



团 体 标 准

T/CSCB 0028—2024

细胞及其辅助试剂中细菌、真菌检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法

Testing for bacteria and fungi in cells and ancillary reagents—
TaqMan quantitative PCR assays

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 检测环境 1

6 主要试剂和耗材 2

7 仪器设备 2

8 检测 3

9 结果判定 4

10 记录和报告..... 5

11 生物安全要求..... 5

12 废弃物处理和防止污染措施..... 5

附录 A（资料性） 公开报道细菌广谱检测引物探针序列示例 6

附录 B（资料性） 公开报道真菌广谱检测引物探针序列示例 7

附录 C（资料性） 检出限研究方案 8

参考文献 10

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：北京泽辉辰星生物科技有限公司、北京干细胞与再生研究院、中国科学院动物研究所、中国计量科学研究院、北京工商大学、中国医学科学院医学实验动物研究所、北京昭衍药物检定研究有限公司、深圳华大生命科学研究院（国家基因库）、中国食品药品检定研究院、苏州大学、中国测试技术研究院生物研究所、中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）、广东省中医院（广州中医药大学第二附属医院）。

本文件主要起草人：曹佳妮、徐然然、魏军、张愚、赵同标、傅博强、郝捷、王磊、马爱进、魏强、饶春明、李启沅、纳涛、赵红玲、胡士军、周李华、张维绮、陈曲波、孙思明、刘增姝、牛帅帅、张媛媛、张婷婷、甘一迪、王淑艳。



细胞及其辅助试剂中细菌、真菌检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法

1 范围

本文件规定了细胞及其辅助试剂中细菌、真菌检测 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的检测环境、主要试剂和耗材、仪器设备、检测、结果判定、记录和报告、生物安全、废弃物处理和防止污染措施的相关要求。

本文件适用于细胞及其辅助试剂中细菌、真菌检测的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 19489 实验室 安全通用要求

GB/T 40365 细胞无菌检测通则

GB/T 42077 生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 法

GB/T 42753 实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则

WS/T 230 实时荧光聚合酶链反应临床实验室应用指南

中华人民共和国药典(2020 年版 四部)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

辅助试剂 ancillary reagents

用于细胞制备,直接接触细胞的试剂。

注:如基础培养基、消化酶、细胞冻存液、缓冲液、培养添加组分(血清、血清替代物、非必需氨基酸、生长因子、转铁蛋白、谷氨酰胺等)等试剂。

4 原理

以细菌 16S rRNA、真菌 18S rRNA 基因保守序列为扩增靶标,使用通用引物和探针,进行实时荧光 PCR 反应,根据检测样本和对照的扩增曲线和 Ct 值判定样本是否存在细菌及真菌污染。

5 检测环境

暴露样品、检测试剂的试验操作应在无菌超净台或生物安全柜或隔离器中进行,整体环境宜至少为 CNC 级。

注:暴露样品、检测试剂的试验操作包括不限于样品采集、核酸提取、相关试剂及反应体系配置。

6 主要试剂和耗材

6.1 试验用水

应为无菌、无核酸酶的超纯水。

6.2 核酸提取纯化试剂盒

6.2.1 应适用于细胞培养过程中培养试剂、质控样品和细胞样品中细菌、真菌的提取,且宜对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、真菌等基因组提取样品前处理操作相同。试剂盒中的提取试剂与耗材应经过无菌化处理。

注:核酸提取纯化试剂盒的微生物裂解效率与核酸提取效率是影响方法检出限的关键因素。

6.2.2 应经过以无菌水为样本的空白提取对照扩增测试,且测试结果 C_t 值应 ≥ 30 。

6.3 qPCR 预混液

应经过以无菌水为模板的阴性扩增测试,且测试结果 C_t 值应 ≥ 30 。

6.4 引物和探针

6.4.1 分别针对细菌 16S rRNA、真菌 18S rRNA 基因保守序列设计引物和探针序列,且设计原则、目的基因扩增长度、特异性评估应满足 GB/T 42077 中的相关要求。引物和探针设计时宜充分考虑细菌真菌种属的覆盖范围。已公开的引用探针序列见附录 A 与附录 B。

6.4.2 合成引物和探针加无菌、无核酸酶的超纯水配制成 $100\ \mu\text{mol/L}$ 储备液。

6.4.3 如使用多重 PCR 进行无菌检测时,可通过设置不同的荧光基团标记的细菌探针和真菌探针进行检测。

注:荧光基团的波长范围呈正态分布的,有一定的带宽,不同荧光基团的荧光信号会有一定的交集,因此,在同时选择多个荧光基团时,要注意尽量选择波长差距较大的荧光基团,避免不同荧光通道之间的互相干扰。

6.5 阳性质控

可使用灭活的标准菌株,标准菌株基因组 DNA,靶标扩增序列的质粒标准物质或具有同等效果的商品化产品。

6.6 离心管

无菌无酶。

6.7 移液枪头

无菌无酶; $10\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$ 。

7 仪器设备

7.1 实时荧光 PCR 仪:应符合 GB/T 42753 的要求,应含有 TaqMan 探针上荧光报告基团的检测通道,应经计量校准,且在计量校准有效期内。

7.2 离心机:最大相对离心力应可达到 $20\ 100\times g$ 。

7.3 生物安全柜或隔离器。

7.4 微量移液器 (2.5 μL 、10 μL 、200 μL 、1 000 μL)：应经计量校准，且在计量校准有效期内。

7.5 旋涡振荡器。

8 检测

8.1 检测操作注意事项

检测操作注意事项，包括但不限于：

- a) 检测人员应穿戴工作区域专用的工作服、一次性无菌乳胶手套、一次性无菌无纺布帽子和医用口罩；
- b) 工作区及环境应经灭菌、去除残留核酸处理，工作台面、移液枪、离心机、旋涡振荡器、离心管架等应使用核酸清除剂、75%酒精全面擦拭消毒，且紫外照射时长至少 1 h；
- c) 枪头、PCR 管、离心管应经过无菌处理，且使用前应经紫外照射至少 1 h；
- d) 宜避免在敞开的离心管、枪头盒、试剂瓶上方操作；
- e) 宜避免快速移动而引起空气湍流；
- f) 打开离心管、枪头盒、试剂瓶时不应触摸容器的内表面。

8.2 取样与样品前处理

8.2.1 供试品的抽样量宜参考《中华人民共和国药典(2020 年版 四部)》1101 无菌检查法的相关要求。

8.2.2 取样和制样应满足相应核酸提取试剂盒中说明书中质控和适用性要求。

8.2.3 待检样品可选用适当的处理方式(如叠氮溴化丙锭法或 WS/T 230 中的光化学灭活法)进行前处理，来降低样品中死菌与残留 DNA 的干扰。

8.2.4 按照核酸提取试剂盒说明书进行供试品和对照组样品的核酸提取。

8.3 对照

8.3.1 阳性提取对照：使用含有灭活细菌阳性质控、灭活真菌阳性质控的样本，从样本处理开始，与供试品平行操作后续检测步骤。

8.3.2 空白提取对照：以无菌水或缓冲液代替样本进行提取，与供试品平行操作后续检测步骤。

8.3.3 阳性扩增对照：以具有良好目的片段扩增性能的核酸溶液(如细菌和真菌的基因组 DNA 或含目的扩增序列的质粒溶液等)为模板进行扩增的反应。

8.3.4 阴性扩增对照：以无菌水或缓冲溶液为模板进行扩增的反应。

8.4 实时定量 PCR 反应

8.4.1 按照扩增试剂说明配置反应体系，反应体积宜 $\geq 20 \mu\text{L}$ /管。每个样品应至少设置 3 个重复。模板宜尽量使用最大上样量。

如使用 $2\times\text{qPCR}$ 预混液和 $50\times\text{ROX}$ 荧光矫正剂，按照表 1 配置反应体系。

表 1 配置反应参考体系

2×qPCR 预混液	10 μL
正向扩增引物 (10 μmol/L)	0.4 μL
反向扩增引物 (10 μmol/L)	0.4 μL
TaqMan 探针 (10 μmol/L)	0.2 μL
50×ROX	0.4 μL
模板	8.6 μL
注：反应体系中各试剂的量能根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。	

8.4.2 根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选扩增试剂的使用说明设置实时荧光 PCR 反应程序参数,包括但不限于反应温度、变温速率、反应时间、扩增循环数、荧光收集条件等。扩增循环数应大于或等于 40 个。

8.5 检出限

- 8.5.1 宜采用在供试品中梯度加标阳性菌株的检测试验来确立检出限(试验方案见附录 C)。
- 8.5.2 宜选取《中华人民共和国药典(2020 年版 四部)》1101 无菌检查法中的阳性菌株与细胞制备环境中的高风险环境菌株为代表菌株进行检出限的测定。
- 8.5.3 影响检出限的因素包括但不限于：
- a) 供试品类型；
 - b) 核酸提取方法；
 - c) 检测引物探针序列；
 - d) 扩增试剂的组分；
 - e) 定量 PCR 检测仪器及其参数设定。
- 当上述因素发生变更时,宜对检出限进行再次试验确认。
- 8.5.4 报告未检出时应附上方法的检测限。

9 结果判定

9.1 质量控制

- 检测对照应满足以下条件,检测试验结果方可成立,出现任一项不符合,则检测试验不成立,需重新进行实时荧光 PCR 扩增：
- a) 阳性提取对照:16S 与 18S 靶标基因检测结果均为阳性,扩增曲线有效且 Ct 值≤30；
 - b) 阳性扩增对照:16S 或 18S 靶标基因检测结果均为阳性,扩增曲线有效且 Ct 值≤30；
 - c) 空白提取对照:16S 或 18S 靶标基因检测结果为未检出,或 Ct 值≥30；
 - d) 阴性扩增对照:16S 或 18S 靶标基因检测结果为未检出,或 Ct 值≥30。

9.2 结果判定与表述

- 结果判定与表述如下。
- a) 测试样品 16S 靶标基因扩增 Ct 值均≥30,且与空白提取对照和阴性扩增对照的 Ct 值相比均无显著差异(t 检验, $P>0.05$)或 Ct 值显著升高(t 检验, $P\leq 0.05$),则可判定该样品的细菌含量在检出限以下。

- b) 测试样品 16S 靶标基因扩增 Ct 值均 <30 ，或与空白提取对照和阴性扩增对照的 Ct 值相比均显著降低(t 检验, $P \leq 0.05$), 则可判定该样品细菌含量在检出限以上。
- c) 测试样品 18S 靶标基因扩增 Ct 值均 ≥ 30 ，且与空白提取对照和阴性扩增对照的 Ct 值相比均无显著差异(t 检验, $P > 0.05$)或 Ct 值显著升高(t 检验, $P \leq 0.05$), 则可判定该样品的真菌含量均在检出限以下。
- d) 测试样品 18S 靶标基因扩增 Ct 值均 <30 ，或与空白提取对照和阴性扩增对照的 Ct 值相比均显著降低(t 检验, $P \leq 0.05$), 则可判定该样品真菌含量在检出限以上。

10 记录和报告

10.1 记录应包括但不限于以下信息：

- a) 样本：类型、批号、来源；
- b) 检测时间、检测地点、检测人员；
- c) 使用的仪器：制造商、型号以及相关的设置；
- d) 试剂：包括名称、来源、批号；
- e) 检测步骤；
- f) 异常情况；
- g) 检测结果及原始数据保存路径。

10.2 报告内容应包括但不限于以下信息：

- a) 样本：类型、批号、来源；
- b) 检测时间、检测地点、检测人员；
- c) 检测方法程序；
- d) 试剂：包括名称、来源、批号；
- e) 使用的仪器：制造商、型号以及相关的设置；
- f) 检测结果与经过验证的方法检出限；
- g) 异常情况。

11 生物安全要求

微生物检测应满足 GB/T 40365 和 GB/T 19489 的要求。

12 废弃物处理和防止污染措施

12.1 废弃物的处理应按照医疗废物的管理条例进行。

12.2 污染的预防和防控措施应按照 WS/T 230 执行。

附 录 A

(资料性)

公开报道细菌广谱检测引物探针序列示例

公开报道细菌广谱检测引物探针序列示例,见表 A.1。

表 A.1 公开报道细菌广谱检测引物探针序列

引物探针名称	引物探针序列(5'-3')	参考资料
16S-AF331 ^F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology, 2002
16S-AR797 ^R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
16S-AT506 ^T	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	
16S-BF349 ^F	AGGCAGCAGTDRGGAAT	Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. Appl. Environ. Microbiol. 2000
16S-BR806 ^R	GGACTACYVGGGTATCTAAT	
16S-BT343 ^T	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACRDAG	
16S-C8F ^F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. J Appl Microbiol. 2008
16S-C535R ^R	CTTTACGCCCARTRAWTC	
16S-CT535 ^T	TNTTACCGCGGCTGCTGGCACG	
16S-DF ^F	AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Detection of bacteria and fungi in blood of patients with febrile neutropenia by real-time PCR with universal primers and probes. J Infect Chemother. 2015
16S-DR ^R	GGACTAC(C/T/A)AGGGTATCTAAT	
16S-DT ^T	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	
PLK1 ^F	TACGGGAGGCAGCAGT	Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections. Microbial Biotechnology, 2019
PLK2 ^R	ATTACCGCGGCTGCT	
GRAM ⁺ ^T	CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG	
GRAM ⁻ ^T	TTACCCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC	

附 录 B
(资料性)

公开报道真菌广谱检测引物探针序列示例

公开报道真菌广谱检测引物探针序列示例,见表 B.1。

表 B.1 公开报道细菌广谱检测引物探针序列

引物探针名称	引物探针序列(5'-3')	参考资料
FungiQuantF	GGRAAACTCACCAGGTCCAG	FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay.BMC Microbiology 2012
FungiQuanR	GSWCTATCCCCAKCACGA	
FungiQuantT	TGGTGCATGGCCGTT	
B2FF	ACTTTCGATCGTAGGATAG	The Pathological Society of Great Britain and Ireland Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction.J Med Microbiol.1994
B4RR	TGATCGTCTTCGATCCCCTA	
18SIN3T	CTGAGAAACGGCTACCACAT	
18S-AFF	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	Detection of bacteria and fungi in blood of patients with febrile neutropenia by real-time PCR with universal primers and probes. J Infect Chemother. 2015
18S-ARR	CCGATCCCTAGTCGGCATAG	
18S-ATT	TTCAACTACGAGCTTTTAACTG	
ITS2FF	ATCGATGAAGAACGYAGC	Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. J Med Microbiol. 2017
ITS2RR	TCCTCCGCTTATTGATATG	
ITS2TT	TACCCGCTGAACTTAAGCAT	
FUNGIF	TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACC	Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections. Microbial Biotechnology.2019
FUNGIrAR	AGATGGAATTTACCACCCACTTAGA	
FUNGIrBR	AGATGGAATTTACCACCCGCTTGGA	
FungiProbeT	CGGCGAGTGAAGCGGSAARAGCT	

附 录 C
(资料性)
检出限研究方案

C.1 方案概述

针对确定的供试品类型,在确定检测环境、检测试剂、检测仪器的条件下对梯度加标样本进行检测,筛选出可稳定检出且表达量显著高于供试品基础值的最低加标量,该最低加标量设为对应检测程序的检出限。

C.2 验证实验设计

C.2.1 样本准备

C.2.1.1 供试品:应经《中华人民共和国药典(2020 年版 四部)》1101 无菌检查法检测,且结果为阴性。

C.2.1.2 阳性定量标准菌株:《中华人民共和国药典(2020 年版 四部)》1101 无菌检查法阳性标准菌株:

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[CMCC(B)26 003];

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B)10 104];

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[CMCC(B)63 501];

生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)[CMCC(B)64 941];

白色念珠菌(*Candida albicans*)[CMCC(F)98 001];

黑曲霉(*Aspergillus niger*)[CMCC(F)98 003];

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)[CMCC(B)44 102]。

标准菌株的规格建议范围: $(0.5 \sim 1.0 \times 10^3)$ CFU/颗。由于不同菌种类型的核酸提取效率之间可能存在差异,建议先针对每种标准菌种分别进行检测限研究,在获得不同菌株的前期研究数据后,再根据每种定量菌株的检出限值设计多种菌株混合加标样品进一步做确认性研究。

C.2.1.3 按试验需求取足够数量的供试品样本,根据选用的核酸提取试剂盒的相关提取要求制备成适合体积/浓度的样本,定量分装至足够数量的 EP 管中,按 C.2.1.4 分别准备试验组与对照组样本。

C.2.1.4 试验组与对照组样本准备如下。

C.2.1.4.1 试验组样本:

- a) 供试品:在 C.2.1.3 中所得的分装样本;
- b) 供试品阳性梯度加标样品:取一只标准菌株样本,加入 2 mL 菌种复溶液轻柔混匀。在 C.2.1.3 中所得的分装样本中分别加入梯度体积的菌种复溶液(如 10 μ L, 30 μ L, 100 μ L, 300 μ L, 600 μ L 等)。

C.2.1.4.2 对照组样本:

- a) 阳性提取对照:使用含有灭活细菌阳性质控、灭活真菌阳性质控的样本,从样本处理开始,与供试品平行操作后续检测步骤;
- b) 空白提取对照:以无菌水或缓冲液代替样本进行提取,与供试品平行操作后续检测步骤;
- c) 阳性扩增对照:以具有良好目的片段扩增性能的核酸溶液(如细菌和真菌的基因组 DNA 或含目的扩增序列的质粒溶液等)为模板进行扩增的反应;
- d) 阴性扩增对照:以无菌水或缓冲溶液为模板进行扩增的反应。

C.2.2 标准菌株平板计数

将 C.2.1.4.1b) 中的剩余的菌种复溶液按照 100 μL /平板进行涂板培养计数, 计数平板平行样宜不少于 5 个。标准菌种培养平板的选择、培养温度参考《中华人民共和国药典(2020 年版 四部》1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法。培养时间一般细菌类标准菌株不超过 3 d, 真菌类标准菌株不超过 5 d。根据平板计数结果和体积比例计算加标量。

C.2.3 核酸提取和 PCR 反应

按照确定的检测程序对试验组样本和对照组样本进行核酸提取和定量 PCR 反应。

C.2.4 检测试验与重复确认

C.2.4.1 每个样本至少设计 10 个平行检测复孔。分析并记录检测结果。

C.2.4.2 按照相同的试验方案, 完成至少 3 个不同批次的供试品的检出限试验。

C.2.5 检出限确认判定

C.2.5.1 检出限确认前提条件: 对照组样本检测结果满足 9.1 质量控制中的要求。

C.2.5.2 检出限确认: 比较测试结果, 选取每个批次, 每个复孔扩增 C_t 值均 <30 , 且与空白提取对照和阴性扩增对照的 C_t 值相比均显著降低(t 检验, $P \leq 0.05$) 的最低加标量。



参 考 文 献

- [1] Evaluation of Universal Probes and Primer Sets for Assessing Total Bacterial Load in Clinical Samples; General Implications and Practical Use in Endodontic Antimicrobial Therapy. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2005
- [2] Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology, 2002
- [3] Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. Appl. Environ. Microbiol, 2000
- [4] Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. J Appl Microbiol, 2008
- [5] Detection of bacteria and fungi in blood of patients with febrile neutropenia by real-time PCR with universal primers and probes. J Infect Chemother, 2015
- [6] Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of blood-stream infections. Microbial Biotechnology, 2019
- [7] FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. BMC Microbiology 2012
- [8] The Pathological Society of Great Britain and Ireland Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol, 1994
- [9] Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. J Med Microbiol, 2017

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY