CS
点击此处添加中国标准文献分类号

CSBT/T XXXXX—2018

可经输血传播感染病原体核酸筛查技术产品要求

Requirements for nucleic acid screening technology for transfusion transmitted pathogens

征求意见稿

2018 －XX－XX 发布　　2018－XX－XX 实施

目 次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用 1
3 术语与定义 1
4 影响检测结果的关键因素 2
5 核酸检测试剂的性能 3
6 应用常见问题 5
参考文献 6

前　言

本标准按照 GB/ T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：北京医院、北京市红十字血液中心、河北省血液中心、广州血液中心、深圳市血液中心。

本标准主要起草人: 王露楠、常乐、葛红卫、王素玲、郑优荣、曾劲峰、黄力勤、郑欣。

可经输血传播感染病原体核酸筛查技术产品要求

1 范围

本标准规定了核酸筛查产品（以下简称“产品”） 的术语和定义、技术要求、试验方法等。本标准只适用于核酸筛查产品的性能验证和质量评价。核酸筛查方法包含聚合酶链反应（PCR）技术与转录介导扩增技术（TMA）。

2 规范性引用

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

国家市场监督管理总局《核酸扩增法检测试剂注册技术审查指导原则》

国家市场监督管理总局《丙型肝炎病毒核糖核酸测定试剂技术审查指导原则》

国家市场监督管理总局《人类免疫缺陷病毒检测试剂临床研究注册技术审查指导原则》

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 聚合酶链反应 polymerase chain reaction，PCR

一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术。在特异性核酸模板、引物、DNA 聚合酶等必要条件存在时，通过变性、退火、延伸不同温度变化的重复循环，使模板片段扩增放大数百万倍。

3.2 转录介导扩增技术 transcription-mediated amplification，TMA

一种目的核酸的扩增方法，使用 RNA 翻译（RNA 聚合酶）和 DNA 合成（反转录）按照目标核酸物质产生 RNA 扩增子。RNA 和 DNA 都可以使用 TMA 方法扩增。

3.3 信噪比 signal-to-noise ratio, SNR or S/N

核酸检测过程中，目的核酸的靶信号与背景噪音信号的比值。通常 PCR 反应的信噪比在 2-5:1 时，可以将靶信号与背景信号区分开。

3.4 分析灵敏度 analytical sensitivity

在定性检测中，分析灵敏度为检测方法可以从真阳性样本中检出阳性结果的能力。

3.5 检出限 limit of detection，LoD

样本中可被检测到的分析物的最低浓度。
注1：也被称为“最低检出限”或“最小可检出浓度（剂量或量值）”，有时也代表“分析灵敏度”；
注2：分析物可被稳定检出（通常在常规实验条件下，>=95%的样本）的最低浓度。

3.6 分析特异性 analytical specificity

在定性检测中，分析特异性为检测方法可以从真阴性样本中检出阴性结果的能力。

4 影响检测结果的关键因素

4.1 核酸纯化方法

对核酸纯化方法的评估应考虑以下几个因素：每一步骤试剂残留对结果的影响，提取过程发生污染的风险，提取反应的体积，样本混合过程的影响，样本提取过程是否有分管提取最后合并的步骤，操作过程中溶液是否有气泡产生（是否有表面活性剂），是否有高温加热步骤，设备移液的准确性，移液步骤是否有滴液的现象。

4.2 引物探针的设计和验证

因为引物的设计是产品研发过程的一个重要环节，上市后不能随意变更，产品使用者只能对产品引物和探针的设计是否合理进行验证。对于 PCR 反应体系，验证主要参数包括扩增效率，常见亚型的检出能力，检出限时的信噪比。对于 TMA 反应体系，验证参数主要包括不同浓度的信噪比，常见亚型的检出能力，强阳对弱阳的干扰（多重反应的时候）。

4.3 反应抑制物和干扰物

核酸扩增的效率有赖于酶的活性和离子浓度等条件。影响核酸扩增检测效率（包括逆转录效率）的因素包括内源性的，即样本本身有抑制物；同时也包括外源性的，例如采血管里的某些成分、纯化过程中引入的螯合剂、表面活性剂、有机溶剂等。此外样本裂解纯化方法设计不合理或操作不当，也有可能造成在样本提取过程中核酸的降解，从而导致假阴性的结果。

4.3.1 内源性抑制因素

内源性抑制物是指样本本身含有的可以抑制 DNA 聚合酶活性，降低扩增效率的物质。在血液样本中最常见的是血清或血浆中的血红素及其代谢产物，因此在启用核酸检测系统前，应对不同溶血程度的溶血样本对检测的干扰进行评估。

4.3.2 外源性抑制因素

外源性抑制因素主要来自于两个途径：一是采血管；二是提取纯化过程。

采血管不能采用肝素作为抗凝剂，因为肝素是 DNA 聚合酶的抑制剂；但采用 EDTA 抗凝的采血管时，应考虑到 EDTA 有螯合反应体系中的锰离子和镁离子的作用，同时采血管可能还有其他干扰反应的成分，应该在做检测系统的确认时，对采血管的适用性做出评估。

纯化过程有可能引入的包括试剂 EDTA、去垢剂如十二烷基硫酸盐(SDS)、异硫氰酸胍和盐酸胍以及一些有机溶剂，核酸纯化如果不能有效去除这些溶剂，势必影响扩增检测效率。

4.3.3 提取方法和操作因素

有效的核酸提取纯化方法应该是使病毒充分裂解释放出病毒核酸序列，同时又能保证该序列在后续步骤中不被降解或极少降解；最后得到纯化核酸不应含有内源和外源性抑制物。

4.4 检测试剂适用设备

对于使用开放设备的产品，对混样和核酸纯化的设备要进行抗污染能力验证（梅花桩实验，棉签擦拭测试），对荧光 PCR 仪要定期进行校准，对可以使用不同型号荧光 PCR 仪的试剂，要对不同型号的荧光 PCR 仪的等效性进行评估（算法，通道干扰等因素）。对于封闭式设备，要定期对设备内部关键部位进行污染监测，也可定期做梅花桩实验。

4.5 检测耗材对结果的影响

耗材（吸头，深孔板，PCR 反应板，封口膜等）对核酸筛查产品的结果重复性影响很大。使用非指定耗材，应对耗材进行评估测试（灵敏度，重复性，批间差），可由试剂生产厂家提供评估报告或提供评估检测方法（不能采用抽检的方式来测试耗材）。

5 核酸检测试剂的性能

5.1 分析灵敏度

用可溯源的质控品或标准品进行验证。验证方案：将每种病毒标准品的 5 个稀释度（根据产品说明书声称的分析灵敏度以上设置 2 个稀释度，以下设置 2 个稀释度）均使用 EDTA 抗凝的混合人血浆制备。每个稀释度重复检测 20 次。综合每种病毒的所有重复测试数据并进行 PROBIT 分析，可用于评估检测限（LOD）和双侧 95%可信区间。

5.2 基因型/亚型的分析灵敏度和检测限

室间质量评价计划的实施包括计划书发放、参加单位交费、质量评价样本协议签订及给参加者的指导书等。根据产品说明书声称的每种病毒基因型/亚型可达到的分析灵敏度，收集不同基因型/亚型（或我国常见的每种病毒基因型/亚型，表1）的临床样本或可溯源的标准品，采用病毒阴性的正常人血浆将样本稀释到试剂检测限（LOD）的3倍和1倍，每一份样本均重复检测7次或以上，计算每种病毒在不同基因型/亚型3倍和1倍LOD处的检测情况，理论上3倍LOD时应达到99.7%以上检出，1倍LOD时应达到95%以上检出，或应达到产品说明书声称的每种病毒不同基因型/亚型的分析灵敏度。

表 1. 我国常见的 HBV/HCV/HIV 基因型/亚型

HBV	HCV	HIV-1 M 组
B	1b	CRF07_BC
C	2a	CRF01_AE
C/D	3a	CRF08_BC
D	3b	B’
	6a	B
	1a	BC

5.3 分析特异性

5.3.1 潜在的交叉反应性和干扰性微生物

收集产品说明书声称的不存在交叉反应性的病原微生物培养株、细菌/真菌菌株组成样本盘，微生物浓度为 106 病毒颗粒、拷贝或 PFU/mL。这些微生物加入到病毒阴性的正常人血浆中，并在加入和不加入 HBV、HCV 和 HIV 至浓度为每种病毒 LOD 的 3 倍的情况下，使用试剂进行检测，以上病原微生物应不干扰检测结果。

5.3.2 与其他疾病的交叉反应

收集每一种疾病情况下（产品说明书声称的不存在交叉反应的疾病）的血浆样本，在加入或不加入 HBV、HCV 和 HIV 至每种病毒 LOD 的 3 倍的情况下，使用试剂进行检测，以上疾病血浆应不干扰检测结果

5.4 潜在的干扰物质

5.4.1 内源性干扰物质

收集产品说明书声称的不存在内源性干扰的相应浓度的血浆样本（如过高水平的甘油三酯、血红蛋白、非结合性胆红素、白蛋白及人类基因组 DNA 等），在加入或不加入 HBV、HCV 和 HIV 至每种病毒 LOD 的 3 倍的情况下，使用试剂进行检测，以上内源性物质应不干扰检测结果。

5.4.2 外源性干扰物质

收集产品说明书声称的不存在外源性干扰的相应浓度的血浆样本（如存在过高浓度的扑热息痛、乙酰水杨酸、抗坏血酸、阿伐他汀、布洛芬等）的正常人血浆，在加入或不加入 HBV、HCV 和 HIV 至每种病毒 LOD 的 3 倍的情况下，使用试剂进行检测，以上外源性物质应不干扰检测结果。

5.5 重复性

将阴性血浆和 3 个浓度的 HBV、HCV 和 HIV 核酸阳性血浆（0.5 倍 LOD、1 倍 LOD 和 3 倍 LOD）组成样本盘，使用同一名操作人员在同一台设备上，连续检测 5 天，统计各浓度样本的检测情况。若实验室有多台设备的，可由不同的操作人员各在一台设备上实验，连续检测 5 天，统计不同人员、不同设备下各浓度样本的检测情况。

5.6 稳定性

包括实时稳定性，开瓶稳定性，模拟日常检测过程试剂测试稳定性。

采用检出限浓度的样本进行最大通量检测，进行加样稳定性评估。

6 应用常见问题

6.1 结果分析

对于封闭检测体系，应对内标和弱阳质控品信号的变化进行监测。如果是开放式体系，则要考虑软件的设定对结果的影响，同时还要考虑到是否用参比荧光或者背景荧光作为参照，消除光路和耗材对结果的影响。

6.2 假阳性产生的原因及处理措施

6.2.1 假阳性结果主要有三方面原因

1）样本间的交叉污染

阳性样本、阳性对照和阳性质控都有可能成为交叉污染的污染源。由于交叉污染经常是偶然发生的事件，发生后很难被发现。

2）扩增产物（扩增子）的污染

扩增产物很小的核酸片段，它们可以存在于空气中，也可以附着在仪器或操作台表面。

3）非特异扩增

检测系统也可能会出现非特异的扩增，原因有可能是检测体系本身的问题，如检测系统不同荧光通道间的干扰，也可能是样本中存在的干扰物质造成。

6.2.2 假阳性结果解决措施

样本交叉污染应重新审核检测过程。措施应包括对开盖、样本汇集、加样、核酸纯化等环节进行交叉污染风险评估；在操作要求中应该有避免上述污染产生的措施，包括阳性对照开盖后应更换手套、使用带滤芯的吸头等。

发生扩增产物污染，应对污染区域用 84 消毒液进行彻底消毒，连续做三次沉降和擦拭测试，合格后，方可以继续进行检测。

对于非特异扩增应分析来源，即样本、试剂、设备等，然后采取相应的解决措施。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国卫生健康委员会.《血站技术操作规程（2015版）》.2015-12-31.
[2] CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. CLSI document MM03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
[3] Li HM, Wang JQ, Wang R, et al. Hepatitis B virus genotypes and genome characteristics in China. World J Gastroenterol, 2015, 21(21): 6684-6697.
[4] Guoping D, Xiaoshan L, Musa TH, et al. The Nationwide Distribution and Trends of Hepatitis C Virus Genotypes in Mainland China. J Med Virol, 2018. doi:10.1002/jmv.25311.
[5] He X, Xing H, Ruan Y, et al. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey. PLoS One, 2012, 7(10):e47289.