

【产品名称】新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】25 测试/盒、50 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肺炎疑似病例、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、痰液样本中，新型冠状病毒(2019-nCoV) ORF1ab 和 N 基因。

有关“疑似病例”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。

该产品在使用上应当遵守《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《新冠病毒样本采集和检测技术指南》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】

本试剂盒在新型冠状病毒(2019-nCoV)ORF1ab 基因和 N 蛋白基因片段上分别设计特异性引物及特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段核酸模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受特定波长光激发而发射可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸的自动化检测。

试剂盒中的内标选用一对管家基因(GAPDH)特异性引物，结合特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段核酸模板发生特异性结合，内标选用 ROX 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组成	主要成分	规格	
		25 测试/盒	50 测试/盒
主反应液	Tris-HCl、MgCl ₂ 、dATP、dCTP、dUTP、dTTP、dGTP	425 μL×1	850 μL×1
酶混合液	DNA 聚合酶、UNG 酶、逆转录酶	37.5 μL×1	75 μL×1
荧光探针	引物、荧光探针	37.5 μL×1	75 μL×1
阳性对照	含 ORF1ab/N 基因片段假病毒	200 μL×1	200 μL×1
阴性对照	生理盐水	200 μL×1	200 μL×1

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

核酸提取试剂、仪器：西安天隆科技有限公司的核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号)，西安天隆科技有限公司的全自动核酸提取仪(陕西械备 20150054 号)。

样本保存液、采样管：可使用西安天隆科技有限公司一次性使用病毒采样管(陕西械备 20200069 号)、深圳逗点生物技术有限公司一次性使用病毒采样管(粤深械备 20200077 号)、友康恒业生物科技(北京)有限公司一次性使用病毒采样管(京海械备 20200033 号)、江苏康健医疗用品有限公司一次性使用病毒采样管(苏泰械备 20180169 号)、宁波海乐基因科技股份有限公司样本保存液(浙甬械备 20200010 号)、深圳市祥健生物科技有限公司一次性使用病毒采样管(粤深械备 20190041 号)。

【储存条件及使用期限】

-20℃±5℃保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复冻融不得超过 7 次；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间累计不超过 8 小时。

试剂盒生产日期及有效期见包装标签。

【适用仪器】ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、全自动医用 PCR 分析系统(型号规格:Gentier96E、Gentier96R)。

【样本要求】

1. 适用样本类型：咽拭子、痰液。

2. 样本采集：

咽拭子：用 2 根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子同时擦拭双侧咽扁桃体及咽喉壁，将拭子头浸入含 3 mL 采样液的管中，弃去尾部，旋紧管盖。

痰液：将咳出的痰液收集于含 3 mL 采样液的管中。

3. 保存：2-8℃保存，不超过 24 小时；-20℃±5℃保存，不超过 3 个月；-70℃以下保存 12 个月，且应避免反复冻融不超过 6 次。

4. 运输：样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰袋密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

使用西安天隆科技有限公司的全自动核酸提取仪(陕西械备 20150054 号)及其配套试剂盒核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号)进行提取(提取试剂洗脱体积 80 μL)，每份样本提取裂解孔中加入 200 μL 样本进行提取。本试剂盒中的阳性对照和阴性对照按照样本处理，提取过程请严格按照其说明书进行。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出主反应液、酶混合液和荧光探针，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算需准备反应试剂测试数[n=样本数+2(对照品数)]。

试剂	主反应液	酶混合液	荧光探针
用量(μL)	17 μL	1.5 μL	1.5 μL

按 n 测试计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中混匀。按 20 μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

分别加入 5 μL 的阴性对照、阳性对照、样本核酸提取液，终体积为 25 μL/管，盖紧反应管，瞬时低速离心，转移至检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	50	10:00
2	1	95	1:00
		95	00:03
3	5	50	00:10
		72	00:10
		95	00:03
4	35	58	00:30(收集荧光)

检测荧光选择：ORF1ab(FAM)，N 基因(VIC/HEX)，内标(ROX/TEXAS RED)。

【阳性判断值】

根据临床样本研究结果，目标基因 ORF1ab(FAM)和 N 基因(VIC/HEX) 通道阳性 Ct 值≤34.5，内标(ROX/TEXAS RED)通道的阳性 Ct 值 < 35。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品检测荧光曲线的最高点或由仪器自动设定阈值。

阳性对照：FAM、HEX/VIC 通道 Ct 值<30 且有典型的 S 型扩增曲线

阴性对照：FAM、HEX/VIC 通道 Ct 无数值或=35

以上需求需在同一实验中同时满足，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差，重新进行。

在满足以上质量控制条件，进行如下分析(FAM 通道为 2019-nCoV 病毒 ORF1ab 基因区，HEX/VIC 通道为 2019-nCoV 病毒 N 蛋白区)：

- 如果 FAM 和 HEX/VIC 通道 Ct 值均≤34.5，且有典型的扩增曲线，则可判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性。
- 如果 FAM 和 HEX/VIC 通道 Ct 值均>34.5 或无 Ct 值，ROX/TEXAS RED 通道 Ct 值<35 且有典型的扩增曲线，则可判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阴性。
- 如果 FAM 和 HEX/VIC 通道中只有一个通道 Ct 值≤34.5，ROX/TEXAS RED 通道 Ct 值<35 且有典型的扩增曲线，则需要对样本进行复检。

- 若复检结果中 FAM 或 HEX/VIC 通道中任一通道 Ct≤34.5，则可判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性。
- 若复检结果中 FAM 和 HEX/VIC 通道 Ct 值>34.5，或无 Ct 值，则可判断为新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阴性。
4. 如果 FAM 通道、HEX/VIC 通道均无 Ct 值或 Ct>34.5 且 ROX/TEXAS RED 通道无 Ct 值或 Ct=35，需重新取样进行检测。

【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. 有关假阳性结果的可能性分析
 - 2.1 如果样本在运输、处理过程中发生交叉污染，则可能导致假阳性结果；
 - 2.2 实验环境有 PCR 产物等气溶胶污染，则可能导致假阳性结果；
 - 2.3 实验过程中使用的耗材、设备等受污染，则可能导致假阳性结果。
3. 有关假阴性结果的可能性分析
 - 3.1 不合理的样本采集、转运、储存及处理、样本中病原体含量过低均有可能导致假阴性结果；
 - 3.2 该病原体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；
 - 3.3 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管无破损，标签完好。
2. 阴性参考品符合率：检测 11 份企业阴性参考品 N1~N11，或检测国家阴性参考品，检测结果均为阴性。
3. 阳性参考品符合率：检测 8 份企业阳性参考品 P1~P8，检验结果均应为阳性；或检验国家阳性参考品，检测结果应符合相应规定。
4. 最低检出限：本试剂盒的最低检测限为 200 copies/mL。浓度为 200 copies/mL 的检测限参考品 L，重复检测 20 次，至少 19 次检测结果为阳性，检测结果符合率应≥19/20；或检测国家灵敏度参考品，S1~S5 应为阳性。
5. 精密性：检测 2 份企业精密度参考品，或检测国家精密性参考品，Ct 值变异系数(CV%)应不高于 5.0%。
6. 包容性：对具有时间和区域特征性的 20 个不同来源的阳性样本，进行检出限、重复性的性能验证，验证结果符合要求；按变异株验证要求标准，对当前已流行的新冠变异株进行验证，验证结果显示对试剂盒检测性能无影响。
7. 分析特异性：
 - 7.1 交叉反应：与其他相关病原体，包括地方性人类冠状病毒(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，乙型流感病毒 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，高浓度人基因组 DNA 等无交叉反应。
 - 7.2 竞争性干扰：临床上易与新型冠状病毒合并感染的病原体如新型甲型 H1N1 流感病毒（2009）、乙型流感病毒 Yamagata 型、鼻病毒 C 组、肠道病毒 A71、呼吸道合胞病毒 A 型、腺病毒 1 型、副流感病毒 1 型、肺炎支原体、肺炎衣原体、肺炎链球菌、肺炎克雷伯氏菌、流感嗜血杆菌、光滑念珠菌、白色念珠菌、烟曲霉在高浓度情况下，对检出限浓度新型冠状病毒核酸检测无影响。
- 7.3 抗干扰：样本中可能存在的干扰物质：20%血液、20μg/mL 黏蛋白，外源性干扰物 0.3M 氯化钠、100μg/mL 倍氯美松、100μg/mL 地塞米松、20nmol/L 布地奈德、200μg/mL 氟替卡松、0.6mg/mL 盐酸组胺、500U/mLα-干扰素、50μg/mL 扎那米韦、22μg/mL 利巴韦林、4μg/mL 奥司他韦、0.5mg/mL 帕拉米韦、0.18mg/mL 洛匹那韦、0.5mg/mL 利托那韦、100μg/mL 阿比多尔、100mg/mL 左氧氟沙星、0.5mg/mL 头孢曲松、40μg/mL 妥布霉素、1mg/mL 苯福林、2ng/mL 羟甲唑啉、500μg/mL 氟尼缩松、100ng/mL 曲安奈德、100μg/mL 莫米松、100μg/mL 阿奇霉素、1g/mL 美罗培南对试剂盒检测结果无干扰。
8. 临床评价：在四家临床单位一共完成 645 例标本的临床试验，本试剂盒与同类已上市产品对比，阳性符合率为 97.47%，阴性符合率为 97.55%，总符合率为 97.52%。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
4. 实验室严格分区操作：
 - 第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂；
 - 第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理；
 - 第三区：PCR 扩增区-PCR 扩增检测。
5. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
6. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
7. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
8. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
9. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
10. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
11. 工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%乙醇或紫外灯进行消毒。
12. PCR 反应混合液应避免低温保存。
13. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 国家卫生健康委.《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心.《2019 新型冠状病毒核酸检测试剂注册技术审评要点》(2020 年第 4 号).2020.
5. WHO. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(nCoV)infection is suspected. 2020.
6. 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心.《新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂注册审查指导原则》(2022 年第 18 号).2022.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司
住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室
联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
售后服务单位名称：
联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋（NW-07）501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋（NW-06）504 室。
生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20233400091

【说明书核准日期及修改日期】 2023.01.17