

白色念珠菌核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：白色念珠菌核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

25 人份 / 盒，50 人份 / 盒，100 人份 / 盒。

【预期用途】

本试剂盒对人阴道分泌物，痰液和尿液样本中的白色念珠菌（*Candida albicans*）DNA 进行体外荧光 PCR 定性检测。

白色念珠菌又称白假丝酵母菌，是一种真菌，通常存在于正常人口腔、上呼吸道、肠道及阴道，是人体正常菌群，当人体的正常防御功能受损时刻导致内源性感染，可引起严重的白色念珠菌病。本试剂盒可用于临床对白色念珠菌感染的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，利用特异性引物和荧光标记探针，对白色念珠菌的特异性 DNA 核酸片段进行荧光检测。

【主要组成成分】

序号	组分	包装规格		
		25 人份	50 人份	100 人份
1	核酸抽提液	1.4mL×2	1.4mL×4	1.4mL×8
2	白色念珠菌核酸荧光 PCR 检测混合液	972μL×1	936μL×2	1400μL×3
3	酶（Taq+UNG）	10.8μL×1	20.8μL×1	58μL×1
4	白色念珠菌阴性对照品	200μL×1	400μL×1	1000μL×1
5	白色念珠菌阳性对照品	200μL×1	400μL×1	1000μL×1
6	白色念珠菌内标	30μL×1	60μL×1	110μL×1

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】

试剂盒应在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，试剂开封后请于 2 个月内使用。生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；SLAN 荧光 PCR 检测系统及相应软件。

【样本要求】

1. 阴道分泌物：阴道分泌物采集前 24h 内禁止性交，盆浴。阴道灌洗和局部上药等。一般用无菌棉拭子自阴道深部或阴道穹隆后部、宫颈管口等处取样，将棉拭子置入无菌玻璃管，用无菌棉球将试管塞紧后，密闭送检。
2. 痰液：用无菌 5mL 玻璃试管取受检者肺部咳出痰液 1-3mL，密封送检。

3. 尿液：留取中段晨尿约 20mL，密闭送检。

样本可立即检测，或在 2℃~8℃可保存 7 天，长期保存应置于≤-20℃条件下，避免反复冻融。

样本运输采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封运输。

【检验方法】

1. PCR 前处理

A. 手工法

(1) 标本、对照品的核酸裂解处理

冻存样本和对照品请在室温融解，充分混匀后使用。

① 试剂盒自带提取试剂

核酸抽提液*配制：取 $N \times 100\mu\text{L}$ 核酸提取液与 $N \times 1\mu\text{L}$ 内标混匀， $N = \text{样本数} + \text{对照品数}$ 。

- 阴道分泌物**：试管中加入 1mL 无菌生理盐水，充分震荡摇匀，吸取液体转至 1.5mL 离心管中（如分泌物较多，只取 0.2mL）13,000rpm 离心 5 分钟。沉淀加无菌生理盐水 1mL 混匀，13,000rpm 离心 5 分钟，再重复洗涤一次。沉淀直接加入 100 μL 核酸抽提液*充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13,000rpm 离心 10 分钟，取上清 4 μL 作为 PCR 反应模板。
- 痰液**：痰液中加入 4 倍体积的 4%NaOH（自备），摇匀，室温下放置 30 分钟液化，取 0.5mL 样品至 1.5mL 离心管中，再加入 0.5mL 4%NaOH 室温放置 10 分钟后 13000rpm 离心 5 分钟。沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，13000rpm 离心 5 分钟；再重复洗涤一次。去尽上清，沉淀直接加入 100 μL 核酸提取液*，振荡 10 秒，99℃干浴或水浴 10 分钟，13000rpm 离心 10 分钟，取上清 4 μL 作为 PCR 反应模板。
- 尿液**：吸取 1mL 尿液至 1.5mL 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清液，沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，13000rpm 离心 5 分钟，弃去上清。沉淀直接加 100 μL 核酸抽提液*，振荡 10 秒，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13000rpm 离心 10 分钟，取上清 4 μL 作为 PCR 反应模板。
- 对照品**：取阳性对照品、阴性对照品各 100 μL ，分别加入 100 μL 核酸提取液*后充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13000rpm 离心 10 分钟，取上清 4 μL 作为 PCR 反应模板。

② 其他商品化提取试剂

推荐使用经验证的试剂：上海之江-核酸提取试剂盒（磁珠法）。注意提取时将白念内标按照每人份 1 μL 加入到裂解液中，后续操作按照说明书进行。

(2) 试剂配制

取 $n \times 36\mu\text{L}$ 白念核酸荧光 PCR 检测混合液与 0.4 μL 酶（Taq+UNG）（ n 为反应管数），振荡混匀数秒，13000rpm 离心数秒。

(3) 加样

取上述混合液 36 μL 置于 PCR 管中，然后将样本、阳性对照品、阴性对照品的核酸提取产物各 4 μL 分别加入 PCR 管中，盖好管盖，立即进行 PCR 扩增反应。

B. 自动化法

该试剂盒除手工提取加样外，也可配合上海之江-全自动核酸提取及检测反应体系构建系统使用。具体操作方法按照生产厂商的说明书操作步骤进行。

2. PCR 扩增 反应管置于荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：37℃×2min; 94℃×2min; 再按 93℃×15sec→60℃×60sec，循环 40 次; 单点荧光检测在 60℃。反应体系为 40 μL 。荧光通道检测选择如下：

机型 \ 通道	1	2
ABI 7500	FAM	VIC
CFX96	FAM	VIC
SLAN	通道 1	通道 2

备注：如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

3. **基线和阈值设定** 基线一般情况下设定在 6-15 个循环，具体可根据实际情况调整。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 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** 阴性对照品检测结果应为：FAM 通道 Ct 栏显示 Undetermined（ABI7500）或 N/A（CFX96）或 No Ct（SLAN），且 VIC 通道 Ct 值≤38；阳性对照品检测结果应为：FAM 通道 Ct 值≤35。否则实验视为无效。

5. **试验结果的判断**

在质控品正常的情况下，结果判断如下：

	通道	Ct 值	结果判断
1	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	样本低于检测限，报告为白色念珠菌阴性
	VIC	≤38	
2	FAM	≤38	报告为白色念珠菌阳性
	VIC	——（见注 1）	
3	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	PCR 反应受到抑制或提取不当，需要重复试验。
	VIC	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	

待检样本 Ct 值在 38~40 之间，则需对核酸提取产物进行重复检测，如仍在 38~40 之间，则判为低于检测限，报告为阴性。

注 1：对于 FAM 通道具有明显 S 型扩增曲线（Ct≤38）的样本，其 VIC 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线（Ct≤38），也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或 No Ct。

【阳性判断值】

根据临床样本检测结果绘制 ROC 曲线，确定本试剂盒的阳性判断值为 Ct=38。

【检验结果的解释】

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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测时可能会发生假阴性的结果；不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果。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，出现假阴性的结果。

【检验方法的局限性】

当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检出限 1×10³copies/mL 时可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒最低检出限：1×10³copies/mL。
2. 分析特异性：本试剂盒与肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、A 组链球菌、B 组链球菌、淋球菌、解脲支原体、沙眼衣原体、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、生殖支原体、肺炎支原体、肺炎衣原体、人型支原体、新型隐球菌、金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、梅毒螺旋体、大肠杆菌、阴道加德纳菌、阴道毛滴虫、克柔念珠菌、光滑念珠菌、假热带念珠菌、季也蒙念珠菌无交叉反应。
3. 精密度：用高、低两个浓度的 BN 精密度参考品进行检测（n=10），检测结果 Ct 值的变异系数（CV，%）均<5%。
4. 抗干扰能力：粘蛋白、血液、伊曲康唑、伏立康唑、氟胞嘧啶、氟康唑、克霉唑、阿尼芬净、米卡芬净和制霉菌素不会对该产品的检测产生干扰。
5. 型别验证：对白色念珠菌基因型 A、基因型 B、基因型 C 检测，得出分析灵敏度均可达到 1×10³ copies/mL。
6. 企业阳性参考品：企业阳性参考品检测结果均为阳性，阳性符合率 5/5。
7. 企业阴性参考品：企业阴性参考品检测结果均为阴性，阴性符合率 5/5。
8. 临床试验：共检测 985 例样本，以细菌培养法为参比方法的阳性符合率为 98.02%（199/203）、阴性符合率为 98.73%

(235/238)、总符合率为 98.41% (434/441)。以已批准同类产品试剂盒为参比方法的阳性符合率为 100% (130/130)、阴性符合率为 99.75% (413/414)、总符合率为 99.82% (543/544)。

【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；标本处理、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. 试剂准备和标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. 实验中接触过标准品和对照品的废弃物品(如吸头)、扩增完毕的离心管、标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] M. Flahaut, D. Sanglard, et al. Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Samples by DNA Amplification of Common Regions from *C. albicans*-Secreted AsparticProteinase Genes. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 36, Feb. 1998, p. 395 - 401.
- [2] 沈建箴, 吕联煌等. 血液病念珠菌感染基因扩增检测技术建立及临床应用. Chin J Nosocomiol Vol. 13 No. 102003.

【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

医疗器械生产企业许可证编号：沪药监械生产许 20081591 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20173403286

【说明书核准及修改日期】2023-3-1