

## 新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

### 【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 人份 / 盒、50 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、肺泡灌洗液样本中，新型冠状病毒（2019-nCoV）ORF1ab 和 N 基因、E 基因。有关“疑似病例”、“疑似聚集性病例患者”等人群的定义参照中国 CDC 颁布的《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（现行版本）执行。

该产品仅用于 2019 年 12 月以来，新型冠状病毒（2019-nCoV）感染的肺炎疫情期间，相关病例的辅助诊断和此次疫情的体外诊断应急储备，不能作为常规体外诊断试剂应用于临床。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《中国 CDC 新冠肺炎实验室检测技术指南》等的要求，做好生物安全工作。

### 【检验原理】

本试剂盒采用 RNA 逆转录反应以及聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，根据病毒的核酸序列设计特异性的引物用于扩增对应的核酸片段，同时，高度特异性的 TaqMan 探针可与对应的核酸片段进行结合，并在 Taq 酶外切酶活性作用下发生水解，产生荧光信号，根据荧光信号与扩增循环数之间的关系可得到实时扩增曲线。

本试剂盒中以 2019-nCoV 的 RdRP 基因（位于 ORF1ab 读码框），E 基因和 N 基因为检测对象，从而实现对 2019-nCoV 核酸的检测。

### 【主要组成成分】

序号	组分（见注 1）	包装规格	
		25 人份/盒	50 人份/盒
1	2019 新型冠状病毒核酸荧光 PCR 检测混合液	513μL×1	988μL×1
2	RT-PCR 酶	27μL×1	52μL×1
3	2019 新型冠状病毒内标	30μL×1	60μL×1
4	2019 新型冠状病毒阴性对照品	400μL×1	400μL×1
5	2019 新型冠状病毒阳性对照品	30μL×1	60μL×1

注 1：不同批号的组分不可以互换使用。酶在使用前应低速离心数秒，以收集管壁或管盖残留成分。其它组分使用前应在室温下融解，旋涡震荡数秒，充分混匀，低速离心数秒后使用。

### 【储存条件及有效期】

试剂盒应在-20±5℃避光保存，有效期暂定 6 个月。

生产日期及失效日期见外包装。采用泡沫盒加冰密封进行运输，运输温度控制在-76℃~8℃之间，运输时间不宜超过 4 天；试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，试剂开封后请于 1 个月内使用。

### 【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪，实时荧光定量 PCR 分析仪（MIC POC Dx48）。

### 【样本要求】

#### 1. 样本采集：

（1）**鼻咽拭子**：用无菌拭子拭取鼻腔、咽部分泌物，将其置于无菌试管（含 1mL 灭菌生理盐水），用无菌棉球将试管塞紧后，密闭送检。

（2）**痰液**：留取前清水漱口 3 次，用力咳出呼吸道深部的痰液吐至无菌痰液收集器中。患者痰液较深不易咳出时，可在咳痰前捶背、协助排痰。采集痰量不能少于 1mL。液化方法：痰液样本中加入等体积的乙酰半胱氨酸（10g/L），

室温振荡 30 分钟，待充分液化后才可进行后续核酸提取。

(3) 肺泡灌洗液：收集支气管肺泡灌洗液密闭送检。

2. 样本保存：样本置于 2℃~8℃ 可保存 24 小时，-70℃ 下可长期保存。

3. 样本运输：采用低温运输，样本运输应遵守国家关于第二类病原体的相关生物安全规定。

## 【检验方法】

### 1. PCR 前处理

#### 1.1 样本及阴性对照品处理及提取

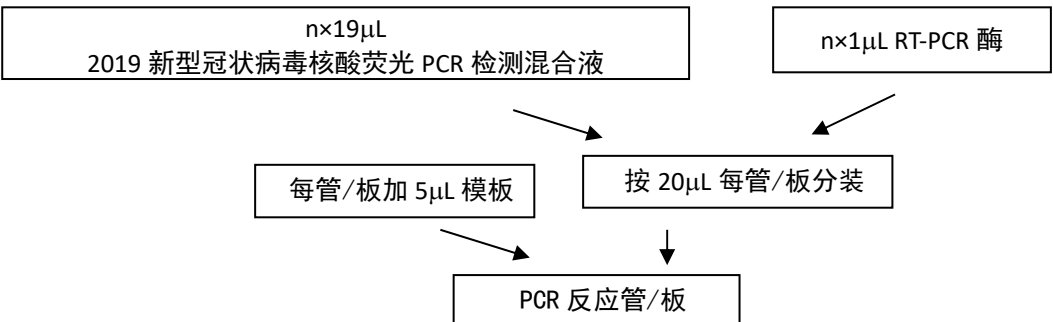
本试剂盒不含提取，使用以下经过验证的商品化提取试剂盒

提取试剂盒	生产厂商
核酸提取试剂（型号：MVR01）	上海之江
QIAamp Viral RNA Mini Kit（50）	QIAGEN

核酸提取按照厂家说明书进行操作，提取时每人份加入 1μL 2019 新型冠状病毒内标进行提取。

#### 1.2 试剂配制及加样

取  $n \times 19\mu\text{L}$  2019 新型冠状病毒核酸荧光 PCR 检测混合液与  $n \times 1\mu\text{L}$  RT-PCR 酶（ $n$  为反应管数），振荡混匀数秒，瞬时离心。取上述混合液 20μL 分别置于 PCR 反应管/板中，然后取提取后的样本 5μL、提取后的 2019 新型冠状病毒阴性对照品 5μL，以及 2019 新型冠状病毒阳性对照品 5μL 加入 PCR 管/板中，盖好管盖，瞬时离心，立即进行 PCR 扩增反应。如下图所示：



### 2. PCR 扩增

反应管/板置于荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

ABI 7500	1	45°C×10min; 95°C×3min	循环 1 次
	2	95°C×15sec 58°C×30sec	循环 45 次，单点荧光检测在 58°C
MIC	1	45°C×10min; 95°C×90sec	循环 1 次
	2	95°C×3sec 58°C×20sec	循环 45 次，单点荧光检测在 58°C

反应体系为 25μL，荧光通道检测选择如下表：

通道	A	B	C	D
机型（见注 2）				
ABI 7500	FAM	HEX/VIC	TEXAS RED	Cy5
MIC	Green	Yellow	Orange	Red

注 2：如使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”，如使用 MIC 实时荧光定量 PCR 分析仪，请于 Temperature Control 处选择“Standard TAQ（v3）”。

3. 基线和阈值设定 基线通常按照仪器自动设置的基线即可。基线调整原则：选择指数扩增前荧光信号较稳定的区域，起点（Start）避开荧光采集起始阶段的信号波动，终点（End）比最早出现指数扩增的样本 Ct/Cq 值减少 1-2 个循环。阈值设定原则为阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

### 4. 质量控制

	通道	正常结果（Ct/Cq 值）
2019 新型冠状病毒阴性对照品	A	无数值
	B	
	C	
	D	有 S 型扩增曲线
2019 新型冠状病毒阳性对照品	A,B,C	≤30 且具有 S 型扩增曲线

## 5. 试验结果的判断

在质控品正常的情况下，结果判断如下：

2019新型冠状病毒核酸荧光PCR检测混合液	结果判断
若A 通道Ct/Cq值≤43，且扩增曲线呈典型的S型，则结果判断为	RdRP基因（+）
若A 通道Ct/Cq值>43，或无数值，	RdRP基因（-）
若B 通道Ct/Cq值≤43，且扩增曲线呈典型的S型，则结果判断为	N基因（+）
若B 通道Ct/Cq值>43，或无数值	N基因（-）
若C 通道Ct/Cq值≤43，且扩增曲线呈典型的S型，则结果判断为	E基因（+）
若C 通道Ct/Cq值>43，或无数值	E基因（-）
若A,B,C,D通道均>43，或无数值	样本质量存在问题，或者操作存在问题，需重新采样，进行样本提取并检测。

根据上述3个通道的检测结果，判断结果如下：

试验结果	结果判断
RdRP 基因、N 基因和 E 基因均为（+）	2019-nCoV 阳性。
RdRP 基因（+）且 N 基因（+）	2019-nCoV 阳性。
RdRP 基因（+）且 E 基因（+）	2019-nCoV 阳性。
仅有 RdRP 基因（+）	则需重复测定，仍为阳性，则判断为 2019-nCoV 阳性。
E 基因（+）或 N 基因（+）	重复测定后为阳性，则可能是其他近源的冠状病毒。
RdRP 基因、N 基因和 E 基因均为（-）	2019-nCoV 阴性。

### 【阳性判断值】

检测通道	检测型别	阳性判断值
通道A	RdRP基因	Ct≤43
通道B	N基因	Ct≤43
通道C	E基因	Ct≤43

### 【检验结果的解释】

实验室环境污染，试剂污染，样品交叉污染会出现假阳性结果；试剂运输、保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，会出现假阴性结果。

### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂检测结果应结合其他相关医学检查结果进行综合分析，不单独作为诊断依据。
2. 不合理的样本采集、转运、储存；不当的试验操作；不合适的实验室环境均有可能导致假阳性或假阴性结果。
3. 本产品不能进行SARS的鉴别诊断。

### 【产品性能指标】

1. 最低检测限：1×10<sup>3</sup>copies/mL
2. 分析特异性：与甲型流感病毒（H1N1）、乙型流感病毒（Yamagata）、呼吸道合胞病毒（A型）、腺病毒（2型）、副流感病毒（1型）、肺炎支原体、肺炎衣原体、百日咳杆菌、肺炎链球菌、鼻病毒（A型）、嗜肺军团菌、中东呼吸系统综合征冠状病毒（MERSr-CoV）、人冠状病毒HCoV-229E、人冠状病毒HCoV-HKU1、人冠状病毒HCoV-NL63、人冠状病毒HCoV-OC43、甲型流感病毒（H3N2）、甲型流感病毒（H5N1）、甲型流感病毒（H7N9）、乙型流感Victoria、人间质肺病毒、EB病毒、麻疹病毒、人巨细胞病毒、轮状病毒、诺如病毒、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、化脓性链球菌无交叉。
3. 抗干扰：1mg/mL粘蛋白和5%全血对试剂盒无干扰。
4. 精密度：对于6320 copies/mL、2000 copies/mL、1000 copies/mL浓度的模拟样本或核酸，批内和批间的Ct的CV均小于5%。
5. 临床评价：临床验证以《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》、《新型冠状病毒感染的肺炎病例监测方案（第二版）》推荐方法得到的确诊/排除结果为对比，在广东省疾病预防控制中心和浙江大学医学院附属第一医院共检测了199个病例的252份标本，检测结果与确诊/排除结果完全一致，阴阳性符合率及总符合率均为100%。临床验证的样本类型涵盖了 鼻拭子、咽拭子、痰液、漱口水、干咳口水、粪便、拭子和肺泡灌洗液。

### 【注意事项】

开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

1. 整个检测过程应严格分在三区进行：PCR反应体系的配制区；样本处理、加样区；PCR扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台，并进行消毒。
2. 使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
3. 试剂准备和样本处理应使用超净工作台(负压式)或防污染罩，以防止对环境污染。
4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。
5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。
6. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
7. 实验中接触过对照品的废弃物品（如吸头）、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。
8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
9. PCR反应混合液应避光保存。
10. 反应管/板中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧。
11. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

### 【参考文献】

- [1] Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected.WHO.2020.  
[2] Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR.2020

### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海之江生物科技股份有限公司  
住所：上海市张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 20 幢乙号 1 层、21 幢甲号 1 层  
联系方式：021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn  
售后服务单位名称：上海之江生物科技股份有限公司  
联系方式：021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn  
生产地址：上海市闵行区新骏环路 588 号 26 幢  
医疗器械生产许可证编号：沪食药监械生产许 20081591 号

**【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20203400057**

**【说明书核准日期及修改日期】2020-1-26**