、100 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测新型冠状病毒感染的肺炎疑似病例、疑似聚集性病例患者、其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者的咽拭子样本中新型冠状病毒（2019-nCoV）ORF1ab、E 和 N 靶基因以及甲型/乙型流感病毒（Flu A/B）核酸。

有关“疑似病例”、“疑似聚集性病例患者”等人群的定义参照《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》、《新型冠状病毒感染的肺炎病例监测方案》等文件（现行版本）执行。

本试剂盒使用上应当遵守《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》、《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》等文件（现行版本）的相关要求。开展病毒核酸检测时应符合《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》等文件的要求，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护设施及防护程序，做好生物安全工作。

试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

流行性感冒是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病，春冬季节高发，传播迅速，发病率高，流行期短，易引起暴发流行或大流行，控制难度较大。流感病毒包括甲、乙、丙三型，甲型变异性强，最易引起大规模的全球大流行，乙型变异较小，但也易引发流行。流感病毒主要经空气飞沫传播，常引起发热、流涕、咽痛、咳

嗽、头痛、乏力、肌肉酸痛以及轻到中度的呼吸道症状，重者可致肺炎、心肌炎和心衰。

【检验原理】

本试剂盒通过实时荧光 PCR 扩增检测技术：使用荧光标记的探针，通过检测扩增过程中荧光报告基团发出的荧光强度，实时监控 PCR 产物的数量。检测探针与内标探针均带有荧光报告基团和淬灭基团，通过标记不同颜色的荧光基团来区分，在不同的波长区独立检测。当探针为完整时，荧光报告基团接近淬灭基团，由于 Förster 能量转移效应，荧光被抑制。PCR 扩增过程中，探针与靶序列杂交，并为 DNA 聚合酶的 5'→3'核酸酶活性所切割。一旦荧光报告基团和淬灭基团分离，淬灭作用被解除，报告荧光增加。通过预设循环数，每次有效循环均会导致报告基团的荧光强度的增加。扩增曲线开始指数增长时的 PCR 循环数与起始样本的模板数有关。

选取新型冠状病毒 2019-nCoV 的 ORF1ab、N 基因和 E 基因作为扩增靶区域，设计特异性引物和荧光探针，其中 N 和 E 基因用 FAM 标记，ORF1ab 用 ROX 标记，检测样本中是否含有新型冠状病毒 RNA。选取甲型/乙型流感病毒的保守序列，设计特异性引物和荧光探针，用 CY5 标记，检测样本中是否含有甲型/乙型流感病毒 RNA。选取非人基因组非试剂盒检测靶标的其他物种序列设计内标引物探针 MS2 基因，用 VIC 标记，用以监控整个实验流程。

在反应体系中加入 UDg 酶防污染体系，其作用原理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而消除 PCR 扩增产物的污染。下表列明了本试剂盒检测的靶基因及其对应的荧光信号。

荧光信号	靶标
FAM	新型冠状病毒 E 基因和 N 基因
VIC	MS2
ROX	新型冠状病毒 ORF1ab
CY5	Flu A/B

3D-2019nCoV-2.0-IFU-001-02

1/10

3D-2019nCoV-2.0-IFU-001-02

2/10

【主要组成成分】

试剂名称	主要组成成分	数量 (50 测试/盒)	数量 (100 测试/盒)
阴性对照	无核酸酶水	200μL×1 支	200μL×1 支
阳性对照	流感 A/B、新型冠状病毒假病毒混合物	200μL×1 支	200μL×1 支
内标	RNA 假病毒	50μL×1 支	100μL×1 支
RT-PCR 反应液	Tris、镁离子、dA/G/C/UTPs	900μL×1 支	1800μL×1 支
酶混合物	DNA 聚合酶、逆转录酶、UDG 酶	150μL×1 支	300μL×1 支
新型冠状病毒引物探针	寡核苷酸	100μL×1 支	200μL×1 支
流感 A/B 引物探针	寡核苷酸	100μL×1 支	200μL×1 支

注：不同批号试剂盒中各组分不可互相混用。

需要但不包含的试剂、仪器和耗材

分类	试剂盒名称/仪器名称
试剂	核酸提取试剂（上海思路迪生物医学科技有限公司，沪闵械备 20200069 号）
仪器	核酸提取仪或工作站、荧光 PCR 仪、离心机、各种规格的移液器
耗材	PCR 扩增反应管、PCR 扩增板、封板膜、移液器 Tip 头

【储存条件及有效期】

试剂盒于 -20±5℃ 避光保存，有效期为 12 个月；反复冻融次数建议不超过 10 次。生产日期、有效期至：见产品外包装。

【适用仪器】

荧光 PCR 扩增仪：ABI 7500。

【样本要求】

1. 样本类型：咽拭子。
2. 样本采集

咽拭子：用聚丙烯纤维头的塑料杆拭子在被采集者两侧咽喉扁桃体稍微用力来回擦拭至少 3 次，然后再在咽后壁上擦拭至少 3 次，

3D-2019nCoV-2.0-IFU-001-02

3/10

将拭子头浸入含 2~3mL 病毒保存液（样本保存液材质为：生理盐水、病毒保存液或胍盐裂解液）的管中，尾部弃去，旋紧管盖，及时送检。

3. 样本保存

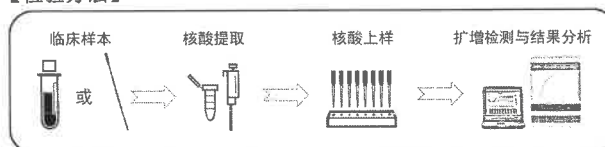
用于核酸检测的标本可直接置于含胍盐浓度 3 M 的保存液中进行裂解灭活，也可保存于含病毒培养液的基质中，样本采集后可采取热灭活处理。

样本采集后应尽快进行检测，无法立即检测的，可在 24 小时内检测的标本可置于 2~8℃ 保存；24 小时内无法检测的标本则应置于 -70℃ 或以下保存（如无 -70℃ 保存条件，则于 -20±5℃ 可暂存 7 天）。样本在使用时避免反复冻融，冻融次数不超过 3 次。提取后的核酸在 -20±5℃ 保存 30 天内可以使用。

4. 样本处理、保存、运输和 RNA 提取

应遵守卫健委《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》的要求，并遵守《中华人民共和国传染病防治法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》等法律、行政法规的规定。

【检验方法】



1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

推荐使用思路迪 ANDiS 350 全自动核酸提取仪及配套的核酸提取试剂盒进行核酸提取纯化操作。阴性对照、阳性对照应同步参与提取，每份样本加入 1μL 内标进行核酸提取操作；如果只监控 RT-PCR 过程，可提取后的内标加入抽提好的 RNA 中。具体参考提取试剂说明书操作。

2. 试剂准备（试剂准备区）

3D-2019nCoV-2.0-IFU-001-02

4/10