

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 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、痰液样本中，新型冠状病毒（2019-nCoV）ORF1ab 和 N 基因。

有关“疑似病例”、“疑似聚集性病例”等人群的定义参考《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》等文件执行。

在使用上应当遵守《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《新型冠状病毒感染的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 Taq 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 ORF1ab 和 N 基因作为扩增靶区域，设计特异性引物和荧光探针，分别用 FAM 和 ROX 标记，检测样本中是否含有新型冠状病毒 RNA；选取非人基因组非试剂盒检测靶标的其他物种序列

设计内标的引物探针，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。

表 1 荧光信号及靶标

荧光信号	靶标
FAM	新型冠状病毒ORF1ab
ROX	新型冠状病毒N基因
VIC	内标

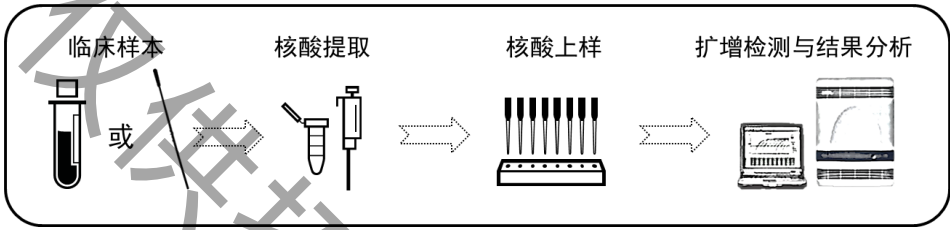


图 1 检测流程

【主要组成成分】

表 2 试剂盒及组成成分

试剂名称	主要组成成分	数量 (50 测试/盒)	数量 (100 测试/盒)
核酸扩增反应液	引物、探针、Tris、镁离子、 dNTPs	550 μ L $\times$ 1 支	1100 μ L $\times$ 1 支
酶混合物	DNA 聚合酶、逆转录酶、 UDG 酶	75 μ L $\times$ 1 支	150 μ L $\times$ 1 支
阴性对照	无核酸酶水	400 μ L $\times$ 1 支	400 μ L $\times$ 1 支
阳性对照	新型冠状病毒假病毒	400 μ L $\times$ 1 支	400 μ L $\times$ 1 支
内标对照	假病毒	500 μ L $\times$ 1 支	1000 μ L $\times$ 1 支

注：不同批号试剂盒中各组分不可互相混用；

需要但未提供：

配套提取试剂/设备：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）、全自动核酸提取仪（上海思路迪生物医学科技有限公司，沪闵械备 20200080 号）。

检测必须的配套病毒保存液：

非灭活型：友康生物科技（北京）股份有限公司病毒采样试剂盒（京械注准20182400236号）、Copan Italia S.p.A运送培养基（国械备20191277号）。

灭活型：江苏康为世纪生物科技股份有限公司一次性使用病毒采样管（苏泰械备20200124号）、山东耀华医疗器械股份有限公司一次性使用病毒采样管（鲁济械备20200047号）。

【储存条件及有效期】

试剂盒于-20±5℃避光保存，有效期12个月；

反复冻融次数建议不超过10次；

开瓶后2-8℃放置3天，不影响检测结果；

开瓶后-20±5℃避光保存至效期，不影响检测结果；

生产日期、有效期至：见产品外包装盒。

【适用仪器】

QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪（Life Technologies Holdings Pte Ltd，国械注进 20183400252 ）。

【样本要求】

1. 样本类型：

咽拭子样本和痰液。

2. 样本采集：

参照《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》文件中实验室技术指南照《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》文件中实验室技术指南“标本采集方法”相关规定执行。

咽拭子：用聚酯拭子头的塑料杆拭子同时擦双侧咽扁桃体及后壁，将头浸入 3mL 样本保存液的管中，折断、尾部弃去，旋紧管盖。

痰液：将咳出的痰液收集于含 3mL 保存液的 50mL 螺口塑料管中。

痰液消化液：可以采用痰液等体积的含 1g/L 蛋白酶 K 的盐缓冲液将痰液化。

经上述保存液收集的样本在 56℃加热 30 分钟进行灭活。

3. 样本保存和运输

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；样本-20±5℃储存建议不超过 7 天；无法检测的标本则应置于-70℃或以下保存。样本冻融不可超过 6 次，否则影响检测结果。

【检验方法】

1 PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸扩增反应液和酶混合物，室温融化后振荡混匀，根据待扩增样本数（含阳性对照和阴性对照）按以下比例分别配制 PCR 反应液，充分混匀后进行短时离心并分装至 PCR 反应管（板）中，分装体积为 12.5μL。

组分名称	体积（μL）
核酸扩增反应液	11
酶混合物	1.5
总体积	12.5

2 样本处理及加样（样本处理区）

2.1 核酸提取：

- 1) 取 200 μL 阳性对照和阴性对照与样本同步进行核酸提取；
- 2) 内标对照按照 10 μL/人份加入样本裂解液，内标加 N+2（N 为样本数；阳性对照和阴性对照），按照推荐核酸提取试剂盒说明书进行操作，洗脱体积为 100 μL。

2.2 加样：

在上述配制好的 PCR 反应管（板）中分别加入处理后的阴性对照、阳性对照以及待测样本核酸各 12.5μL，盖紧管盖（或封膜），短时离心后转移至扩增检测区。

3 PCR 扩增检测（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：

在“Experiment Properties”界面“Run mode”下选择“Fast”模式，扩增程序如下：

步骤	温度	时间	循环数	升降温速率
----	----	----	-----	-------

1	逆转录	50℃	2min	1	3.19℃/s
2	预变性	95℃	2s	1	3.19℃/s
3	变性	95℃	1s	41	3.19℃/s
	退火、延伸及荧光检测	60℃	13s		2.45℃/s

步骤 3 中 60℃时荧光检测，新型冠状病毒 ORF1ab 检测通道为 FAM，新型冠状病毒 N 基因检测通道为 ROX，内标检测通道为 VIC，“Passive Reference”均选择“None”（扩增体积设置为 25 μL）。

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 5~22，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】

利用 ROC 曲线法确定本试剂盒 FAM 通道(ORF1ab)的参考值 Ct 为 39.5，ROX 通道(N 基因)的参考值 Ct 为 39.5。

【检验结果的解释】

1. 质量控制

- 1) 阴性对照（NC）：检测结果应为 FAM（ORF1ab）和 ROX(N) 通道 Ct 值均无数值，VIC（内标）通道 Ct ≤ 38.0；
- 2) 阳性对照（PC）：检测结果应为 FAM（ORF1ab）、ROX(N) 和 VIC（内标）通道均有明显扩增曲线且 Ct ≤ 38.0；
- 3) 以上要求需要在同一次实验中同时满足，否则本次实验结果无效。

2. 结果判断及解释

- 1) 样品在 FAM 和 ROX 通道均检测到明显扩增曲线且 Ct ≤ 39.5，则判定样品为新型冠状病毒 2019-nCoV 阳性；
注：高浓度目的基因扩增可能导致 VIC 通道扩增受抑制为阴性。
- 2) 样品在 FAM 和 ROX 通道均未检测到明显扩增曲线（Ct > 39.5 或无数值），且 VIC 通道 Ct ≤ 38.0，则判定样品为新型冠状病毒 2019-nCoV 阴性；
- 3) 样品在 FAM 或 ROX 单一通道 Ct ≤ 39.5，另一通道 Ct > 39.5 或无数值，且 VIC 通道 Ct ≤ 38.0，结果需复检，可直接检测已提取的核酸，若复检后 FAM 或 ROX 至少有一通道 Ct ≤ 39.5 且 VIC 通道 Ct ≤ 38.0，则判定为新型冠状病毒 2019-nCoV 阳性；若复检后 FAM 和 ROX 通道 Ct 值均

> 39.5或无数值且VIC通道Ct≤38.0，则判定为新型冠状病毒2019-nCoV阴性。

- 4) 样品在FAM或ROX单一通道Ct≤39.5，另一通道Ct>39.5或无数值，且VIC通道Ct>38.0或无数值，重新提取核酸或重新采集样本检测。
- 5) 样品在FAM、ROX均Ct>39.5或无数值且VIC通道Ct>38.0或无数值，表示本次检测结果无效，建议重新提取核酸或重新采集样本检测。

【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. 本试剂盒主要针对咽拭子和痰液样本中的核酸的定性检测，结果不能反应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. 本试剂盒仅限用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。

【产品性能指标】

1. 最低检出限

200copies/mL。

2. 阴性参考品符合率

检测企业阴性参考品N1-N11，结果均为阴性，阴性参考品符合率为100%。

3. 阳性参考品符合率

检测企业阳性参考品P1-P5，结果均为阳性，阳性参考品符合率为100%。

4. 精密性

检测企业精密性参考品R1、R2和R3，重复检测10次，R1、R2结果均为阳性，且Ct值的变异系数（CV）均不大于5.0%，R3结果均为阴性。

5. 分析特异性

1) 干扰物质：正常人新鲜血液、粘蛋白、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、 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、盐酸组胺、左氧氟沙星、阿奇霉素、头孢曲松、美罗培南、妥布霉素对检测结果均无干扰。

2) 交叉反应：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Yamagata、Victoria，呼吸道合胞病毒A型和B型，副流感病毒，鼻病毒，腺病毒，肠道病毒，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、新生隐球菌以及人基因组DNA均无交叉反应。

6. 临床

临床试验：在3家机构开展的临床试验结果显示，与同类产品相比，检测657例2019-nCoV临床样本，阳性符合率99.24%；阴性符合率98.48%，总符合率98.78%；检测656例2019-nCoV临床病例，灵敏度95.68%；特异性100.00%，总符合率98.17%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书，并确定已准备相应试剂及仪器。
2. 本产品仅供专业人员做体外诊断使用。
3. 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到样本DNA提取质量、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。
4. 本试剂盒各组分均经过特别配制，随意替换试剂盒组分可能影响检测结果。不同批号试剂盒各个组分不可相互替换使用。

5. 产品开封后贮存条件不变，避免试剂不必要情况的反复冻融。
6. 所有的试剂都具有潜在的危险性，只有经过培训且具有相应实验室技术的专业人员才能使用本试剂盒。样本操作和处理需符合相应法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。同时严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号或现行有效版本）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。
7. 实验时注意防止外源核酸对试剂的污染，在操作过程中使用单独、专用的移液器和滤芯吸头。
8. 样本的检测结果仅供临床参考，对患者个体化治疗的选择应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
9. 实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
10. 实验完毕后使用10%次氯酸或75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机等仪器表面，然后紫外灯照射25~30分钟。
11. 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。咽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. Algaissi Abdullah, Agrawal Anurodh S, Hashem Anwar M, Tseng Chien-Te K. Quantification of the Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus RNA in Tissues by Quantitative Real-Time RT-PCR.[J]. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2020, 2099.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海思路迪生物医学科技有限公司

住所：上海市闵行区新骏环路 158 号 2 幢 304 室、404 室、402 室、401 室

联系方式：400-021-1661

售后服务单位名称：上海思路迪生物医学科技有限公司

生产地址：上海市闵行区新骏环路 158 号 2 幢 304 室、404 室、402 室

生产许可证编号：沪食药监械生产许 20202457 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20223400364

【说明书核准日期及修改日期】 2022 年 3 月 16 日

仅供招投标使用