

【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】

大包装，24 人份/盒；大包装，48 人份/盒；大包装，96 人份/盒；大包装，480 人份/盒；大包装，960 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咽拭子、痰液和鼻咽拭子样本中，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】

本试剂盒基于一步法 RT-PCR 技术，选取 2019 新型冠状病毒（2019-nCoV）ORF1ab 和 N 基因作为扩增靶区域，设计特异性引物及荧光探针用于标本中 2019 新型冠状病毒 RNA 的检测；本试剂盒同时包括内源性内标检测系统，用于对标本采集、核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装，24 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	450μl/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	100μl/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
PCR 检测试剂 (大包装，48 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	900μl/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	200μl/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
PCR 检测试剂 (大包装，96 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	900μl/管	2	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	200μl/管	2	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
PCR 检测试剂 (大包装，480 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	4500μl/管	2	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	1000μl/管	2	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
PCR 检测试剂 (大包装，960 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	4500μl/管	4	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	1000μl/管	4	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶
质控品 (大包装，24 人份/盒；大包装，48 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) 阴性质控品	400μl/管	1	含内标片段的假病毒
	NC (ORF1ab/N) 阳性质控品	400μl/管	1	含目的片段的假病毒、含内标片段的假病毒
质控品 (大包装，96 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) 阴性质控品	1000μl/管	1	含内标片段的假病毒
	NC (ORF1ab/N) 阳性质控品	1000μl/管	1	含目的片段的假病毒、含内标片段的假病毒
质控品 (大包装，480 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) 阴性质控品	1000μl/管	1	含内标片段的假病毒
	NC (ORF1ab/N) 阳性质控品	1000μl/管	1	含目的片段的假病毒、含内标片段的假病毒
质控品 (大包装，960 人份/盒)	NC (ORF1ab/N) 阴性质控品	1000μl/管	2	含内标片段的假病毒
	NC (ORF1ab/N) 阳性质控品	1000μl/管	2	含目的片段的假病毒、含内标片段的假病毒

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂，建议推荐使用本公司生产的粤穗械备 20170583 号、粤穗械备 20150302 号、粤穗械备 20170667 号、粤穗械备 20201539 号和粤穗械备 20220094。

本试剂盒不包含但检测必需的配套采样液：

咽拭子及鼻咽拭子样本：1）广州达安基因股份有限公司的样本保存液（粤穗械备 20200802 号）；2）广州达安基因股份有限公司的样本保存液（粤穗械备 20201254 号）；3）广州达安基因股份有限公司的一次性使用采样器（粤穗械备 20201915 号）；4）广州邦德盛生物科技有限公司的一次性使用采样器（粤穗械备 20200106 号）；5）生理盐水，即 0.9%的氯化钠水溶液；

痰液样本：1）广州达安基因股份有限公司的样本保存液（粤穗械备 20201254 号）；2）生理盐水，即 0.9%的氯化钠水溶液；

阴阳性质控品说明：阳性质控品为含目的片段的假病毒和含内标片段的假病毒，阴性质控品为含内标片段的假病毒，使用时需要参与提取，且应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

【储存条件及有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 12 个月。

试剂在 4℃可保存 3 天；试剂盒在 37℃可保存 3 天；避免反复冻融，反复冻融次数不超过 7 次；试剂开瓶次数不超过 7 次。

试剂盒生产日期和有效期至见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500、LightCycler480、AGS4800、QuantStudio™ 5、SLAN-96P。

【样本要求】

1. 适用样品类型：咽拭子、痰液、鼻咽拭子。

2. 样品采集（注意无菌操作）

咽拭子：用 2 根拭子同时擦拭扁桃体及咽喉壁，将拭子头浸入含采样液管中；

痰液：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于含采样液的螺口管中；

鼻咽拭子：将 1 根拭子轻轻插入鼻道内鼻腔处，停留片刻后缓慢转动退出。取另一根拭子以同样的方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入同一含 3ml 采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。

3. 样品保存和运送

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 4℃ 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）。标本运送期间应避免反复冻融。标本采集后应尽快送往实验室，如果需要长途运输标本，建议采用干冰等制冷方式进行保藏。

【检验方法】

1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

建议取 200μl 液态样本进行核酸提取。可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂盒（磁珠法）粤穗械备 20170583 号、粤穗械备 20150302 号、粤穗械备 20170667 号、粤穗械备 20201539 号和粤穗械备 20220094；具体操作步骤请按照试剂盒说明书指引进行。

本试剂盒中的阴性质控品和阳性质控品均参与提取。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A、NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+NC (ORF1ab/N) 阴性质控品+NC (ORF1ab/N) 阳性质控品）PCR 反应管

NC 单人份扩增体系配制如下表：

NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 A	NC (ORF1ab/N) PCR 反应液 B	扩增体系
17 μl	3 μl	20 μl

将各组充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20 μl 扩增体系分装到 PCR 管中。

3. 加样（样本制备区）

于上述 PCR 反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测标本核酸、阳性质控品各 20μl，盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4. PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 ABI Prism 7500 仪器设置

4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控品（NTC）、阳性质控品以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter1: FAM, Quencher 1: NONE; Reporter 2: VIC, Quencher 2: NONE; Reporter3: Cy5, Quencher3: NONE; Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

Stage	Reps	Target (°C)	Running Time	Data Collection
1	1	50	00: 15: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	45	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√

设置完成后，保存文件，运行程序。

4.3 LightCycler480 仪器设置

4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM、VIC、Cy5。

4.3.2 设置循环条件：

Program name	Cycles	Target (°C)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 15: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.4 AGS4800 仪器设置

4.4.1 先开电脑，再开定量PCR 仪主机电源，最后启动AGS4800软件，选择对应的层（上、中、下）。

4.4.2 点击新建，在试验名称中编辑实验名、文件路径，保存后点击确定打开一个空白文件。

4.4.3 程序参数：在程序参数页面。扩增参数如下：

程序段	循环数	目标温度 (°C)	恒温时间	读取荧光
1	1	50	00: 15: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	45	94	00: 00: 15	

		55	00: 00: 45	√
--	--	----	------------	---

- 4.4.4 样本参数：点击样本参数页面，在上面菜单快捷键中选择当前程序染料设置（通道1 FAM，通道2 VIC，通道5 CY5），下面48 孔表中选定样品孔，右边染料类型勾选上FAM、VIC和CY5，并在下面按钮中选择对应的样本类型：阴性质控品、未知样品等。
- 4.4.5 启动扩增：确认48孔板在主机内放置妥当后，点击开始按钮开始PCR循环。
- 4.4.6 监控进程：切换程序运行页面，可以实时显示PCR曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选FAM、VIC或CY5，只显示对应探针的变化情况。
- 4.4.7 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

4.5 QuantStudio TM5 仪器设置

- 4.5.1 打开软件后，点击 files，选择 New Experiment 下的 Experiment Setup，Run mode 选择为 Standard，

4.5.2 在 Method 窗口下设置循环条件：

	循环数	温度（℃）	时间	读取荧光
Hold Stage	1	50	00: 15: 00	
	1	95	00: 15: 00	
PCR Stage	45	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√

- 4.5.3 在 Plate 窗口下，Quick Stup 中 Sample 一栏中设置样本名称，Passive Reference: NONE；Advanced Setup 中探针检测模式设置为 Reporter1: FAM，Quencher 1: NONE；Reporter 2: VIC，Quencher 2: NONE； Reporter3: Cy5，Quencher3: NONE，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.6 SLAN-96P 仪器设置

- 4.6.1 打开软件后，点击项目，在基本信息页面设置项目名称，项目类型为定性/绝对定量，反应体系 40 μ l，荧光通道选择为通道 1 FAM，通道 2 VIC，通道 3 CY5
- 4.6.2 在实验程序窗口下设置循环条件：

程序段	循环数	目标温度（℃）	恒温时间	读取荧光
1	1	50	00: 15: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	45	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√

设置好模板后，关闭软件

- 4.6.3 重新打开软件，在孔板编辑页面选择反应孔，在选择项目设置好的项目名称，设置完成后点击实验运行页面，点击运行。

5. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 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，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品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”窗口读取检测结果。

6. 质量控制

- NC (ORF1ab/N) 阴性质控品：FAM 和 VIC 检测通道无明显扩增曲线，Cy5 通道有明显扩增曲线；
- NC (ORF1ab/N) 阳性质控品：FAM 和 VIC 检测通道有明显扩增曲线，Ct 值≤32，Cy5 通道有或无扩增曲线；
- 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。
- “N 基因为 FAM 检测通道，ORF1ab 基因为 VIC 检测通道，内标基因为 CY5 检测通道”

7. 结果判读

- 7.1 如果检测样品在 FAM 和 VIC 通道无扩增曲线或 Ct 值>40，且 Cy5 通道有扩增曲线，可判样品未检测到 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) RNA；
- 7.2 如果检测样品在 FAM 和 VIC 通道 Ct 值≤40，且有明显的扩增曲线，可判样品为 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 阳性；
- 7.3 如果检测样品仅在 FAM 或 VIC 单一通道 Ct 值≤40，另一通道无扩增曲线，结果需复检，复检结果一致可判样品为 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 阳性；复检均为阴性可判断为未检测到 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) RNA。

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的参考值 CT 值为 40，内标参考值 CT 值为 40。

【检验结果的解释】

- 每次实验均需检测阴性质控品，阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定；
- FAM 和 VIC 检测通道为阳性时，由于体系的竞争关系，Cy5 通道（内标通道）结果可能为阴性；
- 内标结果为阴性时，若该检测管的 FAM 和 VIC 检测通道也为阴性，说明体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检；
- 报告建议采用以下格式：
 阴性结果报告格式为：样本未检测到 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) RNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
 阳性结果报告格式为：样本检测到 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) RNA。

【检测方法的局限性】

- 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果；
- 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 新型冠状病毒在流行过程中存在变异，不排除可能会出现导致单基因阴性或假阴性结果的新变异株，待测样本的结果判读需同时结合 N 基因和 ORF1ab 基因的检测结果进行分析；
- 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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

【产品性能指标】

产品分析性能评估结果:

1. 本试剂盒的分析灵敏度为 100copies/ml。
2. 交叉反应: 与 2019 新型冠状病毒种属相近或引起症状相似的其他病原体 (如季节性甲型 H1N1 流感病毒, 新型甲型 H1N1 (2009) 流感病毒, 甲型流感 H3N2, H5N1, H7N9, 乙型流感 Yamagata, 乙型流感 Victoria, 呼吸道合胞病毒 A 型, 呼吸道合胞病毒 B 型, 鼻病毒 A, 鼻病毒 B, 鼻病毒 C, 副流感 I 型, 副流感 II 型, 副流感 III 型, 腺病毒 1、2、3、4、5、7、55 型, 肠道病毒 A、B、C、D 型, 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, 水痘一带状疱疹病毒, 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, 肺炎克雷伯杆菌, 结核分枝杆菌, 烟曲霉, 白色念珠菌, 光滑念珠菌, 新生隐球菌, 冠状病毒 (HKU1, OC43, NL63, 229E), SARS 冠状病毒, MERS 冠状病毒) 以及人基因组 DNA 无交叉反应。
3. 外源性干扰物质: 样本中存在 2019 新型冠状病毒的治疗药物, 如苯福林、羟甲唑啉、氯化钠、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、干扰素、扎那米韦、利巴韦林、奥司他韦、帕拉米韦、洛匹那韦、莫匹罗星、左氟沙星、阿奇霉素、妥布霉素、利托那韦、美罗培南、阿比多尔、头孢曲松对试剂盒的检测结果无干扰。
4. 痰液、咽拭子样本中可能存在的内源性物质如全血和粘液对试剂盒的检测结果无干扰。
5. 精密度: 批内/批间精密度, 日内/日间精密度, 不同操作者之间的精密度变异系数均不大于 5%。
6. 阴阳性参考品符合率: 5 份企业阳性参考品和 10 份企业阴性参考品的符合率均为 100%。
7. 临床评价在 3 家临床机构完成 625 例样本检测, 与已上市同类产品对比, 本试剂的阳性符合率 100% (95%CI 98.62%~100.00%), 阴性符合率 99.14% (95%CI 97.51%~99.71%), 总符合率 99.52% (95%CI 98.60%~99.84%), 样本类型涵盖鼻咽拭子、痰液、咽拭子。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外检测, 实验前请仔细阅读本说明书;
2. 为了避免样本中任何潜在的生物危险, 检测样本应视为具有传染性物质, 避免接触到皮肤和粘膜; 样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作, 样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器, 并与废弃物一起灭菌后方可丢弃; 样本操作和处理均需符合相关法规要求: 包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》;
3. 产物处理: PCR 结束之后, 产物容易引起污染, 应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃;
4. 全程应避免 RNA 酶污染, 实验过程中穿工作服, 佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作, 避免有害物质进入呼吸道;
5. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头;
6. PCR 检测试剂使用前要完全解冻, 8,000rpm 离心数秒后使用, 但应避免反复冻融;
7. 如果在样本处理中没有控制好交叉污染, 可能出现假阳性;
8. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行 (试剂准备区、样本制备区、扩增检测区), 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;
9. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器, 然后用紫外线灯照射 20-30 分钟;
10. 完成样本核酸提取后, 建议马上进行下一步实验, 否则请保存于-20℃待用 (24h 内);
11. 须对每次实验进行质量控制。
12. 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. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected—Interim guidance. 2020.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 广州达安基因股份有限公司

住所: 广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式:

传真: 020-32068820 电话: 400 000 0340 020-32290789

邮政编码: 510665 网址: <http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称: 广州达安基因股份有限公司

联系方式:

传真: 020-32068820 电话: 400 000 0340 020-32290789

邮政编码: 510665 网址: <http://www.daangene.com>

生产地址: 广州市高新技术产业开发区香山路 19 号;

广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号;

广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号: 粤食药监械生产许 20040999 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】