

新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒（荧光PCR法）说明书

【产品名称】

通用名称：新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒（荧光PCR法）

【包装规格】

32测试/盒、64测试/盒、96测试/盒、192测试/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测具有新型冠状病毒感染相关症状人群、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基因、E基因和N基因。

本试剂盒检测结果应结合流行病学史、临床表现、其他实验室检查等进行综合分析，作出诊断。

该产品在使用上应当遵守新型冠状病毒感染诊疗方案等文件的相关要求。开展新型冠状病毒核酸检测，应符合新冠病毒样本采集和检测技术相关指南的要求，做好生物安全工作。

【检验原理】

本产品利用针对2019-nCoV（ORF1ab/E/N基因）设计的特异性引物和荧光探针，应用实时荧光定量PCR技术，通过监测荧光信号的变化实现对病毒核酸的检测，并通过检测内源性内标监测样本采集、保存、运输，核酸提取及扩增过程，可有效防止假阴性检测结果。

【主要组成成分】

组分名称	主要成分	32测试/盒	64测试/盒	96测试/盒	192测试/盒
qRT-PCR反应液	引物、探针、dNTP、Mg ²⁺ 、缓冲液	544 μL × 1管	1088 μL × 1管	816 μL × 2管	1632 μL × 2管
qRT-PCR酶混合液	Taq酶、UDG酶	96 μL × 1管	192 μL × 1管	288 μL × 1管	576 μL × 1管
阴性质控品	含内标检测基因片段的RNA假病毒	450 μL × 1管	900 μL × 1管	1350 μL × 1管	1350 μL × 1管
阳性质控品	含目的检测基因片段的RNA假病毒、含内标检测基因片段的RNA假病毒	450 μL × 1管	900 μL × 1管	1350 μL × 1管	1350 μL × 1管

不同批号试剂盒中各组分不能互换。

需配套以下产品使用：

核酸提取或纯化试剂	川蓉械备20170046号
QIAamp Viral RNA Mini Kit	
一次性使用病毒采样管	苏泰械备20180169号
一次性使用采样器	渝械备20200077号
病毒采样试剂盒	京械注准20182400236
一次性使用病毒采样管	川蓉械备20220123号

【储存条件及有效期】

本产品于-10℃~-30℃密闭避光保存，有效期为12个月。反复冻融次数不超过6次。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

适用于ABI 7500，宏石SLAN-96P荧光定量PCR仪。

【样本要求】

1.样本类型及采集要求：按照《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》标准操作采集急性期呼吸道标本（咽拭子）。将采集的咽拭子放入含有病毒保存液的病毒采样管中，尾部弃去，旋紧管盖。

2.保存条件：采集的待测样本应及时送检，样本于2℃~8℃保存不应超过24小时；超过24小时保存应置于-70℃以下，可保存3个月；反复冻融不超过5次。

3.病毒灭活：提前将水浴箱预热至56℃，在生物安全柜内用75%乙醇对装有标本的密封袋进行喷洒消毒，用吸水纸擦拭后放入水浴锅中的试管架上，标本盖上搁置重物，防止标本采集管漂浮。每隔10分钟将标本摇匀1次（动作轻柔），灭活时间30分钟。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1取出试剂盒和核酸提取或纯化试剂的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，混匀后瞬时离心备用；

1.2按下表配制qRT-PCR混合液：

名称	试剂	用量/测试	测试数
qRT-PCR混合液	qRT-PCR反应液	17 μL	N=n+2
	qRT-PCR酶混合液	3 μL	

注：测试数N=n+2，其中n表示待测样本数量，另2份为阴性质控品、阳性质控品。应根据实验室情况，适当考虑混合液分装过程中的损耗。

1.3将上述准备好的试剂转移至样本处理区，混匀备用。

2. 样本处理（在样本处理区进行）

2.1核酸提取

请参照配套核酸提取或纯化试剂的说明书进行操作，样本加样量推荐采用下表：

核酸提取试剂	使用样本体积	核酸洗脱体积
核酸提取或纯化试剂	200 μL	35 μL
QIAamp Viral RNA Mini Kit	140 μL	80 μL

2.2加样

在已加入qRT-PCR混合液的PCR反应管/板上分别加入处理好的阴、阳性质控品及待测样本核酸各20 μL，终体积为40 μL。盖紧管盖或封膜，瞬间低速离心后置荧光定量PCR仪。

3. PCR扩增（在扩增区进行，请参照各适用仪器使用说明书进行设置）

3.1将PCR反应管/板放入仪器样品槽，按顺序设置阴性质控品、阳性质控品及待测样本，并设置样本名称。

3.2荧光检测通道选择（以ABI 7500仪器为例）：

· 检测通道设置为FAM（Reporter: FAM, Quencher: None）；

ROX（Reporter: ROX, Quencher: None）；Cy5（Reporter: Cy5, Quencher: None）

· 内标设置为HEX或VIC（Reporter: HEX/VIC, Quencher: None）。

3.3反应体系：40 μL。

3.4循环参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1 逆转录反应	55℃	15min	1
2 Taq酶活化，预变性	95℃	2min	1
3 变性	95℃	15sec	40
退火，延伸，荧光采集	58℃	35sec	
4 仪器冷却	40℃	10sec	1

3.5设置完毕，保存文件，运行反应程序。

4. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节基线的Start值、End值以及Threshold值（用户可根据实际情况自行调整，Start值可设在3~15、End值可设在5~20，调整阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），不同的靶标根据对应阴性调整基线、阈值（阈值线的设置原则以刚好超过阴性质控品曲线和样本的荧光背景值的最高点为准）。选择Analyze进行分析，在报告界面查看结果。

5. 质量控制

同一次实验需同时满足以下条件，否则该次实验无效，需重新进行。

5.1阴性质控品：HEX或VIC通道Ct值≤38，ROX通道>37或无Ct值，其余通道>38或无Ct值；

5.2阳性质控品：扩增曲线呈S型，HEX或VIC通道Ct值≤38，其余Ct值≤32。

【检验结果的解释】

1.靶基因检测Ct值判读：

Ct值判读	阴性	阳性
FAM通道（ORF1ab基因）	>38或无Ct值	≤38
ROX通道（E基因）	>37或无Ct值	≤37
Cy5通道（N基因）	>38或无Ct值	≤38
HEX或VIC通道（内标）	>38或无Ct值	≤38

当HEX或VIC通道检测结果为阳性时，检测结果有效；或者HEX或VIC通道检测结果为阴性，但FAM通道、ROX通道和Cy5通道中至少有一个检测结果为阳性时，检测结果有效。

2.样本结果判定：

根据上述检测结果，判断如下：

检测结果	结果判断
ORF1ab、N、E基因均(+)	2019-nCoV 阳性。
ORF1ab且N基因(+)	

ORF1ab且E基因(+)	
仅有ORF1ab基因(+)	重复测定, 若仍为(+), 则判为2019-nCoV 阳性。
仅有ORF1ab基因(-)	重复测定, 若ORF1ab为(+)且E基因和/或N基因(+), 则判为2019-nCoV 阳性; 其他情况均判为“可疑”, 需隔期复查。
ORF1ab(-)且N基因(+)	
ORF1ab(-)且E基因(+)	
ORF1ab、N、E基因均(-)	2019-nCoV 阴性。

【检验方法的局限性】

- 1.本产品的检测结果为阳性, 可提示所检样本中存在2019-nCoV, 对患者的临床诊治应结合其他症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 2.样本检测结果与样本采集、转运、储存及处理过程有关, 其中任何失误都可能会导致结果不准确。如果样本处理时没有适当控制交叉污染, 可能出现假阳性结果。
- 3.该检测仅限于规定的提取试剂、样本类型及适用仪器, 其他未经验证的情况使用前需实验室自行验证。
- 4.本产品在设计时选择了病原体核酸相对保守的片段进行扩增及检测, 但病原体基因都存在变异的可能。
- 5.尽管选择扩增检测的保守区发生变异的几率非常小, 但理论上无法完全避免这种可能性。
- 6.本产品不能进行SARS的鉴别诊断。
- 7.检测结果应按产品说明书【检验结果的解释】进行判读。

【产品性能指标】

- 1.阴性参考品符合率: 检测国家阴性参考品, 结果均为阴性; 或检测企业阴性参考品, 阴性参考品符合率(-/-)为10/10。
 - 2.阳性参考品符合率: 检测国家阳性参考品, 结果符合相关规定; 或检测企业阳性参考品, 阳性参考品符合率(+ /+)为5/5。
 - 3.精密度: 检测国家精密性参考品, Ct值的变异系数(CV, %)不高于5.0%; 或检测企业精密度参考品, 批内精密度符合变异系数(CV, %)≤5.0%。
 - 4.最低检出量: 检测国家灵敏度参考品, S1~S3为阳性; 或检测企业灵敏度参考品, 最低检出量不高于300copies/mL。
 - 5.交叉反应: 检测人类冠状病毒(HKU1, OC43, NL63和229E)、SARS冠状病毒、MERS冠状病毒; H1N1、季节性H1N1、H3N2、H5N1、H7N9, 乙型流感Yamagata、Victoria, 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, 人间质肺病毒(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、铜绿假单胞菌的阳性样本及人基因组DNA未见交叉反应。
 - 6.抗干扰能力: 0.9g/mL氯化钠(含1%PC-300)、100 μg/mL苯福林、100 μg/mL羟甲唑啉、100 μg/mL倍氯米松、100 μg/mL氟尼松、100 μg/mL曲安奈德、200 μg/mL布地奈德、100 μg/mL莫米松、200 μg/mL氟替卡松、200 μg/mL盐酸组胺、10mg/mL利巴韦林、400U/μL α-干扰素、0.1mg/mL地塞米松、0.568 μg/mL扎那米韦、100 μg/mL奥司他韦、100 μg/mL帕拉米韦、100 μg/mL洛匹那韦、100 μg/mL利托那韦、100 μg/mL阿比多尔、100 μg/mL左氧氟沙星、200 μg/mL阿奇霉素、100 μg/mL头孢曲松、100 μg/mL美罗培南、100 μg/mL妥布霉素、0.25g/L黏蛋白、5%(V/V)全血对试剂盒的检测结果显示无明显干扰。
 - 7.临床研究: 临床评价以《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》、《新型冠状病毒肺炎防控方案》和《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》推荐方法得到的确诊/排除结果为对比, 在4家临床试验机构完成临床试验以及在4家临床机构收集临床实际使用数据, 经综合评价, 确认产品临床性能满足要求。临床评价的样本类型涵盖了咽拭子。
- ### 【注意事项】
- 1.使用前请仔细阅读本说明书。
 - 2.实验前请先熟悉和掌握需要使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。
 - 3.实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》等有

关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 所用消耗品应灭菌后一次性使用, 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不能交叉使用。

4.所有检测样本应视为具有传染性物质, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常更换手套以避免样本间的交叉污染; 用户在使用本产品过程中所产生的废弃物应集中收集处理后交给当地环保部门确认的废弃物处理机构进行最终处理。

5.所有试剂在使用前, 均需在室温下充分融化、混匀。建议对试剂的冻融不超过6次。酶混合液易粘着于管壁, 使用前请瞬时离心数秒。

6.本产品仅供体外诊断使用。

7.试剂保存运输及使用过程中多种因素可能导致性能变化, 如保存运输不当、样本采集、样本处理及检测过程操作不规范等, 请严格按照说明书操作。因拭子等样本采集过程及病毒感染过程本身的特点, 可能存在采集到的样本量不足等原因带来的假阴性结果, 应结合临床其他诊疗信息综合判断, 必要时复测。

【标识的解释】

符号或图形	释义
	避光保存
	储存温度
	体外诊断医疗器械
	向上
	废弃后请扔垃圾桶
	可回收材料
	查阅使用说明
	批号
	货号
	失效日期
	生产日期
	生产企业
	测试规格
	医疗器械唯一标识

【参考文献】

- 1.李金明, 实时荧光PCR技术, 2007, 人民军医出版社。
- 2.新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南, 国家卫健委疾病预防控制局。
- 3.新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识, 重庆医学, 中华医学杂志, 2020,100(00)。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 迈克生物股份有限公司

住所: 成都市高新区百川路16号

联系方式: +86 28 8782 6777

售后服务单位名称: 迈克生物股份有限公司

联系方式: 400 6028 007

生产地址: 成都市高新区百川路16号

生产许可证编号: 川食药监械生产许20150064号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20203400184

【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2021年2月10日

修改日期: 2023年7月18日