

# 实时荧光逆转录-聚合酶链反应 检测 2019 新型冠状病毒

美国疾病预防控制中心病毒部呼吸道病毒组

## 使用说明

翻译：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家麻疹实验室

2020 年 2 月 8 日

## 目录

简介 .....	3
标本 .....	3
试剂、耗材和设备要求 .....	4
核酸提取 .....	5
质量控制 .....	6
rRT-PCR 检测 .....	7
检测结果解释 .....	11
检测局限性 .....	13
联系信息 .....	13

## 简介

**目的：** 本文采用实时荧光逆转录-聚合酶链反应（real-time RT PCR, rRT-PCR）试剂盒体外定性检测呼吸道和血清标本中 2019-新型冠状病毒（2019-nCoV）。针对 2019-nCoV 设计引物和探针组合，适用于对类 SARS 样冠状病毒的通用检测和 2019-nCoV 的特异检测。

**使用本操作规程的限制：** 本规程的 rRT-PCR 方法未经本使用说明所述之外的仪器或化学试剂的验证。

## 标本

### 生物安全注意事项

处理临床标本时，应穿戴适当的个人防护用品（例如防护服、手套、护目镜）。标本处理应在经认证的 II 级生物安全柜中进行，遵循二级生物安全等级或更高标准。更多相关信息请参阅：

●采集、处理和检测疑似患者（Patients Under Investigation, PUI）临床标本中 2019-nCoV 的暂行准则

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

●微生物和生物医学实验室的生物安全（第 5 版）

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>

### 适用的标本

●呼吸道标本包括：鼻咽或口咽抽吸物或洗液、鼻咽或口咽拭子、支气管肺泡灌洗液、气管吸出物和痰液。

拭子标本应采用带有铝或塑料杆的人造合成拭子头（例如聚酯纤维或涤纶）收集，不能使用木杆的海藻酸钙或棉质的拭子头。

●血清

### 标本处理和储存

●标本采集后在 4℃ 最多保存 72 小时。

●如果不能及时检测，则将标本于 -70 °C 或更低温度保存。

- 提取的核酸应于-70°C或更低温度保存。

### 标本剔除原则

- 标本未正确保存于 2-4°C或冷冻在-70°C及以下。
- 标本标签或记录不齐全。
- 标本类型不合适。
- 标本量不足。

## 试剂、耗材和设备要求

免责声明：以下列举的供应商或制造商的产品是适用的，但不代表已获得美国疾病预防控制中心的认可。

### 试剂与耗材

- 实时荧光 RT-PCR 反应的引物/探针组合
- 阳性模板对照
- TaqPath™1-Step RT-qPCR 预混液，CG（赛默飞世尔；货号 # A15299）
- 无核酸酶的分子级水
- 一次性无粉手套
- P2/P10、P200 和 P1000 防气溶胶吸头
- 无菌、无核酸酶的 1.5 mL 微量离心管
- 0.2 mL PCR 反应管条或 96 孔实时荧光 PCR 反应板和光学 8 联管
- 实验室记号笔
- 适用于 1.5 mL 微量离心管和 96 孔 0.2 mL PCR 反应管的低温指示冰盒
- 1.5 mL 微量离心管架
- 表面污染清除试剂
- DNAzap™（生命科技；货号 # AM9890）

○DNA Away™（赛默飞世尔科技；货号 # 21-236-28）

○RNase Away™（赛默飞世尔科技；货号 # 21-236-21）

○10%的漂白剂（5.25%-6.0%次氯酸钠按照 1:10 比例稀释）

## 仪器设备

- PCR 工作站[紫外线灯；层流（100 级 HEPA 过滤）]
- 涡旋混合器
- 小型离心机
- 微量移液器（2 或 10 μL、200 μL 和 1000 μL）
- 多道微量移液器（5-50 μL）
- 2x96 孔低温指示冰盒
- 20°C（无霜）和-70°C冰箱；4°C冰箱
- 实时荧光 PCR 检测系统
- 核酸提取系统

## 核酸提取

●rRT-PCR 扩增方法的检测能力取决于标本中 RNA 模板的数量和质量。在检测标本之前，RNA 提取试剂的回收率和纯度应符合要求并经过验证。

● 推荐已证明可获得高度纯化 RNA 的商业化核酸提取试剂包括：bioMérieux

NucliSens®systems, QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAamp® MinElute Virus Spin Kit 或 RNasy®Mini Kit (QIAGEN), EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN), Roche MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit, Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit, RocheMagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit 和 Invitrogen ChargeSwitch®Total RNA Cell Kit.

● 于-70°C保留剩余标本和提取的核酸。

● 仅冻化当天需检测数量的核酸标本。在测试之前，勿多次冻融核酸标本。

## 质量控制

由于 rRT-PCR 敏感性高，上述检测过程中应执行严格的质量控制和质量保证规程。遵循以下标准有助于最大程度地减少假阳性可能。

### 一般注意事项

- 检测人员需熟悉检测流程和所使用的检测仪器设备。
- 检测试剂配制和处理提取核酸时要在分开的区域，并分别在这些区域配置专用设备（例如微量移液器、小型离心机）和耗材（例如微量离心管、吸头、防护服和手套）。
- 工作流程必需始终由清洁区到污染区。
- 试剂配制和处理提取核酸时，穿戴干净的一次性防护服和未使用过的无粉手套。任何时候若怀疑有污染，请立即更换手套。
- 引物/探针和酶的预混合液（请参阅说明书）保存在适合的温度。请勿使用过期试剂。
- 尽可能使试剂管和反应体系配置管的管盖处于关闭状态。
- 清洁和清除表面污染。
- 请勿将提取的核酸或 PCR 产物带入试剂准备区。
- 仅使用带防气溶胶（滤芯）的吸头。
- 仅使用 PCR 板条盖密封反应管，不可使用 PCR 板密封膜。

### 检测对照

- 对照应与标本同时进行检测。
- PTC（阳性对照）-有参考 Ct 值范围的阳性模板对照。
- NTC（阴性对照）-在 rRT-PCR 反应开始时加入阴性模板对照。
- HSC - 与待测标本同时提取的人类标本提取对照；提供核酸提取对照和辅助阴性对照以验证核酸提取过程的完整性和试剂的有效性。
- RP-检测所有临床标本中的人类 RNase P 基因以评估标本质量。

\*注意：请保留 PTC 检测日志。在每次检测临床标本后，应记录对照的 Ct 值。

## rRT-PCR 检测

### 储备试剂准备

rRT-PCR 引物/探针（若由 CDC 提供，请参阅包装内的说明书）

●注意事项：这些试剂只能在清洁区处理，避光保存于适宜温度（见下文）。避免反复冻融。冻化后应保持低温。

●使用无菌技术，将干粉试剂重悬于 500  $\mu$ L 无核酸酶水中（工作浓度为 50X），避光于室温下 15 分钟，待试剂完全溶化。

●轻轻混匀，分装到已标记好的小管中，每管 100  $\mu$ L。将其中一管引物/探针避光保存于 2-8 $^{\circ}$ C，勿冻存（稳定期可长达 4 个月）。剩余分装管于  $\leq -20^{\circ}$ C 的无霜冰箱中保存。

阳性对照（PTC）（如果使用 CDC 阳性对照 nCoVPC，请参见包装内的说明书）

●注意事项：本试剂在核酸处理区内应谨慎处理，避免造成污染。应避免反复冻融，冻化后应于冰上放置。

●用于评估 rRT-PCR 检测的能力。应将每管干粉试剂重悬于 1 mL 的无核酸酶水中，完全溶化后获得工作稀释液，然后分装至 10 个分装管中，每管 100  $\mu$ L，于  $\leq -70^{\circ}$ C 保存。

●准备 nCoVPC 工作稀释液，冻化上述含 100  $\mu$ L 的浓缩 nCoVPC 分装管，以 1:10 比例进行稀释（终体积为 1.0 mL），将稀释的 nCoVPC 分装为适合检测所需的一次性小管。未使用的 nCoVPC 于  $\leq -70^{\circ}$ C 保存。

●每次实验时冻化一管稀释好的阳性对照，在加入反应板之前，均应于冰上放置，未使用完的阳性对照应丢弃处理。

●nCoVPC 也包含人类 DNA，可作为 RP 检测的阳性对照。

### 仪器准备

1) 首先，使用 RNase Away® 或新配制的 10% 漂白剂清洁所有工作台面、微量移液器、离心机和其他设备。

2) 打开 AB 7500 Fast DX，使反应板升温至适宜温度。

3) 进行反应板设置并选择扩增程序。

4) 仪器设置：检测通道(FAM)；淬灭基团(无)；参比荧光：(无)；运行模式：(标准)；  
样本体积(25  $\mu\text{L}$ )

步骤	循环数	温度	时间
UNG 孵育	1	25°C	2min
逆转录孵育	1	50°C	15min
酶激活	1	95°C	2min
扩增	45	95°C	3s
		55°C*	30s

\*在 55°C 采集荧光信号数据 (FAM)

### 反应体系和反应板设置

注意：反应板设置应根据标本数量和工作安排而定。每个反应均应包括 NTC 和 nCoVPCs。

1) 在试剂准备区的清洁通风柜中，将 rRT-PCR 缓冲液、酶和引物/探针置于冰或低温指示冰盒上。在配制和使用过程中均应保持低温。

2) 使用前将 2X 反应预混液冻化。

3) 将缓冲液、酶和引物/探针颠倒混匀 5 次。

4) 瞬时离心缓冲液和引物/探针后置于冰上。

5) 标记装有引物/探针的 1.5mL 离心管。

6) 确定每次检测需配制的反应数(N)。由于存在移液误差，需配制过量的 NTC、nCoVPC 和 RP 反应体系。根据以下说明确定反应数：

如果包括对照在内的标本数(n)在 1 到 14 之间，则  $N=n+1$

如果包括对照在内的标本数(n)等于或大于 15，则  $N=n+2$

7) 对于每组引物/探针，计算每个反应需要加入的量。

TaqPath™一步法 RT-qPCR 反应液

步骤	试剂	每个反应需要加入的试剂体积
1	无核酸酶纯水	$N \times 13.5 \mu\text{L}$
2	引物/探针混合液	$N \times 1.5 \mu\text{L}$
3	TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4x)	$N \times 5.0 \mu\text{L}$
	总体积	$N \times 20.0 \mu\text{L}$

8) 将试剂分别加入标记的 1.5 mL 离心管中。加入试剂后，通过微量移液器反复吹吸混匀反应液。请勿涡旋震荡。

9) 瞬时离心 5 秒，将试剂收集至离心管底部，然后将离心管放回至低温指示冰盒。

10) 在 96 孔低温指示冰盒上放置 PCR 反应条或反应板。

11) 将 20 $\mu\text{L}$  的反应体系按下图加入反应孔中，如图 1 所示。

图 1：反应板设置示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N1											
B	N2											
C	N3											
D	RP											
E												
F												
G												
H												

12) 在移至核酸处理区之前，在分析准备区准备第 1 列的阴性对照 (NTC)。

13) 用移液器吸取 5 $\mu\text{L}$  无核酸酶水加至 NTC 样本孔中。在进行下一步操作之前，盖好 NTC 孔盖。

14) 盖好整个反应板，将反应板移至标本核酸处理区域。

## 添加模板

1) 轻轻涡旋混匀核酸样品管大约 5 秒。

2) 离心后，将提取好的核酸样品管放置于低温指示冰盒上。

3) 如图 2 所示，将样本加至 2-11 列(第 1 列和第 12 列为对照)进行检测。小心吸取 5.0μL 的第 1 份样品加至标记该样品的所有孔中(例如样本“S1”加至第 2 列)。在加样过程中，要确保其他样本孔盖已盖紧。每次加样后需更换吸尖。

4) 已经加入样本的反应管要盖紧孔盖，防止交叉污染并确保样品追踪。

5) 必要时经常更换手套以避免污染。

6) 对剩余样本重复步骤 3 和步骤 4。

7) 如果有必要，将 5μL 提取好的人类标本提取对照(HSC)加至 HSC 孔中(图 2, 第 11 列)。加样后将孔盖盖紧。

8) 盖好整个反应板，将反应板移至阳性模板对照处理区域。

## 添加对照

1) 吸取 5μL nCoVPC RNA 加至第 12 列的样本孔中(图 2)。加入对照 RNA 后，盖好孔盖。

注意:如果使用 8 联管，请在每个 8 联管上标注样品编号。但不要在反应管顶部标记!

2) 瞬时离心反应管 10-15 秒。离心后放置在低温指示冰盒上。

注意:如果使用 96 孔板，在 4℃下 500×g 离心 30 秒。

图 2. 2019-nCoV RT-PCR 诊断面板：样本和对照设置

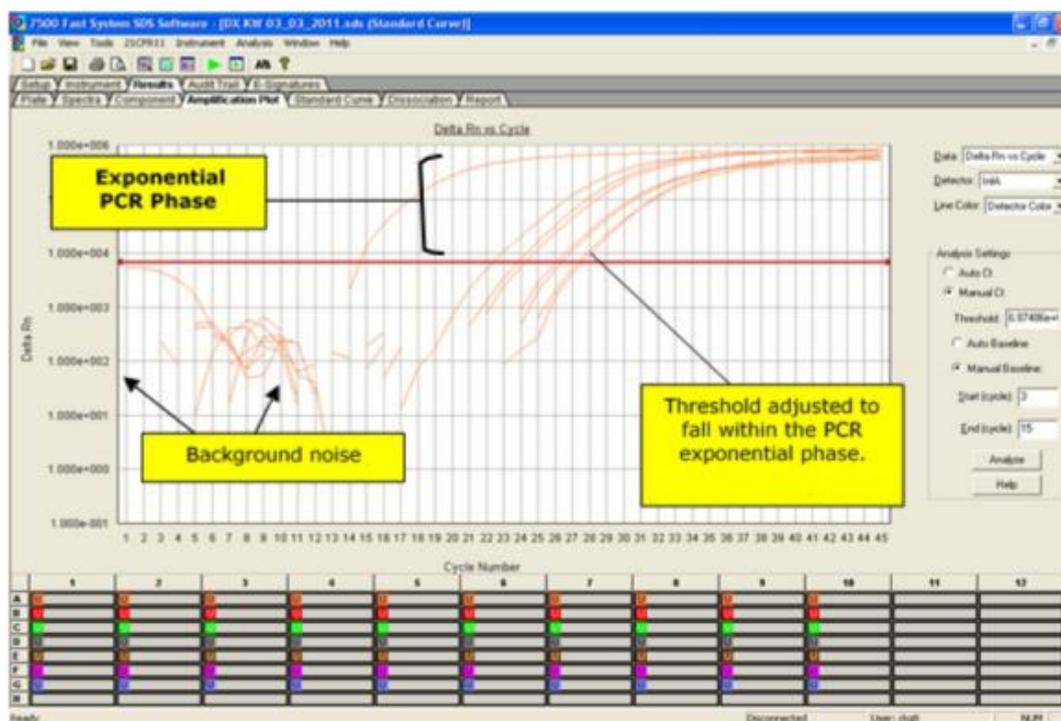
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 <sup>a</sup>	12
A	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoVPC
B	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoVPC
C	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoVPC
D	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoVPC
E												
F												
G												
H												

<sup>a</sup>如果必要，可用提取好的 HSC 替换本列中的样本

## 数据分析

运行完成后，按照仪器说明保存并分析数据。应手动设置阈值对每个目标基因 (Target) 分别进行分析。应调整阈值使其位于荧光扩增曲线的指数增长期之内，且高于任何背景信号 (参见图 3)。应至始至终都按照这个原则来设置阈值。

图 3. 扩增图窗口



## 检测结果解释

- NTCs 结果应呈阴性，并且其荧光扩增曲线不应超过阈值线。
  - 如果一个或多个 NTC 孔出现假阳性，提示样品可能已经被污染。
    - 应判定该次检测无效，并严格遵循操作指南进行重复检测。
- PTC 结果应为阳性，且本次检测的所有目标基因的 Ct 值都应在参考范围内。
  - 如果 PTC 结果为阴性，则判定检测无效，并严格遵循操作指南进行重复检测。
  - 分析 PTC 反应失败的原因，采取改正措施，并记录调查和改正措施结果。
  - 勿使用无法产生预期结果的 PTC 试剂。

● 对于所有临床标本和 HSC，RP 的 Ct 值  $\leq 35$ ，提示反应体系中来自人 RNase P 基因的核酸充足，标本质量合格。

○ 无法在 HSC 中检测到 RNase P 基因的可能原因：

- 检测方法不正确或者未按照检测方法操作
- 试剂问题或设备故障

○ 在 HSC 中检测到 RNase P 基因，而在任何临床样品中均未检测到 RNase P 基因的可能原因：

• 由于临床标本中提取核酸不当导致核酸丢失或从临床样本中残留了 PCR 抑制剂

- 样品中人类细胞材料含量不足，导致不能检测到 RNase P 基因

● HSC 对于 2019-nCoV 特异性引物/探针对，结果应为阴性。

○ 如果任何 2019-nCoV 特异性引物/探针的扩增曲线超过阈值线，解释如下：

• 可能已发生核酸提取试剂的污染。应判定此次检测无效，并确认核酸提取试剂有效后，再进行下一步检测。

• 在核酸提取步骤或在加样过程中发生了样品的交叉污染。应判定此次检测无效，并严格遵守操作指南进行重复检测。

● 当所有对照均成立，并且所有 2019-nCoV 靶基因 (N1, N2, N3) 扩增曲线均未超过阈值线，而 RNase P 扩增曲线超过了阈值线，则该样品为 2019-nCoV 阴性。

● 当所有对照均成立，并且所有 2019-nCoV 靶基因 (N1, N2, N3) 扩增曲线均超过阈值线，则该样品为 2019-nCoV 阳性。无论 RNaseP 结果是阳性还是阴性，2019-nCoV 结果均有效。

● 当所有对照均成立，但所有 2019-nCoV 靶基因 (N1, N2, N3) 和 RNase P 基因均未超过阈值线时，则结果无效。应该重新从样本中提取 RNA 进行检测。如果 RNA 已经用完，应从临床标本中重新提取 RNA 进行检测。如果再次检测的结果仍显示所有的目标基因和 RNaseP 基因的检测是阴性，尽管对照成立，但结果仍为无效。

● 当所有对照均成立，并且不是所有三个目标基因都超过阈值线，则判定检测结果不确定。应从剩余标本中重新提取 RNA 进行检测。

## 2019-nCoV rRT-PCR 诊断结果解释

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N3	RP	结果解释 <sup>a</sup>
+	+	+	±	2019-nCoV 阳性
如果三个目标基因中只有一个或两个为阳性			±	无法判定
-	-	-	+	2019-nCoV 阴性
-	-	-	-	结果无效

## 检测局限性

- 在进行实验之前，应该对分析人员进行培训，并熟悉测试程序和结果解释。
- 如果标本采集，运输和处理不当，会导致标本中病毒载量不足而出现假阴性结果。
- RNA 病毒显示出很大的遗传变异性。尽管已努力针对病毒基因组保守区域进行 rRT-PCR 方法的设计，但病毒变异仍会导致引物和探针与靶序列之间的错配，从而影响该方法的准确性，可能导致假阴性结果。

## 联系信息

如有相关的建议和问题，请联系：[respvirus@cdc.gov](mailto:respvirus@cdc.gov).