

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】50 人份/盒；96 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测新型冠状病毒肺炎疑似病例、聚集性病例、其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者的鼻咽拭子、口咽拭子、痰液样本中，新型冠状病毒（2019-nCoV）ORF1ab 和 N 基因。

有关“疑似病例”、“聚集性病例”等人群的定义参照《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》、《新型冠状病毒肺炎防控方案》等文件执行。

在使用上应当遵守《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》、《新型冠状病毒肺炎防控方案》等文件的相关要求。

开展新型冠状病毒核酸检测，应符合《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》等的要求，做好生物安全工作。

本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。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以新型冠状病毒 2019-nCoV 的 ORF1ab 和 N 基因设计特异性引物和 TaqMan 探针，通过荧光定量 PCR 仪进行扩增，从而实现对新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸的检测。临床样本核酸提取后，进行一步法 RT-PCR 扩增，并检测荧光信号，仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线。本试剂盒设置了内源性核糖核酸酶 P（RNase P）作为内参对照，用于对样本采集、保存和运输以及核酸提取过程进行监控，避免假阴性结果的误判。

【主要组成成分】

组分名称	规格及数量		主要成分
	50 人份/盒	96 人份/盒	
核酸扩增反应液	600μL×1 管	1152μL×1 管	镁离子、核苷酸混合液等
酶混合液	200μL×1 管	384μL×1 管	DNA 聚合酶、逆转录酶、UNG 酶
ORF1ab/N 反应液	200μL×1 管	384μL×1 管	2019-nCoV（ORF1ab/N 基因）和 RNase P 内参的引物、探针
阳性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	含有 2019-nCoV（ORF1ab/N 基因）和 RNase P 特异性片段的病毒样颗粒
阴性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	生理盐水

说明：

①不同批号的组分不可以互换使用。

②自备试剂：核酸提取试剂盒，采用上海伯杰医疗科技股份有限公司生产的核酸提取及纯化试剂（沪季械备 20180202 号）。

【储存条件及有效期】

- 避光-20±5℃储存，有效期 12 个月。
避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测效果。
- 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪、上海宏石 SLAN-96S、安普 AGS8830-16。

【样本要求】

- 样本类型：人口咽拭子、鼻咽拭子和痰液。
- 样本采集参考《新型冠状病毒肺炎防控方案》：
 - 口咽拭子：用拭子（推荐聚丙烯纤维拭子或尼龙植绒拭子）同时擦拭双侧咽扁桃体和咽后壁，将拭子头浸入含 3mL 采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。
 - 鼻咽拭子：用拭子（推荐聚丙烯纤维拭子或尼龙植绒拭子）轻轻插入鼻腔内鼻深处，停留片刻后缓慢转动退出，将拭子头浸

入含 3mL 采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。

- 痰液：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于含 3mL 采样液的 50mL 螺口塑料管中。如果痰液未收集于采样液中，可在检测前，加入 3mL 采样液。

3. 采样液：

经验证，推荐使用生理盐水、Hank's 液、磷酸盐缓冲液、上海申启 VTM 运送培养基（沪普械备 20190053 号）、北京友康恒业病毒采样试剂盒（京械注准 20182400236）进行样本采集；经验证可用 2-4M 异硫氰酸胍溶液进行保存，灭活病毒后运输，提高生物样品运输检测安全性。

4. 标本保存：

用于病毒分离和核酸检测的标本应尽快进行检测，能在 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℃冰箱暂存）。标本应避免反复冻融（反复冻融不超过 6 次）。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸扩增反应液、酶混合液、ORF1ab/N 反应液，室温融化，充分振荡混匀后瞬间离心。

计算试剂使用份数 N（N=样本数+1<阳性对照>+1<阴性对照>），根据下表配置反应体系，加入一适当体积分离管中，充分振荡混匀后瞬间离心，按 20μL 分装至 PCR 反应管中，并转移至样本处理区。

组分名称	加入体积（μL）/人份
核酸扩增反应液	12
酶混合液	4
ORF1ab/N 反应液	4
总体积	20

2. 样本处理（样本处理区）

- 核酸提取：取 300μL 待测样本、200μL 阳性对照及 200μL 阴性对照，按照核酸提取试剂盒说明书进行核酸提取。提取的核酸-20±5℃保存不超过 3 天，反复冻融不超过 3 次。

- 加样：在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入待测样本核酸、阳性对照和阴性对照各 20μL，终体积为 40μL/管，盖紧管盖，振荡混匀，瞬时离心。

3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

- 将 PCR 反应管置荧光定量 PCR 仪扩增检测。

② 循环参数设定

3.1 ABI7500 荧光定量 PCR 仪程序设置：

步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录	50 ℃	10 min	1 cycle
2	预变性	97 ℃	1 min	1 cycle
3	变性	97 ℃	5 s	45 cycles
	退火/延伸/检测荧光	58 ℃	30 s	

3.2 上海宏石 SLAN-96S 和安普 AGS8830-16 程序设置：

步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录	50℃	3 min	1 cycle
2	预变性	97℃	30 s	1 cycle
3	变性	97℃	3 s	42 cycles
	退火/延伸/检测荧光	60℃	15 s	

说明：

➢ 步骤 3 中退火/延伸步骤设置荧光检测，荧光通道设置如下：

检测靶标	Reporter	Quencher*
ORF1ab	FAM	None
N	VIC/HEX	None
RNase P	ROX	None

➢ ABI 7500 荧光定量 PCR 仪参比荧光（Reference Dye）选择 None。

➢ Quencher* 仅 ABI7500 荧光定量 PCR 仪需设置，其余机型无需设置。

4. 结果分析参数设定

根据分析后扩增曲线图调节起止值，（建议起始设在 3~15、终止设在 5~20，同时调整阳性对照的扩增曲线平直或低于

阈值线)，点击分析，在报告界面查看结果。

【阳性判断值】

根据临床样本检测结果，利用 ROC 曲线法确定 ORF1ab、N 参考值均为 Ct 值等于 40。

根据临床样本检测结果，采用百分位法确定内源性 RNase P 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪的 Ct 值等于 45；在上海宏石 SLAN-96S 和安普 AGS8830-16 的 Ct 值等于 42。

【检验结果的解释】

1. 质控标准

同一实验中阴/阳性对照需同时满足以下要求，否则本次实验无效。

通道	检测靶标	阴性对照	阳性对照
FAM 通道	ORF1ab	无 Ct 值	Ct≤30
HEX/VIC 通道	N	无 Ct 值	Ct≤30
ROX 通道	RNase P		Ct≤30

2. 结果判读（在符合质控标准下进行以下判读）

① ORF1ab 基因和 N 基因判定标准

检测通道		结果判读
FAM通道	HEX/VIC通道	
Ct值≤40	Ct值≤40	2019-nCoV核酸检测 阳性
无Ct值或Ct值>40	无Ct值或Ct值>40	2019-nCoV核酸检测 阴性
无Ct值或Ct值>40	Ct值≤40	需复测，如复测双靶Ct值≤40或单靶标Ct值≤40，判定2019-nCoV核酸检测阳性；如果双靶标均Ct值>40，判定2019-nCoV核酸检测阴性。
Ct值≤40	无Ct值或Ct值>40	

② 内源性 RNase P 判定标准

人源样本的 RNase P 检测的 Ct 值在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪应<45，在上海宏石 SLAN-96S 和安普 AGS8830-16 应<42；在 2019-nCoV 高浓度样本中 ORF1ab 和 N 基因同时为强阳性时，由于体系的竞争抑制，RNase P 内标拷贝数过低可能无 Ct 值；人源样本的 ORF1ab 和 N 基因同时为阴性，且 RNase P 内标无 Ct 值时，建议重新检测或重新采集样本后检测。

【检验方法的局限性】

1. 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。

2. 有关假阴性结果的分析：

- ① 不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。
- ② 待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。
- ③ 对于突发的新型冠状病毒 2019-nCoV，其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间可能尚未确认，因此，在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。

【产品性能指标】

1. 最低检测限：150 copies/mL。
2. 精密性：检测企业精密性参考品，CV 均不大于 5.0%。
3. 企业内部阳性/阴性参考品符合率：5 份阳性参考品符合率为 100%；12 份阴性参考品符合率为 100%。
4. 交叉反应：针对可能与 2019 新型冠状病毒（2019-nCoV）样本产生交叉的其他病原体（地方性人冠状病毒（HKU1，OC43，NL63 和 229E）、SARS 冠状病毒、MERS 冠状病毒；H1N1（新型甲型 H1N1 流感病毒（2009）、季节性 H1N1 流感病毒）、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、新生隐球菌等）均无交叉反应；人类基因组 DNA 无交叉反应。

5. 干扰物质：针对内源性干扰物质血液、粘蛋白和外源性干扰物质苯福林、羟甲唑啉、氯化钠（含防腐剂）、倍氯美松、地塞米松、氟尼缩松、曲安奈德、布地奈德、莫米松、氟替卡松、盐酸组胺、α-干扰素、扎那米韦、利巴韦林、奥司他韦、帕拉米韦、洛匹那韦、利托那韦、阿比多尔、左氧氟沙星、阿奇霉素、头孢曲松、美罗培南、妥布霉素等进行验证，对试剂盒的检测结果均无明显干扰。

6. 临床评价：在 4 家临床单位完成 747 例样本的临床试验，与已经批准上市的同类型试剂相比：阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.23%，总符合率为 99.60%。

【注意事项】

1. 检测前必须仔细阅读本说明书，并严格按照要求进行操作。
2. 本试剂盒为体外诊断试剂，操作要求一定的专业性，操作人员应当经过专业培训。
3. 本试剂盒检测的病原体核酸为 RNA，操作过程中使用的所有耗材应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
4. 实验室操作按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行。实验操作必须严格分区，各区域使用的仪器、设备、耗材和工作服必须专用，不得交叉使用，避免污染。
5. 试剂盒不同批号的组分不可以互换使用，各组分使用前应室温融化，充分振荡混匀，瞬间离心后使用。
6. 反应液分装时应避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧。
7. 实验结束后，应及时清理台面，并用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯等措施进行消毒。
8. 试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性，实验室所有操作应符合《病原微生物实验室生物安全通用准则》；医疗废弃物处理应按照《医疗废弃物管理条例》进行管理。
9. 咽拭子检测结果为阴性并不能作为排除依据，建议依据临床症状采集病毒载量较高的下呼吸道样本如痰液进行复测。
10. 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。

【参考文献】

- [1] Shalhoub S, Farahat F, Al-Jiffri A, et al. IFN-alpha2a or IFN-beta1a in combination with ribavirin to treat Middle East respiratory syndrome coronavirus pneumonia: a retrospective study. J Antimicrob Chemother 2015;70:2129-32.
- [2] 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发[2010]194 号）。
- [3] 《病原微生物实验室生物安全通用准则》（WS233-2017）。
- [4] 《临床微生物学检验标本的采集和转运》（WS/T640-2018）。

【基本信息】

1. 注册人/生产企业名称：上海伯杰医疗科技股份有限公司
住所：上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 1302、1303、1304、1305、1306、1307、1309 室
电话：4008603688 021-61984777
网址：http://www.bio-germ.com
2. 售后服务单位名称：上海伯杰医疗科技股份有限公司
电话：4008603688 021-61984777
网址：http://www.bio-germ.com
3. 生产地址：上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 502 室、1003 室、1302 室
生产许可证编号：沪药监械生产许 20202563 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20203400065

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2021 年 1 月 11 日

修改日期：2022 年 7 月 6 日