

曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒，48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌的核酸 DNA。

本试剂盒用于肺部曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌真菌感染的辅助诊断，不能单独作为确诊的依据。

适用人群主要为免疫低下、免疫缺陷人群，其他人群应有肺部真菌感染相关指征。

真菌感染常见于免疫低下或缺陷人群，具有较高的发病率和死亡率，其临床症状表现不具有特异性，易被细菌、病毒等感染掩盖，临床上致病菌包括曲霉菌属、隐球菌、耶氏肺孢子菌等，检测多重真菌可用于辅助临床诊断。

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。

该产品检测阳性不能确定标本中有活病原菌，检测结果应结合其他临床诊断综合判断。

本产品对于曲霉菌属的检测不能确认具体菌种，如有必要临床应考虑对于曲霉菌属阳性结果进一步确认感染的菌种。

【检验原理】

本试剂盒分别选取曲霉菌属 18S rRNA 基因、新型隐球菌 ITS 基因和耶氏肺孢子菌 mtLSUrRNA 基因中保守的区域设计特异性引物和探针，在样本 DNA 核酸纯化之后采用荧光 PCR 对 DNA 进行检测。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，PCR 扩增过程中，探针与模板结合，其 5'端报告基团被 Taq 酶 5'→3'外切核酸酶活性切断，使报告基团远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值（每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数）。曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌荧光标记分别为 FAM、VIC、CY5。

本试剂盒反应体系含有 dUTP-UDG 防污染措施，避免操作产生的假阳性结果；采用内源性内标质控体系，通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程进行监控，避免检测结果的假阴性，内标基因选择人源管家基因 RP，荧光标记为 ROX。

【主要组成成分】

序号	组分名称	组成成分	规格及数量	
			24 人份	48 人份
1	核酸扩增反应液	Tris-HCl, KCl, Mg ²⁺ , dN (U) TP Mix, Buffer 缓冲液, 耐热 DNA 聚合酶, 尿嘧啶-DNA 糖基化酶	840 μL ×1 管	840 μL ×2 管
2	引物探针混合液	曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌及内标特异性基因的引物及探针	120μL ×1 管	240 μL ×1 管
3	阴性对照	无核酸酶水	400 μL ×1 管	400 μL ×1 管
4	阳性对照	含曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌和内标基因片段的灭活工程菌	400 μL ×1 管	400 μL ×1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

需要但未提供试剂：

序号	名称	生产企业	备案号
1	核酸提取试剂	北京卓诚惠生物科技股份有限公司	京昌械备 20200008 号
2	核酸提取试剂	北京卓诚惠生物科技股份有限公司	京昌械备 20200083 号

【储存条件及有效期】

-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月。

开瓶后置于 2-8℃保存，有效期为 15 天。避免反复冻融（冻融次数不得超过 7 次）。

采用泡沫箱加干冰密封运输或冷链运输，运输温度不高于-10℃，

运输时间不宜超过 5 天。

生产日期和失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1、样本采集

采用无菌痰液样本收集盒。患者留取的痰液样本，应由检验人员或经培训的专业人员目视检查样本质量：样本量一般在 3~5mL，样本形状为干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液的血痰、粘液痰等为合格的样本；痰液样本不合格，如实际为唾液样本，应在专业人员的进一步指导取样后重新送检。

2、样本保存条件

样本应尽快检测，2~8℃条件下可以保存 72 小时，-20±5℃条件下可以保存 12 个月，在-90~-70℃条件下可保存 24 个月。冻存的样本反复冻融后应充分混匀，避免 5 次以上反复冻融。提取后的核酸可于-20±5℃条件下保存 12 个月，反复冻融不超过 5 次。

【检验方法】

将试剂盒所需组分取出，室温融化，短暂震荡，瞬时离心。

一、样本处理（样本处理区）

1、样本前处理

NaOH 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~2 倍体积（1 倍体积约 3~5mL）4%NaOH 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 15~20 分钟，使痰液充分液化。

DTT 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~2 倍体积（1 倍体积约 3~5mL）0.1%DTT 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 30 分钟，使痰液充分液化。

任选其中一种方法，均可用于样本前处理。

2、样本提取

使用推荐的核酸提取试剂，取阳性对照、阴性对照和处理后的待测样本各 200μL 进行提取，具体提取步骤请参照相应提取试剂说明书。

二、试剂配制（试剂准备区）

确定反应数 N，N=待检样本数(n)+阳/阴性对照(2)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算方法如下表。取无菌离心管配制反应体系，试剂全部加入后震荡混匀，瞬时离心，分装 40μL 至各 PCR 反应管中。

试剂盒组分	反应体系
核酸扩增反应液	35μL×N
引物探针混合液	5μL×N
总体积	40μL×N

体系分装：将上述反应液混匀离心后，按照每管 40μL 分装于荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

三、加样（样本处理区）

加入 10μL 提取的样本 DNA、阳性对照和阴性对照溶液到 PCR 反应管中，不要混匀，盖紧 PCR 反应管管盖，瞬时离心将管壁上液体全部甩到管底，然后立即进行 PCR 扩增反应。

四、PCR 扩增检测（扩增检测区）

检测通道：曲霉菌属选择 FAM 通道，新型隐球菌选择 VIC 通道，耶氏肺孢子菌选择 CY5 通道，内标选择 ROX 通道。ABI 7500 仪器中“Quencher Dye”和“Passive Reference”均设置为 None。按照样本对应顺序设置阳性对照（Positive Control）、阴性对照（Negative Control）和样本（Unknown），并设置样本名称。

序号	阶段	温度（℃）	时间	循环数
1	预反应	50	2 分钟	1
		95	5 分钟	
2	变性	95	15 秒	40
	退火，延伸，采集信号	60	45 秒	
3	仪器冷却	12	1 分钟	1

五、阈值设定

PCR 反应结束后, 根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时, 基线设定在 3~15 之间, 阈值线设定视不同仪器相对荧光值而定。单击分析即可得到各检测样本的 Ct 值。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。

六、实验有效性判断

(1) 阳性对照: FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道有 S 型扩增曲线, 阳性对照 Ct 值≤33.7。

(2) 阴性对照: FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道无 S 型扩增曲线, Ct 显示为 Undetermined。

注: 条件 (1) (2) 必须在同一次实验中全部满足, 否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

检测样本曲霉菌属 Ct≤33.7 为阳性, Ct>33.7 为阴性; 检测样本新型隐球菌及耶氏肺孢子菌 Ct≤36 为阳性, Ct>36 为阴性。

【检验结果的解释】

1、如果内标通道出现 S 型扩增曲线, 并具备如下条件, 判为阳性:

通道	Ct 值	结果判读
FAM	Ct≤33.7	曲霉菌属阳性
VIC	Ct≤36	新型隐球菌阳性
CY5	Ct≤36	耶氏肺孢子菌阳性

注: 对于 FAM、VIC 和 CY5 通道具有明显 S 型扩增曲线的样本, 其内标通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线, 也可能因为高浓度样本的抑制作用而导致内标通道无 S 型扩增曲线, 属正常情况。

2、如果内标通道出现 S 型扩增曲线 (Ct≤36), 同时 FAM、VIC 和 CY5 通道检测无 S 型扩增曲线 (或曲霉菌属 Ct>33.7, 新型隐球菌及耶氏肺孢子菌 Ct>36), 则判定对应目标结果为阴性。

3、如果 FAM、VIC 和 CY5 通道及内标通道均未出现明显的 S 型扩增曲线 (或曲霉菌属 Ct>33.7, 新型隐球菌、耶氏肺孢子菌及内标 Ct>36), 原因分析及建议:

- 3.1 未采集到足够的人细胞, 建议重新采样检测;
- 3.2 核酸提取过程异常, 导致核酸损失, 建议重新提取检测;
- 3.3 样本中存在抑制 PCR 反应的物质, 可对样本进行稀释后检测。
- 4、如检测的样本类型为培养物或工程菌等, 对内标的检测可不作要求。

【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、本试剂盒中内标靶基因为人的管家基因, 实验室的耗材容易被人体表面携带的核酸污染, 可能导致试剂盒中空白对照的 ROX 通道有扩增。
- 3、实验区域样本或者核酸污染有可能造成假阳性结果。
- 4、不合理样本采集、转运及处理, 检测样本中被检测核酸浓度含量低于最低检出限时均有可能导致假阴性结果。
- 5、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。

【产品性能指标】

- 1、曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌最低检出限: 1500 copies/mL。
- 2、精密性: 使用 3 批试剂盒连续 20 天, 每天由 2 名操作人员在两个不同的实验室对企业精密性参考品及临床样本进行重复检测, 日内/批内、日内/批间、批内/日间、室间/不同操作者精密度 Ct 值变异系数 (CV, %) 均≤5.0%, 重复性良好。
- 3、对企业阳性参考品和阴性参考品的检测: 检测 18 份企业阳性参考品阳性符合率 (+/+) 为 18/18; 16 份企业阴性参考品阴性符合率 (-/-) 为 16/16。
- 4、交叉反应: 本试剂盒白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、毛霉、少根根霉、伞枝犁头霉、总状毛霉、马尔尼菲青霉菌、斜卧青霉、草酸青霉、卡氏肺孢子菌、兔肺孢子菌、瓦氏肺孢子菌、鼠肺孢子菌、无壳散囊菌、荚膜组织包浆菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、唾液链球菌、肺炎链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、表皮葡萄球菌、流感嗜血杆菌、纹带棒杆菌、大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、乳酸杆菌、鲍曼不动杆菌、无毒结核分枝杆菌、卡他莫拉菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜肺军团菌、洋葱伯克霍尔德菌、诺卡菌、粘质沙雷菌、奈瑟氏菌属、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、鹦鹉热衣原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、偏肺病毒、肠道病毒、冠状病毒、博卡病毒、水痘带状疱疹病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、HIV、肺癌患者样本验证均无非特异扩增。
- 5、干扰物质: 血液、唾液在样本中的浓度不高于 15% 时, 对检测结果无显著影响; 针对治疗真菌感染或其他相关疾病的常见药物如: 两性霉素 B (4mg/L)、卡泊芬净 (12.4mg/L)、米卡芬净 (13μg/mL)、伏

立康唑 (4μg/mL)、伊曲康唑 (0.5μg/mL)、氟胞嘧啶 (40μg/mL)、他克莫司 (15μg/L)、麦考酚酸 (30mg/L)、替诺福韦 (1mg/L)、地塞米松 (20ng/mL)、甲强龙 (500ng/mL)、多西他赛 (10μg/mL)、培美曲塞 (200μg/mL)、二甲双胍 (3μg/mL)、阿卡波糖 (100μg/mL)、PD-1 (60μg/mL) 进行验证, 未对检测结果产生显著影响。

6、包容性: 对曲霉菌属中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、米曲霉、土曲霉、构巢曲霉; 耶氏肺孢子菌; 新生隐球菌格鲁比变种、新生隐球菌新生变种、新生与格鲁比变种杂合体、格特隐球菌进行验证, 均正常检出。

7、临床试验结果: 本试剂在四家临床机构完成了临床试验, 与 Sanger 测序方法比对研究, 曲霉菌属共完成 593 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 98.81%, 总体符合率为 99.16%; 新型隐球菌共完成 594 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 99.61%, 总体符合率为 99.66%; 耶氏肺孢子菌共完成 591 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 99.29%, 阴性符合率为 98.67%, 总体符合率为 98.82%。与真菌分离培养鉴定/镜检法对比研究, 曲霉菌属共计入组分离培养鉴定阳性样本 45 例, 阳性检出率 100%; 新型隐球菌共计入组分离培养鉴定阳性样本 34 例, 阳性检出率 100%; 耶氏肺孢子菌共计入组镜检法阳性样本 35 例, 阳性检出率 100%; 与临床参考标准比对研究, 曲霉菌属共计入组确诊/临床诊断病例 87 例, 阳性检出率为 93.10%; 新型隐球菌共计入组确诊/临床诊断病例 34 例, 阳性检出率为 88.24%; 耶氏肺孢子菌共计入组确诊/临床诊断病例 62 例, 阳性检出率为 70.97%。

【注意事项】

1. 开始检测前请仔细阅读本说明书, 本品仅用于体外诊断。
2. 检测结果的临床解读应结合其他临床诊断综合判断。
3. 本试剂盒不含有活性人或动物源性物质, 试剂盒中的阳性质控品是灭活的工程菌, 无传染性, 但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
4. 使用本产品时, 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备, 有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。对操作人员进行培训, 严格按照说明书要求进行操作。
5. 样本处理在生物安全柜内进行操作, 防止污染环境和保护操作者。
6. 实验后的废弃物, 如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。加样本吸头用后打入盛有 1% 次氯酸的废物缸里。实验完毕后使用 1% 次氯酸或 75% 乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面, 然后紫外灯照射 25-30 分钟。

【参考文献】

1. 《病原微生物实验室生物安全通用准则 (WS233-2017)》
2. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发 (2010) 194 号
3. 《医疗废物管理条例》中华人民共和国国务院令 (第 380 号)
4. Travis H, Peter C. Iyen, et al. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2[J]. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2000, p. 1510-1515.
5. Thomas G. Mitchell, et al. Unique Oligonucleotide Primers in PCR for Identification of *Cryptococcus neoformans*[J]. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1994, p. 253-255.
6. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification[J]. MEDICAL SCIENCE, 1990;336:451-453.

【基本信息】

注册人/生产企业名称:

住所:

联系方式:

售后服务单位名称:

联系方式:

生产地址:

【医疗器械生产许可证编号】

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书批准及修改日期】