基于tNGS技术的研发和检测验证服务项目

服务需求表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **一.服务内容** | | **响应情况** |
| 基于tNGS技术的研发和检测验证服务。具体内容为设计具有详细protocol的试剂盒用于定性检测HIV感染者血液、组织、肺泡灌洗液、脑脊液等样本中的真菌病原种类，包括过对样本进行核酸提取，随后进行超多重PCR靶向扩增富集构建文库，对文库进行二代基因组测序，对测序结果进行分析确定是否存在相应的病原真菌。 | |  |
| **二.服务形式** | |  |
| 提交测序技术参数、结果数据（峰图、序列文件）、整个项目实验流程的过程记录。 | |  |
| **三.主要技术参数** | |  |
| 1.检测真菌种属 | **念珠菌属 (Candida) 13种**，包括白念珠菌 (Candida\_albicans)、热带念珠菌 (Candida\_tropicalis)、光滑念珠菌 (Candida\_glabrata)、近平滑念珠菌 (Candida\_parapsilosis)、克柔念珠菌 (Candida\_krusei)、季也蒙假丝酵母 (Meyerozyma\_guilliermondii)、葡萄牙念珠菌 (Clavispora\_lusitaniae)、无名念珠菌 (Candida\_famata)、耳念珠菌 (Candida\_auris)、皱膜念珠菌 (Candida membranacea) 、毕赤酵母菌(Pichia pastoris),高丽假丝酵母菌, 葡萄牙假丝酵母菌。  **曲霉属 (Aspergillus) 7种**，包括 烟曲霉 (Aspergillus\_fumigatus)、黄曲霉 (Aspergillus\_flavus)、黑曲霉 (Aspergillus\_niger)、土曲霉 (Aspergillus\_terreus)、构巢曲霉 (Aspergillus\_nidulans)、杂色曲霉 (Aspergillus\_versicolor)、巴西曲霉(Aspergillus brasiliensis)。  **隐球菌属 (Cryptococcus) 3种**，包括 新生隐球菌 (Cryptococcus\_neoformans)、格特隐球菌 (Cryptococcus\_gattii)、罗伦特隐球菌(Papiliotrema\_laurentii)。  **镰刀菌属 (Fusarium) 2种**，含梨孢镰刀菌 (Fusarium\_poae)、串珠镰刀菌 (Fusarium\_verticillioides)。  **双向真菌 3种**，含荚膜组织孢浆菌 (Histoplasma\_capsulatum)、球孢子菌 (Coccidioides)、马尔尼菲篮状菌 (Talaromyces\_marneffei)。  **青霉属 (Penicillium) 2种**，含桔青霉(Penicillium\_citrinum)、灰黄青霉菌 (Penicillium\_griseofulvum)。  **毛霉属 (Mucor) 1种**: 卷枝毛霉菌(Mucor\_circinelloides)；  **根毛霉属(Rhizomucor) 1种**:根毛霉属(Rhizomucor\_sp)；  **米根霉(Rhizopus) 1种**:米根霉(Rhizopus\_oryzae)；  **黑菌(Exophiala) 1种**:皮炎外瓶霉(Exophiala\_dermatitidis)；**卡氏枝孢瓶霉(Cladophialophora) 1种**:卡氏枝孢瓶霉(Cladophialophora\_carrionii)；  **毛孢子菌属 (Trichosporon) 1种**: 阿萨丝孢酵母 (Trichosporon\_asahii)；  **孢子丝菌属 (Sporothrix) 1种**: 申克孢子丝菌 (Sporothrix\_schenckii)；  **其他3种**: 酿酒酵母 (Saccharomyces\_cerevisiae)、头状地霉 (Magnusiomyces\_capitatus)、耶氏肺孢子菌 (Pneumocystis\_jirovecii)。共40种真菌。 |  |
| 2.检测试剂盒 | 由超多重PCR扩增反应体系、均一化PCR扩增反应体系、panel引物组、纯化磁珠、内参、接头等配套试剂组成。反应体系由混合mix构成，无需额外添加反应酶，使用便捷。 |  |
| 3.试剂性能指标 | 须符合《中国医药卫生文化协会团体标准T/WJWCHCA 001-2024》关于tNGS产品的要求。  （1）外观：试剂盒各组分应齐全，包装完整，标识清晰。反应板、试剂瓶等无破损、漏液现象，液体试剂应澄清无沉淀、无悬浮物，固体试剂应无潮解、变质现象。  （2）净含量：各组分净含量应符合标示要求，允许偏差在+5%以内。  （3）引物特异性：针对40种目标真菌的引物探针组，与非目标真菌（至少验证5种）及人体基因组DNA无交叉反应。  （4）检测限：对于40种目标真菌，至少验证5种能够准确检测到的最低病原体拷贝数为500拷贝/mL，且检测结果的阳性符合率不低于90%。  （5）重复性：对同一批样品在同一条件下(相同的环境、操作人员及仪器)3天内进行3次检测，评价重复性。可选择高、低2个不同梯度的参考物质进行确认，重复性应>95%。  （6）一致性：可选择以下两种不同类型的标本来进行一致性确认:  A、使用临床标本:可选取阴性标本、阳性标本(宜包含弱阳性/低扩增的标本，并尽可能覆盖检测范围内常见病原体，比较tNGS与参比方法之间的差异，不一致的结果再用第3种方法（培养、宏基因检测、影像学结果、病理检验结果）进一步确认，通过阳性符合率和阴性符合率评价定性测定的一致性，一致率应>95%  B、使用参考物质:高、中、低三个浓度的一致率应>95%。该参考物质应为试剂的阳性、阴性标准质控品，或从第三方购买的用来验证实验结果的质控品，或国家临检中心下放的室间质控品。  （7）稳定性：在规定的储存条件下，产品有效期为12个月。在有效期内，产品各项性能指标应符合上述要求。 |  |
| 4.技术指标 | (1)每个真菌物种的检测位点（引物）数量不低于5 个。  (2)建库方法:采用NGS 单引物靶向扩增技术进行建库。  (3)建库多重扩增反应管数： 1管  (4)建库试剂适配国产化测序仪： 可适用华大G99，真迈 FASTA300， 赛陆 Salus Pro， 安图 思昆 500/1000/2000。  (5)样本量要求：DNA起始量≥ 1 ng。  (6)最低检出限（单个反应）：不高于5个基因组拷贝。  (7)测序数据量：单个样本下机数据量不超过1 G。  (8)具有配套的检测数据分析软件，可以自动输出检测报告。  (9)可适配自动化建库设备 |  |

报价单位：（盖章）

联系人及联系电话：

日期：