

B 族链球菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：B 族链球菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测人直肠/阴道混合拭子中的 B 族链球菌 DNA。

本试剂盒可用于临床 B 族链球菌感染的辅助诊断。

B 族链球菌(group B streptococcus, GBS) 又称为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)，因其细胞壁中多糖物质属于抗原构造分类中的 B 族而得名。GBS 位于人体下消化道及泌尿生殖道，为条件致病菌，健康人群 GBS 带菌率可达 15%~35%，妊娠妇女的带菌率大约为 10%~30%^[1]。GBS 能引起孕妇生殖道感染、早发型新生儿感染和晚发型新生儿感染。GBS 感染孕妇，可引起早产、胎儿发育不良(低体重儿)、胎膜早破及晚期流产。据统计约 10%~30%的孕妇有感染 GBS，其中 40%~70%在分娩过程中会传递给新生儿。GBS 感染新生儿，早发型感染（出生后 7d 以内）可引起新生儿败血症、肺炎，是新生儿死亡的主要原因之一；而晚发型感染（7d-3 个月）主要引起脑膜炎及严重的神经系统后遗症，包括脑积水、智力障碍、小头畸形、耳聋等^[2-3]。

【检验原理】

本试剂盒利用针对 B 族链球菌基因组序列中 *cfb* 基因^[4]和 *cps* 基因^[5]保守区设计的特异性引物探针，配以 PCR 反应液等组分，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现对 B 族链球菌 DNA 的快速检测。

PCR 检测体系含有 UNG 酶+dUTP 防污染措施，将可能的产物污染充分降解，避免假阳性结果。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），阳性内对照（内标）基因为人源管家基因，通过检测内标是否正常来监测待测样本中是否具有 PCR 抑制物，避免 PCR 假阴性。

【主要组成成分】

序号	试剂名称	规格与装量 (24 人份装量)	规格与装量 (48 人份装量)	主要成分
1	B 族链球菌-酶混合液	60μL /管×1 管	120μL /管×1 管	Taq 酶、UNG 酶
2	B 族链球菌-PCR 反应液	660μL /管×1 管	1320μL /管×1 管	引物、探针、dNTPs、Mg ²⁺ 、PCR buffer
3	B 族链球菌-阴性对照	1000μL /管×1 管	1000μL /管×1 管	生理盐水
4	B 族链球菌-内标	50μL /管×1 管	50μL /管×1 管	含有内标基因质粒。
5	B 族链球菌-阳性对照	1000μL /管×1 管	1000μL /管×1 管	含有 B 族链球菌目标基因质粒+含有内标基因质粒。

备注：1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换；

2) 试剂盒内的生物样本均已经灭活处理；

3) 自备试剂：灭菌生理盐水；

4) 使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）或样本释放剂（湘长械备 20150022 号）进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

1 试剂应避光密闭储存于-20±5℃；试剂盒有效期为 12 个月，生产日期，失效日期请见外包装盒。

2 不使用时，这些试剂在包装标识的效期内可稳定存放。一旦使用，扩增试剂盒反复冻融应不超过 7 次。

【适用仪器】

适用于 ABI7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、MA-6000 型实时荧光定量 PCR 仪、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1 适用样本类型：直肠/阴道混合拭子

2 样本采集：

擦除外阴多余分泌物后，先取无菌拭子置于阴道低位 1/3 处，沿阴道内壁轻轻旋转取得分泌物，再用同一拭子于肛门括约肌以上肠内壁旋转取得样本，将该采样后的拭子放回无菌拭子套管中，密闭送检。

3 样本保存和运送：上述采集的样本可立即用于检测，或 2~8℃保存（不超过 24 小时），-20±5℃保存时间不超过半年，-70℃及以下保存 12 个月，反复冻融不超过 7 次。

【检验方法】

1 样本处理（在样本处理区进行）

往样本收集管中加入 1~2mL 无菌生理盐水，充分振荡混匀，作为待测样本备用，按如下方式处理：

取 300μL 待测样本（如分泌物较多或样本比较浑浊，需低速离心后吸取）到 1.5mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）或样本释放剂（湘长械备 20150022 号），按其说明书操作进行核酸提取。

2 试剂准备（在试剂准备区进行）

2.1 取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，混匀后备用；

2.2 将 B 族链球菌-内标按照比例添加至 B 族链球菌-阴性对照中：每 200μLB 族链球菌-阴性对照添加 10μLB 族链球菌-内标，充分混匀后备用。

2.3 根据待测样本、阴性对照、阳性对照的数量，按比例（反应液 27.5μL/人份+酶混合液 2.5μL/人份）取相应量的反应液、酶混合液，充分混匀成 PCR 混合物，瞬时离心后备用。

3 加样（在样本处理区进行）（阴性对照、阳性对照待测样本同步处理）

3.1 每个 PCR 反应管中加入上述处理的阴性对照、阳性对照、待测样本 20μL；

3.2 每管加入 PCR 混合物 30μL，盖上管盖，涡旋震荡 10s 后，2000rpm 离心 30 秒（去除气泡）。

4 PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

4.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照以及未知样本，并设置样本名称。

4.2 荧光检测通道选择：

ABI7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、MA-6000 型实时荧光定量 PCR 仪、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪：

1) 选择 FAM 通道（Reporter:FAM, Quencher:none）检测 B 族链球菌 DNA；2) 选择 CY5 通道（Reporter:CY5, Quencher:none）检测内标；3) 参比荧光（Passive Reference）设置为 ROX。设置 Sample Volume 为 50。

4.3 循环参数设定：

步骤		温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	Taq 酶活化	94℃	5 分钟	1
3	变性	94℃	15 秒	45
	退火，延伸，及荧光采集	57℃	30 秒*	
4	仪器冷却（可选）	37℃	10 秒	1

(*注：由于 ABI7500 仪器原因，不能设置为 30 秒，可以设置为 31 秒。)

5 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置，以下分析以 ABI 系列仪器为例）

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，调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analyze 进行分析，使各项参数符合下述“6 质量控制”中的要求，然后到 Plate 窗口下记录 Ct 值和定量结果。

6 质量控制

6.1 B 族链球菌-阴性对照：FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值>39，同时 CY5 通道 Ct 值≤33；

6.2 B 族链球菌-阳性对照：FAM 通道 Ct 值≤33；同时 CY5 通道 Ct 值≤33。

6.3 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。

【阳性判断值】

通过参考值的研究确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 参考值为 39，检测内标的 Ct 参考值为 39。

【检验结果的解释】

- 1 对于测定 FAM 通道 Ct 值≤39，且扩增曲线成明显 S 型的样本，报告为 B 族链球菌 DNA 阳性；
- 2 对于测定 FAM 通道无 Ct 值，或 Ct 值>39，且 CY5 通道 Ct 值≤39，报告为 B 族链球菌 DNA 阴性；
- 3 若 CY5 通道 Ct 值>39 或无显示，则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。

【检验方法的局限性】

- 1.本试剂盒检测结果不能作为临床确诊的依据。对患者的诊治应结合症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 2.样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。
- 3.如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

本试剂盒检测中国食品药品检定研究院的 B 群链球菌核酸国家参考品，阴、阳符合率为 100%，最低检测限参考品为阳性，精密度参考品 CV 值均≤5%。

最低检出限：本试剂盒检测 B 族链球菌（Ia、Ib、III、V 型）最低检出限为 2.00E+02 copies/mL，检测国家参考品 GBS1、GBS2、GBS5、GBS7 最低检测限为 1000CFU/mL。

精密度：本试剂盒检测企业精密度参考品 B 族链球菌 Ia 型和 III 型，浓度分别为 2.00E+04 copies/mL、2.00E+03 copies/mL，Ct 的变异系数均≤5%；检测企业阴性精密度参考品结果为阴性。不同操作者对 B 族链球菌血清型 Ia、Ib、III、V 型中浓度阳性样本、临界浓度阳性样本以及阴性样本，进行为期 21 天不同批次的检测。中浓度阳性样本，检测结果均为阳性，且批间、日间及不同操作者间检测 Ct 值 CV 的范围均小于 5%，临界浓度阳性样本检测均为阳性，阴性样本检测均为阴性。

血清型检测能力：本试剂盒可检测 B 族链球菌血清型 Ia、Ib、Ic、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 和 IX 型。

分析特异性：常见其它类似病原体（A 群链球菌、C 群链球菌、G 群链球菌、肺炎链球菌、草绿色链球菌、粪肠球菌、尿肠球菌、嗜酸乳杆菌、淋病奈瑟菌（淋球菌）、梅毒螺旋体、沙眼衣原体、人型支原体、阴道毛滴虫、白色念珠菌、单纯疱疹病毒II型），无交叉反应。

抗干扰物检测能力：经验证的干扰物质（血红蛋白 2g/L、白细胞 1.00E+07 cells/mL、宫颈粘液 10%、避孕胶 0.5%、阴道灌洗液 0.5%、抗真菌软膏（含 2%克霉唑）0.5%、抗真菌软膏（含 4%咪康唑）0.5%、阴道润滑剂 10%）均不存在干扰。

临床评价：本试剂盒在 3 家临床单位开展临床试验，与已上市的同类试剂完成了 723 例临床样本对比研究，其中阳性符合率为 98.47%，阴性符合率为 99.24%；总符合率为 99.03%；与 B 族链球菌增菌培养鉴定完成了 159 例对比研究，灵敏度为 100%，特异度为 94.38%。

【注意事项】

- 1. 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 3. 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，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。

- 4. 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：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》。
- 5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。
- 6. 运输采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输 5 天，温度不超过 20℃，不影响产品有效期。
- 7. 若实时荧光 PCR 仪仅有双通道（如 FAM 和 ROX），则可忽略内标扩增监测；若只有单通道可以忽略参比荧光 ROX 设置。
- 8. 对每次实验进行质量控制，对于检测为阴性的样本，应确定 GBS 内标的扩增信号是否正常，以评估实验操作和检测试剂是否正常，以及是否受到抑制物的影响，避免假阴性结果；对于阳性检测样本，内标的扩增信号可不予考虑。

【参考文献】

[1] Ronald S G, Stephanie S, Aline S. Perinatal infections dueto group B streptococci[J]. ObstetGynecol, 2004, 104(5): 1062-1076.
[2] 邓江红, 杨永弘. B 组链球菌的分子生物学诊断和基因分型研究进展. 中华儿科杂志. 2005 年 11 月第 43 卷第 11 期;
[3] Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC.2012.
[4] Andreas Podbielski, Oliver Blankenstein, Rudolf Liitticken.Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor.Med Microbiol Immunol (1994) 183:239-256
[5] Monica Imperi, Marco Pataracchia, Giovanna Alfarone, Lucilla Baldassarri, Graziella Oreffici, Roberta Creti, et al.A multiplex PCR assay for the direct identifification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae.Journal of Microbiological Methods 80 (2010) 212–214.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司
住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876
售后服务单位名称：圣湘生物科技股份有限公司
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876
生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号，长沙市岳麓区麓松路 682 号主厂房 101
生产许可证编号：湘药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20233401646

【说明书核准日期及修改日期】2024 年 02 月 27 日