

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】 24 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和肺泡灌洗液样本中, 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, 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】

本试剂盒对新型冠状病毒 (2019-nCoV) ORF 1ab 及编码核衣壳蛋白 N 基因的特异性保守序列为靶区域, 进行了双靶标基因的设计, 配以 PCR 反应液, 在荧光定量 PCR 仪上, 应用实时荧光定量 RT-PCR 检测技术, 通过荧光信号的变化实现样本 RNA 的检测。

PCR 检测体系包含有内源性的内标引物和探针, 通过检测内标是否正常来监测样本采集、提取过程, 避免假阴性结果。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组分组成:

序号	试剂名称	规格与装量	主要成分
1	2019-nCoV-PCR-反应液	624 μ L/管	引物 (4.62%)、探针 (1.15%)、dNTPs (3.85%)、MgCl ₂ (0.77%)、Rnasin (0.48%)、PCR buffer (89.13%)
2	2019-nCoV-PCR-酶混合液	96 μ L/管	RT 酶 (62.5%)、Taq 酶 (37.5%)
3	2019-nCoV-PCR-阳性对照	500 μ L/管	含目标基因 (ORF1ab、N 基因)、内标基因片段 (Rnase P) 的体外转录 RNA
4	2019-nCoV-PCR-阴性对照	500 μ L/管	生理盐水

备注: 1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。

2) 使用本公司生产的样本释放剂 (湘长械备 20150022 号) 进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

1. 试剂应避光密闭, 试剂组分保存于 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C。试剂盒有效期暂定为 6 个月。
2. 生产日期, 失效日期请见外包装盒。
3. 不使用时, 这些试剂在包装标识的效期内可稳定存放。一旦使用, 扩增试剂盒反复冻融应不超过 3 次。

【适用仪器】

SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

- 1 适用样本类型: 咽拭子、肺泡灌洗液。
- 2 样本采集: 按照常规样本采集方法进行采集, 或按照《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》文件中《新型冠状病毒感染的肺炎实验室技术指南》“标本采集方法”相关规定执行。
- 3 样本保存和运送: 待测样本可立即用于处理, 能在 24 小时内检测的标本可置于 4 $^{\circ}$ C 保存; 24 小时内无法检测的标本则应置于 -70 $^{\circ}$ C 或以下保存 (如无 -70 $^{\circ}$ C 保存条件, 待测样本可于 -20 $^{\circ}$ C 保存 10 天, 核酸样本 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 保存 15 天)。应避免反复冻融。样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 试剂准备 (在试剂准备区进行)

- 1.1 取出盒中的各组分, 室温放置, 待其温度平衡至室温后, 混匀后备用;
- 1.2 根据待测样本数量, 阳性对照和阴性对照数量, 按比例 (2019-nCoV-PCR 反应液 26 μ L/人份 + 2019-nCoV-PCR-酶混合液 4 μ L/人份) 取相应量的组分, 充分混匀成 PCR 混合液, 瞬时离心后备用;
- 1.3 将上述准备好的试剂转移至样本处理区, 待用。

2. 样本处理 (在样本处理区进行)

- 2.1 使用圣湘生物科技股份有限公司的样本释放剂按其说明书操作进行核酸提取。
- 2.2 将 30 μ L 配制好的 PCR-混合液加入到装有 20 μ L 上述处理后的样本 PCR 扩增管中, 在荧光 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 的检测。

3. PCR 扩增 (在扩增与分析区进行) (请参照仪器使用说明书进行设置)

- 3.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽, 按对应顺序设置阳性对照、阴性对照及待测样本, 并设置样本名称。
- 3.2 荧光检测通道选择:
 - 1) 选择 FAM (ORF-1ab 区域) 和 ROX (N 基因) 通道检测 2019-nCoV 病毒核酸;
 - 2) 选择 HEX 通道检测内标。
- 3.3 推荐的循环参数设定:

常规 qPCR 程序				
步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录	50 $^{\circ}$ C	30 分钟	1
2	cDNA 预变性	95 $^{\circ}$ C	1 分钟	1
3	变性	95 $^{\circ}$ C	15 秒	45
	退火, 延伸及荧光采集	60 $^{\circ}$ C	30 秒	
4	仪器冷却	25 $^{\circ}$ C	10 秒	1

设置完毕, 保存文件, 运行反应程序。

4. 结果分析 (请参照仪器使用说明书进行设置)

反应结束后自动保存结果, 对检测靶标以及内标的扩增曲线分别进行分析。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, 调整阴性对照的扩增曲线使其平直或低于阈值线), 点击 Analyze 进行分析, 使各项参数符合下述“5. 质量控制”中的要求, 然后到 Plate 窗口下记录定性结果。

5. 质量控制

5.1 2019-nCoV-PCR-阴性对照: FAM、ROX 通道及内标 (HEX) 通道均无 Ct 值或 Ct > 40;

5.2 2019-nCoV-PCR -阳性对照: FAM、ROX 及内标 (HEX) 通道均 $Ct \leq 35$;
5.3 以上要求需在同一实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

【阳性判断值】

通过参考值的研究确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 参考值为 40, 内标 Ct 的参考值为 40。

【检验结果的解释】

1. 对于 FAM 或 ROX 通道检测到典型的 S 型扩增曲线, 且 $Ct \leq 40$ 的样本, 报告为 2019-nCoV 病毒阳性;
2. 对于 FAM 且 ROX 通道均未检测到典型的 S 型扩增曲线 (No Ct), 或 $Ct > 40$, HEX 通道有扩增曲线, 且 $Ct \leq 40$ 的样本, 报告为 2019-nCoV 病毒阴性;
3. 对于 FAM、ROX、HEX 通道均未检测到典型的 S 型扩增曲线 (No Ct), 或 $Ct > 40$, 表示本次检测样本细胞含量太低或者有干扰物质抑制反应, 该样本的检测结果无效, 应查找并排除原因, 并对此样本重新采样, 进行重复试验 (若重复试验的检测结果仍无效, 请与本公司联系)。

注: 对于病毒培养物, 内标检测结果不作要求。

【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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 有关假阴性结果的可能性分析
 - 2.1 不合理的样本采集、处理、运送、样本浓度过低均有可能导致假阴性结果。
 - 2.2 2019-nCoV 新型冠状病毒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。
 - 2.3 不合理的试剂保存可能会导致假阴性结果。
 - 2.4 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子, 可能会导致假阴性结果。
 - 2.5 样本处理过程出现交叉污染, 会造成假阳性结果。
 - 2.6 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》中的要求配备设备及操作人员, 应严格按照说明书要求进行操作。

【产品性能指标】

1. 准确性
检测企业阳性参考品, 结果均为阳性。
2. 特异性
本试剂盒与冠状病毒 (NL63, HKU1, 229E, OC43)、SARS 冠状病毒、MERS 冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒 Yamagata 型、Victoria 型、甲型 H1N1 流感病毒、甲型 H3N2 流感病毒、甲型 H5N1 流感病毒、甲型 H7N9 流感病毒、呼吸道合胞病毒 A、B 型、鼻病毒 A、B、C 型、腺病毒 1、2、3、4、5、7、55 型、副流感病毒 1、2、3 型、肠病毒 A、B 型、肠病毒 C 型 (EV-C95)、肠病毒 D 型 (EV-D70)、偏肺病毒、人间质肺病毒、新生隐球菌、化脓性链球菌、鲍曼不动杆菌、肺孢子虫、肺炎克雷伯杆菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎支原体、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、肺炎衣原体、EB 病毒、人巨细胞病毒、烟曲霉、白色念珠菌、光滑念珠菌、结核分枝杆菌、非结核分枝杆菌、诺如病毒、轮状病毒、水痘-带状疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人类基因组 DNA 等阳性样本无交叉反应。检测企业阴性参考品均为阴性。
3. 最低检测限: 本试剂盒最低检测限为 200 copies/mL。
4. 精密度: 批内精密度 Ct 值的变异系数 (CV,%) $\leq 5\%$ 。
5. 样本中可能存在的干扰物质: 100 μ g/mL 盐酸羟甲唑啉、50 μ g/mL 地塞米松、50 μ g/mL 盐酸头孢甲肟、100 μ g/mL 奥司他韦、100 μ g/mL 扎那米韦、100 μ g/mL 利巴韦林、100 μ g/mL 阿奇霉素、300U/mL α -干扰素、320 μ g/mL 布地奈德、125 μ g/mL 苯福林、100 μ g/mL 妥布霉素、50 μ g/mL 倍氯美松、

100 μ g/mL 氟尼缩松、100 μ g/mL 莫米松、200 μ g/mL 氟替卡松、200 μ g/mL 盐酸组胺、100 μ g/mL 帕拉米韦、100 μ g/mL 洛匹那韦、100 μ g/mL 莫匹罗星、100 μ g/mL 曲安奈德、100 μ g/mL 利托那韦、100 μ g/mL 阿比多尔、60 μ g/mL 氯化钠、100 μ g/mL 尿素、10 μ g/mL 血红素、20 μ g/mL 纯化粘蛋白、20%(v/v)无水乙醇、20%(v/v)人全血对试剂盒的检测结果无明显干扰。
5. 临床评价以《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, 在军事科学院军事医学研究院、湖南省疾病预防控制中心、湖南省人民医院、中南大学湘雅二医院等 4 家机构收集临床实际使用数据进行统计分析, 经初步评价, 基本确认产品临床性能能够满足疫情应急需要。临床评价的样本类型涵盖了咽拭子、肺泡灌洗液。将在上市后进一步收集临床数据对产品临床性能进行确认。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测, 使用前请仔细阅读本说明书。
2. 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。
3. 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, 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。
4. 所有检测样品应视为具有传染性物质, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常更换手套以避免样品间的交叉污染; 样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求: 卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
5. 提示: 试剂保存、运输及使用过程中操作不当均可能影响其检测结果, 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, 请严格按照说明书规定操作。

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]何佩, 崔爱利, 徐瑾, et al. 五株人冠状病毒 NL63 的基因型鉴定及 S1domain 基因特征分析[J]. 病毒学报, 2019(2):202-210.
- [2]修文琼, 郑奎城, 吴冰珊, et al. 人冠状病毒 HKU1 N 和 S 蛋白基因序列及进化分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(6):527-531.
- [3]Aslak Widerøe Kristoffersen, Svein Arne Nordbø, Rognlien A G W, et al. Coronavirus Causes Lower Respiratory Tract Infections Less Frequently Than RSV in Hospitalized Norwegian Children[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2010, 30(4):279-283.
- [4]E. Moës, Vijgen L, Keyaerts E, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium[J]. BMC Infectious Diseases, 2005, 5.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 圣湘生物科技股份有限公司
住所: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号
联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876
售后服务单位名称: 圣湘生物科技股份有限公司
联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876
医疗器械生产许可证编号: 湘食药监械生产许 20150036 号
生产地址: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20203400064

【说明书核准日期及修改日期】2020 年 01 月 28 日