ICS 07.080

Q 8499

|  |
| --- |
|  |

团体标准

T/SZAS XX—20XX,T/LTIA XX—20XX,T/SAS XX—20XX

|  |
| --- |
|  |

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸qRT-PCR检测质量评价要求

Requirements of qRT-PCR for detecting of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) quality evaluation

|  |
| --- |
|  |
|  |

20XX - XX - XX发布

20XX - XX - XX实施

深圳市标准化协会

深圳市生命科技产学研资联盟

上海市标准化协会

发布

目  次

[前  言 II](#_Toc32918060)

[1 范围 1](#_Toc32918062)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc32918063)

[3 术语和定义 1](#_Toc32918064)

[4 缩略语 1](#_Toc32918068)

[5 质量评价要求 2](#_Toc32918069)

[6 质量评价指标和方法 2](#_Toc32918070)

[7 试剂和环境要求 4](#_Toc32918073)

[8 试剂盒要求 5](#_Toc32918077)

[9 结果描述 5](#_Toc32918081)

[10 废弃物处理及防止交叉污染的措施 6](#_Toc32918085)

前  言

本标准编写格式遵循了 GB/T 1.1-2009 给出的规则编写。

本标准由深圳华大因源医药科技有限公司提出。

本标准由深圳市标准化协会、深圳市生命科技产学研资联盟、上海市标准化协会联合归口。

本标准主要起草单位：深圳华大因源医药科技有限公司、深圳华大基因股份有限公司、上海海关、深圳标准化协会、深圳市生命科技产学研资联盟、上海市标准化协会、深圳华大基因科技有限公司、湖南圣湘生物科技公司、北京卓诚惠生生物科技股份有限公司、江苏宏微特斯医药科技有限公司、江苏奇天基因生物科技有限公司、北京万泰生物药业股份有限公司、深圳华大智造科技有限公司、深圳华大生命科学研究院。

本标准主要起草人：申奥、宫艳萍、吴红龙、陆晔、邓中平、张志强、刘利成、应清界、叶详忠、姜华艳、但丹、李陶莎、李倩一、吴昊、武庆超。

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸qRT-PCR检测质量评价要求

1. 范围

本标准规定了严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸qRT-PCR检测的质量评价的术语和定义、评价要求、评价指标和评价方法等。

本标准适用于提供严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸qRT-PCR检测服务的机构。

1. 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 21415-2008 体外诊断医疗器械 生物样品中量的测量 校准品和控制物质赋值的计量学溯源性

GB/T 37868-2019 核酸检测试剂盒溯源性技术规范

YY/T0657-2017 医用离心机

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。



Ct值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。



标准品 reference material

具有一种或多种足够稳定、均一和确定的特性值，用以对设备进行校准、对测量方法进行评价或为材料定值的物质或材料。

1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

qRT-PCR 荧光反转录-聚合酶链反应（Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

RNA：核糖核酸（Ribonucleic Acid）

RSD：相对标准偏差（Relative Standard Deviation）

SARS-CoV-2：严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2）

1. 质量评价要求

进行严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2实时荧光PCR检测质量评价应使用经验证过的计量方法计量过的SARS-CoV-2阳性对照品或经其他方法验证过的临床样本，使用经计量检定或校准的测量仪器进行质量评价。

1. 质量评价指标和方法
   1. 概述

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2实时荧光PCR的评价指标包括核酸提取、最低检测限、精密度、特异性、参考品验证及稳定性，如表1所示。

表1 新型冠状病毒检测试剂盒评价指标和要求

|  |  |
| --- | --- |
| 指标 | 要求 |
| 新型冠状病毒RNA提取纯化 | 无论检测试剂是否含有RNA分离/纯化的组分，企业或使用单位都应结合检测试剂的特性，对配合使用的核酸提取试剂/方法的提取效率、提取核酸纯度等做充分的验证。 |
| 最低检出限 | 不高于1×102copies/mL。 |
| 精密度 | 应符合变异系数（CV，%）≤5%。 |
| 特异性 | 易产生交叉反应的其他病原体核酸的验证情况，以列表的方式表示经过交叉反应验证的病原体名称、型别、浓度等信息。  注 1：干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响，如血红蛋白、甘油三酯、胆红素等，应注明可接受的最高限值。  注 2：药物影响：常用抗病毒药物、干扰素等对检测结果的影响，如未进行相关研究也应提供相关警示说明。 |
| 验证 | 应使用国家/国际参考品、企业参考品对试剂进行验证，重点观察对相应参考品检测结果的符合情况。 |
| 稳定性 | 应考察实时稳定性（有效期）、运输稳定性、开瓶稳定性及冻融次数限制 |

* 1. 定量检测试剂盒质量评价方法
     1. 新型冠状病毒RNA提取纯化

用经灭活的天然病毒或构建的假病毒对核酸提取试剂进行验证，使用与临床标本一致的基质，分析试剂/方法的提取效率、提取核酸纯度。

* + 1. 最低检出限

将含有严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2的真实临床样本/含有该病毒RNA片段的假病毒颗粒梯度稀释于（与适用样本一致的）适当基质中，用于进行最低检测限研究，应采用科学的方法标定病毒滴度。每个浓度梯度最少重复三次检测，以100%可检出的最低浓度水平作为估计检测限，在此浓度附近制备若干梯度浓度样品，每个浓度至少重复20次检测，将具有95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检测限。

* + 1. 精密度

精密度评价试验的每一次检测均应从核酸提取开始。针对本类产品的精密度评价主要包括以下要求。

1. 对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除检测试剂（包括核酸分离/纯化组分）本身的影响外，还应对分析仪、操作者、地点、检测轮次等要素进行相关的验证。
2. 设定合理的精密度评价周期，例如：为期至少20天的检测或者为期至少5天的检测，具体方案可参考EP文件进行。从而对批内/批间、日内/日间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。
3. 用于精密度评价的人工模拟样品和临床样本均应至少包含3个水平：阴性样品、临界阳性样品、（中或强）阳性样品，并根据产品特性设定适当的精密度要求，临床样本精密度评价中的每一次检测均应从核酸提取开始，要求如下：
4. 阴性样本：待测物浓度低于最低检测限或为零浓度，阴性检出率应为100%（n≥20）。
5. 临界阳性样本：待测物浓度略高于试剂盒的最低检测限，阳性检出率应≥95%（n≥20）。
6. 中/强阳性样本：待测物浓度呈中度到强阳性，阳性检出率为100%且CV≤10%（n≥20）。
   * 1. 参考品验证
        1. 阴性参考品符合率：检测国家/国际阴性参考品，结果符合国家/国际参考品的要求；或检测企业阴性参考品，结果符合企业参考品的要求。
        2. 阳性参考品符合率：检测国家/国际阳性参考品，结果符合国家/国际参考品的要求；或检测企业阳性参考品，结果符合企业参考品的要求。
        3. 精密度：检测国家/国际精密度参考品，结果符合国家/国际参考品的要求；或检测企业精密度参考品，结果符合企业参考品的要求。
        4. 灵敏度：检测国家/国际灵敏度参考品，结果符合国家/国际参考品的要求；或检测企业灵敏度参考品，结果符合企业参考品的要求。
     2. 特异性
        1. 交叉反应验证

交叉反应验证包括：

1. 地方性人类冠状病毒（HKU1，OC43，NL63和229E）、SARS冠状病毒、MERS冠状病毒；
2. H1N1（新型甲型H1N1流感病毒（2009）、季节性H1N1流感病毒）、H3N2、H5N1、H7N9，乙型流感Yamagata、Victoria，呼吸道合胞病毒A、B型，副流感病毒1、2、3型，鼻病毒A、B、C组，腺病毒1、2、3、4、5、7、55型，肠道病毒A、B、C、D组，人间质肺病毒、人偏肺病毒、EB病毒、麻疹病毒、人巨细胞病毒、轮状病毒、诺如病毒、腮腺炎病毒、水痘-带状疱疹病毒；
3. 肺炎支原体、肺炎衣原体；
4. 军团菌、百日咳杆菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、肺炎克雷伯菌、结核分枝杆菌；
5. 烟曲霉、白色念珠菌、光滑念珠菌、新生隐球菌等。
6. 建议在病毒和细菌感染的医学相关水平进行交叉反应的验证。通常，细菌感染的浓度水平为106 cfu/ml或更高，病毒为105pfu/ml或更高，提供所有用于交叉反应验证的病毒和细菌的来源、种属/型别和浓度确认等试验资料。
7. 人类基因组DNA。
   * + 1. 内源/外源物质干扰

应根据所采集样本类型，针对可能存在的干扰情况进行验证。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度（“最差条件”）条件下进行评价，在病毒临界阳性水平进行干扰试验验证。检测的潜在干扰物包括样本中的原有物质（如血液、鼻腔分泌物、粘液及用于缓解淤血、鼻噪、刺激或哮喘和过敏症状的鼻腔和咽喉药物、抗菌药物、抗病毒药物等）及在样本采集和制备期间引入的物质，如表2。

表2 推荐用于干扰试验的物质

|  |  |
| --- | --- |
| 物质 | 活性成分 |
| 粘蛋白 | 纯化粘蛋白 |
| 血液（人类） |  |
| 鼻腔喷雾剂或滴鼻剂 | 苯福林、羟甲唑啉、氯化钠（含防腐剂） |
| 鼻用皮肤类固醇 | 倍氯美松、地塞米松、氟尼缩松、曲安奈德、布地奈德、莫米松、氟替卡松 |
| 过敏性症状缓解药物 | 盐酸组胺 |
| 抗病毒药物 | α-干扰素、扎那米韦、利巴韦林、奥司他韦、帕拉米韦、洛匹那韦、利托那韦、阿比多尔 |
| 抗生素 | 左氧氟沙星、阿奇霉素、头孢曲松、美罗培南 |
| 全身性抗菌药 | 妥布霉素 |

* + 1. 稳定性
       1. 实时稳定性

将三批次试剂盒在相应储存条件下进行保存，在保存期限内不同时间进行抽取，对参考品进行检测，检测结果应符合要求。

* + - 1. 运输稳定性

按照试剂盒保存条件要求测试相应保存条件下不同运输时间对试剂盒的影响，参考实际运时间，可以测试3天、5天两个运输时间，以及运输后试剂盒储存在-18℃以下保存至效期的性能。通过考核指标评估运输后稳定性。

* + - 1. 开封稳定性及冻融次数稳定性

试剂盒要求-18℃以下保存，检测酶在冰盒上保存备用，检测反应液在室温融化开瓶，如此反复1次、2次、3次、4次、5次，通过考察反复冻融的试剂盒运输稳定性考核指标来评估试剂盒冻融次数稳定性。

1. 试剂和环境要求
   1. 保存

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2实时定量荧光PCR检测所用的相关试剂应在-18℃以下的条件下避光冻存，在试剂盒有效期内使用。待测样本需冷冻保存，-18℃以下保存不超过1周，-70℃以下冷冻保存不超过6个月。待测冷冻样本提取应当在样本完全融解后混匀进行。

* 1. 试剂要求
     1. 除另有规定外，所有实验室使用到的试剂应为不含DNA/RNA酶的化学试剂。
     2. 商品试剂盒应注明到货日期与开封日期，所有试剂应按规定要求进行存放。
     3. 实验室所有自配试剂应标明试剂名称、试剂浓度、配制日期、储存条件等信息。
     4. 不适合采用高压灭菌的试剂应进行过滤除菌，其余试剂应高压灭菌后使用。
     5. 样本应避免反复冻融，试剂反复冻融次数不得超过3次，提取后的样本RNA需尽快进行实验以避免降解。
     6. 实验用水应符合GB/T 6682的要求。
  2. 检测环境要求

实验室的设施和环境要求应符合GB/T 19495.2中的规定。实验室通用离心机应符合YY/T0657的要求。

1. 试剂盒要求
   1. 包装标识

包装完整、无破损，包装标识（包括名称、型号、规格、批次、生产日期、有效期、储存温度条件等）清晰、规范、齐全。

* 1. 指导性文件

试剂盒中应包含使用说明书或等同指导性文件。文件内容应包括但不限于以下内容：

1. 应明确试剂盒针对的用户；
2. 试剂盒的应用范围；
3. 对检测结果的表述与理解：说明如何表述检测结果；
4. 操作指南：明确检测要求的样本类型、检测步骤，包括完整的试验操作程序；
5. 注意事项：包括安全提示、废弃物处理、可能存在危害的操作步骤；
6. 质量合格证书；
7. 其他告知客户的事项。
   1. 溯源性文件

根据GB/T 21415和GB/T 37868有关规定，试剂盒中主要组分的标称特性值和量值应有溯源性，并在文件中进行描述。

1. 结果描述
   1. 检测报告内容

检测报告应包含但不限于下列信息：

——检测机构名称、联系方式和地址、检测员和检测时间；

——客户名称、客户单位、客户联系方式；

——样本是否判定为严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2检测阳性及相关判定依据。

* 1. 质量评价报告内容

质量报告应包含检测灵敏性、检测特异性、准确度、检测限、检测成功率、不确定度、准确率，及其重复性、再现性和批间差异。如有必要，还应包含检测的线性。

* 1. 结果描述
     1. 阴性判定

如果待测样本SARS-CoV-2通道检测扩增曲线不呈S型曲线，样本Ct值为0或者无Ct值，且内参通道检测Ct值≤32，判为阴性，即样本中无严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2。

* + 1. 阳性判定

如果待测样本SARS-CoV-2通道扩增曲线呈S型曲线，且Ct值≤37，判为阳性，即样本中有严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2。

* + 1. 疑似处理

如果待测样本SARS-CoV-2通道扩增曲线呈S型曲线，且Ct值在37-40之间，建议重复试验，若重做结果Ct值＜40，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

* + 1. 有效原则

如果待测样本SARS-CoV-2通道检测扩增曲线不呈S型曲线，样本Ct值为0或者无Ct值，且内参通道Ct＞32或无数值时，需重新检测。

1. 废弃物处理及防止交叉污染的措施

检测试验中产生的废弃物处理方式和防止交叉污染的措施应符合GB/T 19495.2的规定。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_