

T/CSBT

中国输血协会团体标准

T/CSBT 008—2019

可经输血传播感染病原体核酸筛查 技术要求

Requirements for nucleic acid screening technology for transfusion transmitted
pathogens

2019-04-12 发布

2019-04-12 实施

中国输血协会发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 影响检测结果的关键因素.....	2
5 核酸检测试剂性能.....	3
6 试剂批质检.....	4
7 应用常见问题.....	5
附录 A（规范性附录） 分析灵敏度建立的基本方案.....	7
参考文献.....	9

前 言

本标准按照 GB/ T 1.1-2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国输血协会输血传播疾病专业委员会提出。

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要求

1 范围

本标准规定了可经输血传播感染病原体核酸筛查技术的关键影响因素和性能验证要求,包括核酸筛查试剂的性能要求以及应用中常见问题分析。核酸筛查方法包含聚合酶链反应(PCR)技术与转录介导扩增(TMA)技术。本标准适用于核酸筛查试剂的验证评价及日常检测的质量控制。

2 规范性引用文件

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。

EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition

3 术语和定义

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、dNTP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

一种目的核酸的等温扩增方法,使用RNA转录(RNA聚合酶)和DNA合成(反转录),按照目标核酸序列产生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

检测系统或方法可检测的最低分析物浓度。在核酸检测中,分析灵敏度常用检出限(LoD)表示。

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，分析特异性是指检测方法检测出特定核酸分子的能力。分析特异性通常取决于检测系统的抗干扰能力。

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的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。

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核酸扩增过程中酶活性，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人基因组DNA、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或采血管材料可能会对病原体有吸附作用，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（即高浓度样本和阴性样本交错放置），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，也可定期做交叉污染验证。

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，抑制物，批间差），可由试剂生产厂家或耗材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 核酸检测试剂性能

5.1 产品基本性能指标

产品基本性能指标应由产品生产方建立并验证，将数据提供给使用方。应验证的指标主要包括：

5.1.1 分析灵敏度

产品试剂盒说明书中或补充材料中应提供基于国际标准品或国际标准品标定的标准品进行的建立分析灵敏度的方案，包括阳性样本的来源，浓度稀释梯度的信息，以及最终的针对每个靶标95%检出最低检出限（LOD 95%）的均值及95%置信区间。建议选择浓度梯度时应参考EP17中的要求（附录A）。

5.1.2 基因型/亚型的分析灵敏度和检出限

试剂说明书中或补充材料中应提供可覆盖的基因型/亚型，并提供相应的验证数据（我国主要的病毒基因型/亚型，表1）。

表1 我国主要的 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

5.1.3 早期检出能力

试剂说明书中或补充材料中应提供该产品基于血清转换盘的针对早期感染检出能力的评估。

5.1.4 特异性

1) 潜在的交叉反应性和干扰性微生物

产品试剂盒说明书中或补充材料中应提供可能产生交叉反应性的病原微生物（包括细菌，病毒等）清单以及验证的结果。

2) 内源性干扰物质

产品试剂盒说明书中或补充材料中应提供内源性干扰物质验证的数据，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。

3) 外源性干扰物质

如果可能,产品试剂盒说明书中或补充材料宜提供外源性干扰物质的验证数据。例如血液中有可能出现的高浓度扑热息痛、乙酰水杨酸、抗坏血酸、阿伐他汀、布洛芬、枸橼酸钠等。

5.2 核酸检测系统性能验证

血站血液检测实验室在将核酸检测系统在投入常规使用前,应对其性能进行验证,以确定检测系统安装调试到位,确保在血站实验室环境中运行的性能与厂家声明的性能一致。

5.2.1 分析灵敏度验证

用可溯源的质控品或标准品进行验证。验证方案:选择病毒浓度为3倍检测试剂LOD浓度的样本,在同一套检测系统上,由同一个操作员每天进行不少于6个重复检测,连续三天进行检测,获得不少于20个检测结果。所有重复检测结果均为反应性,并满足每一批试剂的质量检测报告、产品试剂盒说明书中或补充材料中有关3倍LOD的要求。

5.2.2 内源性干扰物质验证

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)并不加入HBV、HCV和HIV和加入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,以上内源性物质应不干扰检测结果。

5.2.3 重复性

将阴性血浆和3倍最低检出限浓度的HBV、HCV和HIV核酸阳性血浆各3份组成样本盘,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。检测结果应均为反应性,对信号值进行统计分析,其变异应小于试剂批间变异。

5.2.4 稳定性验证

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。开瓶有效期内检测性能和日常检测过程中处于不同排序样本的检测性能应与产品生产方声称的性能相符。

检测样本量较大的实验室应采用检出限浓度的样本进行日常检测可能的最大通量检测,进行加样稳定性评估。稳定性应确保检测通量最大时达到要求的分析灵敏度。

6 试剂批质检

6.1 试剂批质量报告

试剂生产厂商应提供每一批试剂的质量检测报告,至少应包括包装规格,外观状况以及分析灵敏度验证数据。其中分析灵敏度验证数据至少应包括0.5倍、1倍LOD验证数据中的1个和2-3倍LOD的验证数据。PCR检测方法应提供CT值的变异范围,TMA方法应提供S/CO值的比值变异范围。

6.2 实验室试剂验收

实验室应根据实际情况,选择适合的检测试剂和检测系统,除了试剂参数外,还要考虑场地环境、检测量、人员、实验室流程等因素。实验室应根据厂家说明书或补充材料中提供的技术参数来确认验收方法和流程。

实验室应对每个运输批次的试剂进行验收。验收内容应包括外观包装的完整性、生产日期、效期、运输的温度等；还应进行至少包括空白对照、阴性样本、阳性样本、室内质控品在内的检测实验。实验室应建立验收标准，以确保试剂的有效使用。验收的指标还应包括分析灵敏度以及室内质控检测信号比值，信号比指标变化应控制在30%以内或参考试剂生产厂商提供的技术参数。

7 应用常见问题

7.1 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。

7.2 假阳性产生的原因及处理措施

7.2.1 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

扩增产物是很小的核酸片段，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。此外基线波动，当信号超过阈值时也会出现非特异性，原因包括反应体系未充分混匀、荧光探针质量等。

7.2.2 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，应对污染区域用含氯消毒液进行彻底消毒，连续做三次沉降和擦拭测试均合格后，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。

7.3 污染监测方法

7.3.1 样本交叉污染监测

棉签沾去离子水（无RNA酶和DNA酶）分别擦拭生物安全柜外延左、中、右及中央4个位置、样本架随机位置4个，开盖机接触采血管部位、样本处理区冰箱门等，将棉签浸泡于2 mL 阴性浆3 min，漩涡震荡混匀后进行核酸检测。

确定出现样本污染，暂停相关实验，对实验室进行清洁。清洁完成后，重复上述监测步骤，直至实验结果均呈阴性。

7.3.2 气溶胶污染监测

将装有阴性血浆或棉签沾去离子水（无RNA酶和DNA酶）的离心管敞口放置于试剂准备区台面、生物安全柜（开风机）内、样本处理区实验台面、核酸提取设备内部、核酸扩增仪放置的台面等处。放置离心管包括两种方式，一是在核酸检测过程中放置，即动态放置，一般放置6-8小时；二是静态放置，即非检测时间放置，一般不少于16个小时。将放置后的离心管旋涡震荡混匀后进行核酸检测。

确认出现气溶胶污染时，暂停相关实验，对实验室进行清洁和/或通风。重复上述监测实验，直至实验结果呈阴性。

附 录 A
(规范性附录)
分析灵敏度建立的基本方案

根据EP17的建议，产品生产方建立分析灵敏度的实验方案至少应包括：

- 1) 2个批号试剂；
- 2) 1套检测系统；
- 3) 预期LOD值附近的4个低浓度水平样本(0.25倍LOD, 0.5倍LOD, 1倍LOD, 2倍LOD, 4倍LOD中的至少4个)
- 4) 实验应至少在不同的3天进行；
- 5) 样本在每套检测系统中，每天使用每个批号的试剂重复检测2次；
- 6) 最终整个实验应获得至少20个分析灵敏度水平的重复值。

评估时也可评估影响实验结果的因素后，在基本实验方案的基础上，增加更多的潜在影响因素（如操作人员、实际开瓶时间、仪器维护等），以增加重复检测次数，获得更多的检测结果，建立客观的性能验证方案，准确进行分析灵敏度验证。

实验结果可通过计算的检出率来判断性能验证是否通过。检出率，即检出结果与预计结果一致的样本个数占总样本数的比值。检出率应达到相应水平的临界值时。检出率的临界值与重复检测次数密切相关。通常，随着实验次数的增加，检出率临界值呈上升趋势。CLSI推荐的检出率临界值与重复检测次数关系见表A.1。如果实验测得检出率低于表中相应的临界值，即可判断性能验证失败，需要及时分析、查找影响结果的因素。

表 A.1 检出率临界值与重复检测次数关系

实验检测次数	检出比临界值
20	85%
30	87%
40	88%
50	88%
60	90%
70	90%
80	90%
90	91%
100	91%
150	92%
200	92%
250	92%
300	93%
400	93%
500	93%
1000	94%

血液检测实验室也可以根据自身情况，增加更多的评估因素，以获得更多的检测结果，最后通过Probit分析，建立实验室核酸检测体系常规使用情况下的LOD和95%置信区间。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会.《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.
- [6] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局《全国临床检验操作规程》第4版.
-