



新型冠状病毒（2019-nCoV） 核酸检测试剂盒（PCR荧光探针法）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（PCR荧光探针法）

【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人鼻咽拭子、痰液及肺泡灌洗液中的新型冠状病毒（2019-nCoV），仅作为应对2019年12月以来新型冠状病毒（2019-nCoV）感染的肺炎疫情期间的体外诊断应急使用。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（现行版本）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。

【检验原理】

本试剂盒针对新型冠状病毒（2019-nCoV）基因组高度保守区域ORF1ab和N基因设计特异性引物和探针，基于荧光定量PCR平台，采用一步法荧光定量逆转录PCR原理，对新型冠状病毒（2019-nCoV）进行定性检测。

PCR检测体系包含人类Actin内标引物和探针，可用于监控呼吸道核酸质量和PCR反应体系，避免空白样本及假阴性结果。

【主要组成成分】

试剂名称	主要组成成分	规格及数量 (25人份)	规格及数量 (50人份)
2019-nCoV酶液	逆转录酶, 热启动DNA聚合酶等	25 μl/管×1管	50 μl/管×1管
2019-nCoV反应液	ORF1ab和N基因特异性引物、探针, 内标模板及其引物、探针, 反应缓冲液等	475 μl/管×1管	950 μl/管×1管
2019-nCoV阳性质控	携带目的基因质粒和内标质粒	100 μl/管×1管	200 μl/管×1管
2019-nCoV阴性质控	不含目的基因的空质粒	100 μl/管×1管	200 μl/管×1管

【储存条件及有效期】

试剂盒生产日期及失效日期见外包装盒。

试剂盒应在-20℃以下避光保存, 有效期6个月。避免反复冻融(冻融次数少于5次)。

本试剂盒需低温运输, 长途运输应使用冰袋。

【适用仪器】

ABI 7500荧光定量PCR仪、ABI ViiA 7荧光定量PCR仪、LightCycler 480荧光定量PCR仪、Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪, SLAN系列全自动医用荧光定量PCR仪。

【样本要求】

本检测试剂适用样本类型: 上呼吸道标本(包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物、深咳痰液); 下呼吸道标本(包括呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本); 组织培养物等样品。

【检验方法】

1. 试剂的准备（试剂准备区）

- 1.1 取出试剂盒中的2019-nCoV反应液，在室温下融化并混匀，低速离心10秒。取出试剂盒中的2019-nCoV酶液，离心10秒，置于冰上备用。
- 1.2 确定反应数N：根据检测样本数计算所需反应数，如样本数为n，则反应数N=（待检样本数n+阴性质控1+阳性质控1+1）。按表1配制反应体系。

表1 反应体系配制

组分	加量/每人份×N
2019-nCoV反应液	19 μl × N
2019-nCoV酶液	1 μl × N

- 1.3 反应体系分管：准备相应数量的PCR反应管，将上述混合液震荡混匀，瞬时离心5秒，按20 μl/管分装至PCR管中。将分装好的PCR管转移至样本制备区。

2. 样本制备（样本制备区）

- 2.1 待测样本提取采用商品化的病毒RNA提取试剂盒，推荐使用康为世纪生物科技的磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒（货号CWY071）或柱式法病毒DNA/RNA提取试剂盒（货号CWY070），具体操作详见试剂盒说明书。
- 2.2 取5 μl待测样本、2019-nCoV阳性质控、2019-nCoV阴性质控分别加入到已分装的反应混合液中。封严封口膜或盖紧PCR反应管盖，瞬时低速离心。将PCR反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。

3. PCR扩增（核酸扩增区）

- 3.1 将上述 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置，并记录放置顺序。
- 3.2 打开参数窗口设置循环条件，反应程序如表2所示。

表2 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
反转录	50℃	15分钟	1
预变性	94℃	1分钟	1
变性	94℃	15秒	45
退火、延伸及荧光采集	58℃	30秒	

【实验有效性判定】

注：本产品中ORF1ab基因报告荧光为FAM，N基因报告荧光为ROX，内标基因报告荧光为VIC。

1. 阳性质控：

FAM和ROX通道有典型S型扩增曲线且Ct值 <35 。

内标VIC通道有典型S型扩增曲线且Ct值 <35 。

2. 阴性质控：

FAM和ROX通道值Ct >40 或无Ct值，线形为直线或轻微斜线，无指数增长期。

内标VIC通道不做要求。

3. 实验样本：

内标VIC通道有典型S型扩增曲线。

4. 只有同时满足1，2，3条件，实验有效，否则无效。

【检验结果的判定】

以ABI 7500为例：反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节基线的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值可以在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。

靶标	通道	结果解释
开放阅读编码框ORF1ab	FAM	阳性：待测样本检测结果Ct值 <35 ，曲线呈S型且有明显指数增长期，且必须两个通道同时满足以上条件； 阴性：一个通道Ct值 >35 ，另一个通道Ct值 >40 或无Ct值，此次结果判定为阴性； 可疑：有一个通道结果Ct值 <35 ，另一个通道检测结果 $35 \leq \text{Ct值} \leq 40$ ，或两个通道检测结果均为 $35 \leq \text{Ct值} \leq 40$ ，此时对样本进行重复检测，如实验结果仍然在35-40之间，曲线呈典型S型且有明显指数增长期，则判断为阳性，否则为阴性。
核壳蛋白基因N	ROX	

【检验方法的局限性】

1. 检测结果仅供临床参考，不得作为诊断的唯一依据。
2. 提取的样本RNA质量差、提取后的RNA溶液保存条件及保存时间不当、样本中含有抑制物、核酸降解等均可造成阴性结果。
3. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
4. 本产品仅限于规定的样本类型、适用机型。
5. 内部质控可监控 PCR 反应体系的有效性，但可能无法判断核酸提取效率。

【产品性能指标】

1. 检测企业阴阳性参考品，阴阳性符合率均为100%。
2. 最低检测限： 1×10^3 copies/ml。

【注意事项】

1. 本产品为应急体外诊断试剂，操作人员应经过专业培训并具有一定经验，实验前请仔细阅读说明书。
2. 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、标本制备区、扩增和产物分析区)，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，各区用品不能交叉使用。
3. 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
4. 加样时应使样品完全加入反应液中，加样后应尽快盖紧管盖或密封封口膜，并适时离心。
5. 反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧/封口膜无翘起。
6. 扩增结束后取出反应管/板，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
7. 扩增结束后不要随意松开管盖或撕开封口膜，避免气溶胶污染。
8. 废弃枪头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同处理。
9. 工作台及各种实验用物品经常用75%酒精和紫外灯进行消毒。
10. 试剂使用前要平衡至室温，避免反复冻融。避免试剂间的交叉污染。

【参考文献】

- [1] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* 2012;17(39).
- [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.
- [3] Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol.* 2010;84(21):11336-49.
- [4] Muth D, Corman VM, Roth H, Binger T, Dijkman R, Gottula LT, et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Sci Rep.* 2018;8(1):15177.

【基本信息】

生产企业名称：江苏康为世纪生物科技有限公司

住所：江苏省泰州市药城大道一号TQB大楼4楼

邮政编码：225300

电话：0523-86201183 传真：0523-86816890

网址：www.cwbiotech.com

售后服务单位名称：江苏康为世纪生物科技有限公司

联系方式：0523-86201183

生产地址：泰州市药城大道一号TQB大楼4楼，泰州市中国医药城口泰路西侧、陆家路东侧G52幢58号1层、2层，59号4层东侧

医疗器械生产许可证编号：

【说明书核准日期及修改日期】