



【产品名称】

通用名称：B 族链球菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装：20 人份/盒、48 人份/盒；
单管单人份：20 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用阴道分泌物样本中 B 族链球菌 DNA 的检测。

B 族链球菌(Group B streptococcus, GBS) 学名无乳链球菌，为兼性厌氧的革兰氏阳性链球菌，正常妇女带菌率达 30%左右，属于条件致病菌，对成人主要引起肾盂肾炎、子宫内膜炎等。孕妇感染可通过产道传播给新生儿，引起新生儿的败血症、脑膜炎、肺炎等，是目前引发新生儿感染最主要的致病菌之一，美国妇产科协会(ACOG)、美国儿科协会(AAP) 建议对孕 35~37 周的所有孕妇进行该项目检测。目前 GBS 的检测方法主要有培养法、抗原检测法以及核酸检测法，本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，对妊娠 35~37 周孕妇进行 B 族链球菌 DNA 检测，有助于对感染者及时给予抗生素预防。本试剂盒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。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以 GBS 基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行 PCR 扩增，用于样本中 GBS DNA 的定性检测。另外，本试剂盒选取样本中人基因组 DNA 的一段基因序列为内标序列，反应液中含有内标引物和内标探针，用于对核酸提取过程及 PCR 扩增过程进行监控，可减少假阴性结果的出现。

【主要组成成份】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (适用于大包装 20 人份/盒)	GBS PCR 反应液 A	340μl/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 热启动 Taq 酶、尿嘧啶-N-糖基化酶
	GBS PCR 反应液 B	60μl/管	1	
PCR 检测试剂 (适用于大包装 48 人份/盒)	GBS PCR 反应液 A	816μl/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 热启动 Taq 酶、尿嘧啶-N-糖基化酶
	GBS PCR 反应液 B	144μl/管	1	
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份)	GBS PCR 反应管 (未贴标签管)	1 人份/管	20	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、热启动 Taq 酶、尿嘧啶-N-糖基化酶
质控品 (适用于大包装、单管单人份)	GBS 阴性质控品	400μl/管	1	含 GBS 内标片段的大肠杆菌
	GBS 阳性质控品	400μl/管	1	含 GBS 目的片段的大肠杆菌

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：核酸提取试剂

质控品说明：阳性质控品含 GBS 目的片段的大肠杆菌，使用时需进行核酸提取，且应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

【储存条件和有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 9 个月。

试剂在 4℃可保存 14 天；避免反复冻融，反复冻融次数不宜超过 7 次；在 4℃储存温度条件下开瓶次数不超过 7 次；运输采用冰壶、干冰密封或泡沫盒密封运输，运输时间不能超过 3 天。试剂盒在 37℃可保存 120h。

试剂盒生产日期及失效期见产品标签。

【适用仪器】ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, Roche LightCycler480, DA7600。

【样本要求】

- 适用样本类型：阴道分泌物。
- 样本采集
先擦除过多的分泌物和排出液，用无菌拭子从阴道穹窿部粘膜处获取带上皮细胞的分泌物，置入装有生理盐水试管中，密封送检。直接进行核酸提取前，拭子样本须在生理盐水中涡旋充分，以洗下拭子上粘附的病菌及含有病菌的细胞等。
- 样本保存和运送：所采集的样本可立即用于测试，或长期保存于-70℃，也可以保存于-20℃待测，保存期为 4 个月，样本应避免反复冻融。样本运送采用 0℃冰壶或加冰并以泡沫箱密封，低温运输时间不应超过 8h，长途运输建议采用干冰以保持低温。

【检验方法】

1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

建议取 200μl 液态样本进行核酸提取。可采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒（核酸提取或纯化试剂），具体操作步骤请按照试剂盒说明书指引进行。

本试剂盒中的 GBS 阴性质控品和 GBS 阳性质控品均参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

2.1 大包装规格试剂使用

从试剂盒中取出 GBS PCR 反应液 A、GBS PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

2.1.1 配制 GBS 反应体系

取适量 PCR 反应管（按 GBS 反应体系计算）；每管加入 GBS PCR 反应液 A 17μl、GBS PCR 反应液 B 3μl（也可按照单个反应的用量，计算 PCR 反应液 A、B 各自所需总量，两者混匀后分装 20μl 于单个 PCR 反应管中）。

2.2 单管单人份规格试剂使用

直接使用 GBS PCR 反应管。

3. 加样（样本制备区）

往上述对应的 GBS PCR 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、GBS 阴性质控品核酸、GBS 阳性质控品核酸 5μl，盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4. PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 ABI Prism 7500 仪器设置（ABI Prism 7300、DA7600 仪器设置参照此操作）

4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknow），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: NONE, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: NONE, Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开instrument窗口，设置循环条件如下：50℃ 2min, 1个循环；95℃ 15min, 1个循环；94℃ 15s→55℃ 45s（收集荧光），40个循环。设置完成后，保存文件，运行程序。

4.3 LightCycler480仪器设置

4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM,VIC。

4.3.2 设置循环条件：

Program name	Cycles	Target(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 02: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	40	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，设置完成后，保存文件，运行程序。

5. 结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例)

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在此基础上，微调阈值线位置使所得标准曲线的 R² 值最大即可在“Report”窗口读取检测结果。

6. 质量控制

- 6.1 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线；VIC 检测通道有扩增曲线。
 - 6.2 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≤36；VIC 检测通道有或无扩增曲线；
- 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

7. 结果判断

- 7.1 如果 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≥38 或 FAM 检测通道无扩增曲线，且在 VIC 检测通道有扩增曲线，可判样品为 B 族链球菌阴性；
- 7.2 如果 FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值<38，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为 B 族链球菌阳性。

【阳性判断值或者参考区间】

通过临床样本检测结果分析，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的阳性判断值为：Ct 值为 38，内标参考值：Ct 值为 40。

【检验结果的解释】

- 1. 每次实验均需检测阴性质控品，阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。
- 2. 本试剂盒反应液中带有内标引物和内标探针，选取样本中人基因组 DNA 的一段基因序列为内标序列，内标通道（VIC 通道）检测对象为内标序列，当 FAM 检测通道为阳性时，由于体系的竞争关系，内标通道可能为阴性。
- 3. 内标通道为阴性时，若该检测管的 FAM 检测通道也为阴性，说明体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检。
- 4. 报告建议采用以下格式：
阴性结果报告格式为：样本未检测到 B 族链球菌 DNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
阳性结果报告格式为：样本检测到 B 族链球菌 DNA。

【检验方法的局限性】

- 1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关；
- 2. 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 3. 病原微生物在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果；
- 4. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

- 1. 产品分析性能评估结果表明：
 - 1.1 本试剂盒的灵敏度可达 2.72×10²copies/ml。
 - 1.2 阴阳性参考品符合率：5 份阳性参考品符合率为 100%；5 份阴性参考品符合率为 100%。
 - 1.3 精密度：批内/批间、日内/日间精密度检测 Ct 值的变异系数（CV，%）均小于 5.0%。
 - 1.4 交叉反应：本试剂盒分析性能评估的交叉反应病原体，均为与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体，如巨细胞病毒、风疹病毒、弓形虫、淋球菌、梅毒螺旋体、白色念球菌、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、生殖支原体、解脲脲原体、沙眼衣原体、大肠杆菌、人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、柯萨奇病毒 A10 型、柯萨奇病毒 A6 型。经 PCR 确认为高浓度病原体样本核酸后，稀释各病原体感染浓度至 1×10⁶copies/ml，用本试剂盒进行检测，不存在交叉反应。
 - 1.5 干扰实验：本试剂盒分析性能评价的内源性干扰物质、外源性干扰物质和治疗性药物均为原液经过倍比稀释至作用浓度，经验证：保妇康栓（浓度≥0.10mg/ml）和皮炎平（浓度≥0.10mg/ml）对检测结果有影响，应尽量避免这些使用这些药物治疗后的样本的检测；常见内源性干扰物质如胆红素（浓度超过 0.1 mg/ml）、甘油三酯（浓度超过 2.26mmol/l）、血红蛋白（浓度超过 200mg/ml）对检测均无明显影响；外源性干扰物质如药物青霉素、氨苄青霉素、克林霉素、头孢唑林、红霉素、万古霉素，添加浓度至 0.50mg/ml，对检测均无明显影响。
- 2. 临床试验结果：本试剂盒临床验证共检测阴道分泌物样本 824 例，与对照试剂检测结果相比，阳性符合率为 98.18%，阴性符合率为 99.69%，总符合率为 99.39%。Kappa 值为 0.981（p<0.001）。

【注意事项】

- 1. 本产品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书；
- 2. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，待测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
- 3. 产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；
- 4. 全程应避免 DNA 酶污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
- 5. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
- 6. PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000g 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
- 7. 如果在样本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
- 8. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 9. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
- 10. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20℃待用(24h 内)；
- 11. 所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 12. 须对每次实验进行质量控制。
- 13. 若实时荧光 PCR 仪为 FAM 单通道，可忽略内标扩增监测。

【参考文献】

- 1. Money Deborah, Dobson Simon, Cole Lesley, Karacabeyli Eda, Blondel-Hill Edith, Milner Ruth, Thomas Eva. An evaluation of a rapid real time polymerase chain reaction assay for detection of group B streptococcus as part of a neonatal group B streptococcus prevention strategy. [J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada, 2008, 309:.
- 2、Fernanda D P, Tailise Conte G, Bruna Maria A, et al. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. [J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(4):323-327.
- 3、Rallu F, Barriga P C, Martel L V, et al. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(3):: 725-728.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：中山大学达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820 电话：8008304008 020-32290789
邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

售后和服务单位名称：中山大学达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820 电话：8008304008 020-32290789
邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20183400181

【说明书核准日期及修改日期】2018 年 5 月 4 日