



白色念珠菌核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 说明书

【产品名称】

通用名称: 白色念珠菌核酸检测试剂盒(荧光PCR法)

【包装规格】

48人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定检测临床痰液和创口拭子样本中白色念珠菌核酸。

念珠菌是一种芽生的酵母状真菌, 革兰氏染色阳性, 是一种条件致病菌。大约25%~50%健康人的口腔、阴道、消化道可带有念珠菌。当机体免疫功能下降时念珠菌可侵入人体许多部位, 可引起皮肤念珠菌病、粘膜念珠菌病、内脏及中枢神经念珠菌病, 白色念珠菌是念珠菌中主要的致病菌。本试剂盒可用于白色念珠菌感染的辅助诊断及疗效监控。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应(PCR)及荧光标记探针技术, 快速检测临床样本中白色念珠菌(简称白念, *Candida albicans*, CA) 特定基因(ERG11), 从而判断白色念珠菌的存在。该试剂盒中使用尿嘧啶-N-糖基化酶和dUTP, 有助于避免扩增产物污染。

【主要组成成分】

组成成分	规格和数量	主要成分
10×浓缩清洗液 A	5mL×1 瓶	氢氧化钠溶液(NaOH)等
10×浓缩清洗液 B	10mL×1 瓶	三羟甲基氨基甲烷与盐酸的混合溶液(Tris-HCl)和乙二胺四乙酸(EDTA)
DNA 提取液	5mL×1 瓶	表面活性剂(NP-40)、聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)等
提取固形物	48 管	/
CA-PCR 反应液	1.1mL×2 管	缓冲液(Buffer)、探针、引物、氯化镁(MgCl ₂)、脱氧核糖核苷酸(dNTP)
Taq DNA Polymerase (5U/μL)	25μL×1 管	/
Uracil NGlycosylase (1U/μL)	10μL×1 管	/
内参照	1mL×1 管	含有内参照基因的质粒
阴性对照 (CA)	1mL×1 管	三羟甲基氨基甲烷与盐酸的混合溶液(Tris-HCl)和乙二胺四乙酸(EDTA)
阳性对照 (CA)	1mL×1 管	含有目的基因的质粒

注: 阳性对照品为含目的基因质粒, 目的基因来自美国菌种保藏中心(ATCC)的原始菌株。

【储存条件及有效期】

储存条件: -20℃保存, 有效期8个月。

开封后放置于2-8℃保存, 请于一周内使用; 避免反复冻融(冻融次数少于5次)。

运输条件: 低温运输, 长途运输应使用冰袋。

生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500、STRATAGENE Mx3000P荧光PCR仪。

【样本要求】

1. 适用标本类型: 痰液、创口拭子。

2. 标本采集:

2.1 痰液: 清晨从肺深部咳出的痰液, 用无菌玻璃管收集1-3mL, 密闭送检。标本采集前24小时内禁止使用呼吸道外用药物(药膏、喷剂、滴剂)。

2.2 创口拭子: 无菌拭子采集分泌物标本后放回无菌拭子套管中送检, 标本在室温下保存不应超过1天, 在4~8℃保存不超过6天。标本采集前24小时内禁止使用任何外用药物(药膏、喷剂、滴剂)。

【检验方法】(使用前请仔细阅读本操作流程)

1. 试剂准备(试剂准备区)

1.1 取10×浓缩清洗液A和10×浓缩清洗液B, 用无菌纯化水按1: 9(体积比)分别进行稀释得到清洗液A和清洗液B, 放于4℃冰箱中备用。

1.2 将Taq DNA Polymerase和Uracil NGlycosylase(UNG)进行瞬时离心后, 放于-20℃冰箱中备用。

1.3 确定需要进行的反应管数(样本数+阴性、阳性对照)后, 取出CA-PCR反应液, 将n×44.3μL CA-PCR反应液, n×0.5μL Taq DNA Polymerase和n×0.2μL Uracil NGlycosylase(UNG)加入一个离心管中并震荡混匀, 瞬时离心后, 向每一个PCR反应管中分装45μL, 盖紧管盖后转移到加样区, 避光放4℃冰箱备用。

1.4 将提取固形物及阳性对照、阴性对照、内参照转移到样本处理区, 放于4℃冰箱中备用。

2. 样本处理

2.1 痰液

2.1.1 向玻璃管中加入4倍体积的1×清洗液A, 摇匀, 室温放置15-30min待液化;

2.1.2 取液化后的标本1mL至1.5mL离心管, 13000r/min离心5min;

2.1.3 弃上清, 沉淀加清洗液B 1mL混匀, 13000r/min离心5min;

2.1.4 弃上清, 沉淀加清洗液B 1mL混匀, 13000r/min离心5min;

2.1.5 弃上清, 沉淀中加入100μL DNA提取液, 备用。

2.2 损伤分泌物拭子

2.2.1 加入1mL清洗液B 1mL(保证清洗液能没过无菌拭子取样部位), 将标本管用震荡器高速震荡2min制成标本悬液。

2.2.2 取出全部悬液放入1.5mL离心管中, 13000r/min离心5min弃上清,

2.2.3 加入1mL清洗液B震荡重悬, 13000r/min离心5min弃上清。

2.2.4 加入100μL DNA提取液将沉淀重悬。

3. DNA提取(样本处理区)

3.1 检测样本制备:

向上述处理好的各样本管中分别加入1管提取固形物(轻弹管底尽量将固形物倒净), 用强力震荡器(如美国BioSpec Mini-Beadbeater-16或Vortex-Genie)高速涡旋震荡5min, 瞬时离心, 加入20μL内参照。

3.2 阴性对照样本制备: 取出阴性对照, 8000r/min离心数秒, 吸取100μL至1.5mL灭菌离心管中, 加入20μL内参照。

阳性对照样本制备: (同阴性对照)

3.3 将待测样本、阳性对照样本和阴性对照样本瞬时离心后95℃干浴2min, 即刻冰浴2-5min后13000r/min离心1min; 上清液用于PCR扩增。

4. 加样(样本处理区或者加样区)

检测反应: 向准备好的PCR反应液管中分别加入5μL待测样本或阴性对照样本或阳性对照样本, 盖紧管盖后瞬时离心。

5. PCR扩增(检测区)

将准备好的PCR反应管放置于PCR仪上, 编辑样本信息并按下列条件进行扩增反应:

循环参数:	Stage 1	37℃---2min:	CA 检测荧光素: FAM 内参照荧光素: Texas Red 反应体积: 50μL 荧光信号收集: Stage 4 55℃ 45sec
	Stage 2	94℃---2min:	
	Stage 3	94℃---20sec	
	Stage 4	55℃---45sec	

【阳性判断值】

利用仪器配套软件进行自动分析, 得到各样品白念(FAM) Ct值:

1	样品 (FAM) Ct 值 ≤ 23 , 且有较好的对数增长曲线	阳性结果
2	样品 (FAM) Ct 值=30 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参照 (Texas Red) Ct 值 ≤ 30 , 且有较好的对数增长曲线。	阴性结果 (低于检测下限)
3	样品 (FAM) $23 < \text{Ct 值} < 30$	灰区。 应重复检测2次
		重复检测2次, Ct 值=30, 阴性结果 重复检测2次, 至少1次Ct 值 < 30 且有较好的对数增长曲线, 判定为疑似阳性结果, 建议临床上重新取样检测或采用其它检测手段进行检测。

【检验结果的解释】

1. 结果分析条件设定

- 1.1 ABI 7500基线 (baseline) 设定: 取2个到最小Ct值前3个循环值作为基线, 阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点, 即Ct=30或者 “Undet.” 为准。
- 1.2 STRATAGENE Mx3000P基线设定: 选择 “适合基线 (Adaptive baseline)” 设定时的荧光信号, 阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点, 即Ct=30或者 “No Ct” 为准。

2. 质控标准

本试剂盒阴阳性对照应同时满足以下条件, 否则本次实验视为无效。

- 2.1 阴性质控: 白念 (FAM) Ct值=30或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参照 (Texas Red) Ct值 ≤ 30 。
- 2.2 阳性质控: 白念 (FAM) Ct值 ≤ 23 , 且有较好的对数增长曲线; 内参照 (Texas Red) Ct值 ≤ 30 。

3. 结果判定

- 3.1 白色念珠菌阴性 (低于检测下限): 白念 (FAM) Ct值=30或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参照 (Texas Red) Ct值 ≤ 30 。
- 3.2 白色念珠菌阳性: 白念 (FAM) Ct值 ≤ 23 , 且有较好的对数增长曲线; 内参照 (Texas Red) Ct值 ≤ 30 。
- 3.3 反应无效, 应重新测定: 建议重新测定: 白念 (FAM) Ct值=30或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参照 (Texas Red) Ct值=30或者 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500)。

3.4 样本检测灰度区: 白念 (FAM) $23 < \text{Ct}_{\text{样本}} < 30$, 因检测核酸浓度较低, 且实验存在系统及人为不确定性因素, 建议重复检验确认。

本检测结果仅供临床参考, 不作为白色念珠菌感染治疗的唯一依据; 阴性结果仅说明低于本试剂盒的检测限值但不能完全排除白色念珠菌感染的可能; 阳性结果建议结合其它检测结果及病人临床症状综合考虑。

【检验方法的局限性】

本试剂盒适用于检验临床样本, 产品检测的灵敏度和特异性结果也取决于检测仪器及对仪器的正确使用; 检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

本试剂盒的检测下限为: $1 \times 10^3 \text{ copies/mL}$; 检测范围: $1.0 \times 10^8 \text{ copies/mL} \sim 1.0 \times 10^3 \text{ copies/mL}$ 。

本产品经实验证明不会与临床常见其他各类病原体 (B族链球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、肺炎链球菌、藤黄微球菌、蜡样芽孢杆菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、牛链球菌、铜绿假单胞菌、近平滑假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、丘陵假丝酵母、季也蒙假丝酵母、清酒假丝酵母、乳酒假丝酵母、间型假丝酵母、罗伦隐球酵母、烟曲霉、黑曲霉、黄曲霉、光滑假丝酵母、热带假丝酵母) 产生交叉反应。

本产品批内差及批间差CV值均小于10%。

在对白色念珠菌的临床标本检测中, 本产品与细菌培养和自动化微生物鉴定系统的符合率达95%以上, 符合临床使用要求。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 请在实验前详细阅读说明书, 实验需由有经验或经过培训的实验人员进行操作。
3. 取用PCR反应管需戴无粉乳胶手套或薄膜手套。
4. PCR反应液内有酶及荧光探针, 应避免反复冻融且需避光保存。
5. 试剂盒内各试剂使用前, 需充分融化后进行瞬时离心, 以使管壁上液体离心到管底。
6. 实验过程中使用的离心管和移液器吸头需经高温高压灭菌或经过相应处理。
7. 临床样本的处理需要在生物安全柜中进行。
8. PCR反应管经瞬时离心后, 上机前避免振摇。
9. 吸取模板时, 应避免吸到提取固形物。
10. 完成加样后建议用石蜡进行封液并尽快盖紧管盖。
11. 扩增完毕后, 待PCR扩增仪中温度降至室温后再将PCR反应管取出, 并装入密闭的塑料袋中, 按医疗废弃物处理。
12. 实验中使用的吸头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废液缸内, 并与其它废弃物一同灭菌消毒。
13. 每次实验前, 生物安全柜需进行紫外灯消毒。实验完成后, 生物安全柜和移液器均需用10%的84消毒液擦拭, 10分钟后再用70%的乙醇擦拭。
14. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
15. 请按照卫生部临床基因扩增检验实验室区域设置原则, 对实验室严格进行区域划分: 试剂配置室、样本制备室、核酸扩增室。

【参考文献】

《体外诊断试剂说明书编写指导原则》, SFDA发布。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 泰普生物科学 (中国) 有限公司

住所: 厦门市同安区西洲路2043号11层

联系方式: 0592-3737666 咨询热线: 400-7032032 网址: www.tibchina.com

售后服务单位: 泰普生物科学 (中国) 有限公司

联系方式: 0592-3737666 咨询热线: 400-7032032 网址: www.tibchina.com

生产地址: 厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元; 2045号101、201、501单元

邮政编码: 361116

生产许可证编号: 闽药监械生产许20110184号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20153400270

【说明书核准日期及修改日期】2015年02月11日批准; 2017年10月27日修改; 2018年03月15日修改;

2020年02月16日修改; 2020年03月18日修改; 2022年06月07日修改。