

团 体 标 准

T/SZAS 18—2020, T/LTIA 09—2020, T/SAS 0007—2020

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

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

2020 - 06 - 08 发布

2020 - 07 - 08 实施

深圳市标准化协会
深圳市生命科技产学研资联盟 发布
上海市标准化协会

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 缩略语	2
5 质量评价要求	2
6 质量评价指标和方法	2
7 试剂保存和使用要求	5
8 试剂盒标识和说明书要求	6
9 质量评价报告	7

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、深圳海关动植物检验检疫技术中心、上海国际旅行卫生保健中心、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、深圳华大基因科技有限公司、深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）、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、史卫军、宫艳萍、曾少灵、吴红龙、陆晔、徐良、刘尧、张志强、刘利成、应清界、叶祥忠、姜华艳、但丹、李陶莎、王荣昌、周颖、裘文阳、林骏、李倩一、吴昊、武庆超。

本标准属首次提出。

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

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 检测试剂盒质量评价的术语和定义、缩略语、质量评价要求、评价指标和方法、试剂保存和使用要求、标识和说明书要求、评价报告等。

本标准适用于开展严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 核酸 qRT-PCR 检测试剂盒的质量评价。

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 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

GB/T 37871-2019 核酸检测试剂盒质量评价技术规范

GB/T 20469-2006 临床实验室设计总则

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 37875-2019 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范

《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

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。

3.2

参考品 reference material

具有一种或多种足够均匀和很好地确定了特性,用以校准测量装置、评价测量方法或给材料复制的一种材料或物质。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

qRT-PCR: 荧光定量反转录-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)

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)

5 质量评价要求

5.1 环境要求

用于严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 核酸qRT-PCR检测试剂盒质量评价的实验室分区应满足《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》中的实验室区域设计原则, 实验室的检测环境工作台、储存、通风的设计要求应符合GB/T 20469-2006中3.2~3.4的规定。

5.2 试剂、仪器要求

用于严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 核酸qRT-PCR检测试剂盒质量评价的参考品应使用标准方法计量过的SARS-CoV-2阳性参考品或经其他方法验证过的临床样本, 用于质量评价的测量仪器, 应使用校准合格的测量仪器。

6 质量评价指标和方法

6.1 指标

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 核酸qRT-PCR检测试剂盒的评价指标包括RNA提取纯化、检出限、精密度、特异性、参考品验证、稳定性、试剂保存和使用要求、试剂盒标识和说明书要求等, 如表1所示。

表1 SARS-CoV-2 核酸 qRT-PCR 检测试剂盒质量评价指标和要求

指标	评估要求
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验证, 验证指标参照GB/T 37875中第4条进行评估。
检出限	对不同浓度病毒载量的样本进行检测, 病毒检测浓度不高于 5×10^2 copies/mL。
精密度	批内及批间精密度应符合变异系数 (CV, %) $\leq 10\%$ 。

特异性	交叉反应：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。交叉反应测试结果应为无交叉反应。 干扰物质：1、内源干扰物质，评估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。2、外源干扰物质，评估常用抗病毒药物、干扰素等对检测结果的影响，干扰物质测试结果应确定最大无干扰浓度。
参考品验证	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。在稳定性范围内的检符合率应为100%。
试剂保存和使用要求	试剂的储存和使用应该符合试剂盒说明书相应相应的要求。
试剂盒标识和说明书要求	包装标识应清晰、规范、齐全。至少包括产品名称、包装量、产品批号、储存条件、有效期、生产企业、注意事项和使用目的。

6.2 检测试剂盒质量评价方法

6.2.1 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，提取的核酸产量及纯度应满足GB/T 37875-2019中第5条的相关要求。

6.2.2 检出限

将含有严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 核酸的真实临床样本/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，用于进行检出限研究，应采用科学的方法标定病毒浓度，如数字PCR方法。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出限，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检出限。

6.2.3 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。针对本类试剂盒的精密度评价主要包括以下要求。

- a) 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。
- b) 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，根据检测试剂盒设定具体方案。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。
- c) 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：
 - 1) 阴性样本：待测物浓度低于检出限或为零浓度，阴性符合率应为100%，n为检测样本例数（ $n \geq 20$ ）。
 - 2) 临界阳性样本：待测物浓度略高于试剂盒的检出限，阳性检出率应 $\geq 95\%$ ，n为检测样本例数（ $n \geq 20$ ）。

- 3) 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 $CV \leq 10\%$ ， n 为检测样本例数（ $n \geq 20$ ）。

CV值计算公式如下：

$$CV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\%$$

式中：

n ——平行测试的样本数量，个；

x_i ——第 i 个样本的测试结果；

\bar{x} —— n 个样本的测试结果的平均值。

6.2.4 特异性

6.2.4.1 交叉反应验证

交叉反应验证包括以下来源的核酸：

- 地方性人类冠状病毒（HKU1, OC43, NL63和229E）、SARS冠状病毒、MERS冠状病毒；
- H1N1（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；
- 肺炎支原体、肺炎衣原体；
- 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；
- 烟曲霉、白色念珠菌、光滑念珠菌、新生隐球菌等。
- 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 10^6 cfu/ml或更高，病毒为 10^5 pfu/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。
- 人类基因组DNA。

以上物质存在的情况下，对严重急性呼吸系统综合征冠状病毒（SARS-CoV-2）核酸的检测应不存在交叉反应。

6.2.4.2 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。建议对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、鼻塞、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

以上干扰物质在不超过测试最大浓度条件下，对严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸的检测应无干扰。

6.2.5 参考品验证

6.2.5.1 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。

6.2.5.2 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。

6.2.5.3 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。

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。

6.2.6 稳定性

6.2.6.1 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6.2.5中参考品检测要求。

6.2.6.2 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，参考实际运输时间，推荐测试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。通过对参考品进行检测，检测结果应符合6.2.5中参考品检测要求。

6.2.6.3 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次后，通过对参考品进行检测，检测结果应符合6.2.5中参考品检测要求。

7 试剂保存和使用要求

7.1 保存

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）实时荧光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。

7.2 试剂使用要求

7.2.1 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。

7.2.2 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。

7.2.3 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、有效期、配制人员等信息。

7.2.4 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。

7.2.5 样本应避免反复冻融，提取后的样本RNA需立即进行实验以避免降解。

7.2.6 实验用水应符合GB/T 6682的要求。

8 试剂盒标识和说明书要求

8.1 包装标识

包装完整、无破损，包装标识清晰、规范、齐全。包装标识应该包括以下内容：

- a) 产品名称：通用名称，商品名称；
- b) 包装量：至少注明可测试的样本数；
- c) 产品批号：用字母或数字注明该批次产品的批号，以便能够追溯其生产记录；
- d) 储存条件：注明产品的储存条件：如-18℃以下保存；
- e) 有效期：注明在储存条件下的有效期；
- f) 生产企业：注明生产厂商的名称和地址；
- g) 注意事项：比如产品适用范围、不同批次之间组分禁止混用或其它使用中应注意的事项；
- h) 使用目的：尽可能通过产品的名称说明使用目的。注明“体外诊断用”。

8.2 指导性文件

根据GB/T 37871-2019中6.2有关规定，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：

- a) 应明确试剂盒针对的用户；
- b) 试剂盒的应用范围；
- c) 对检测结果的表述与理解：说明如何表述检测结果；
- d) 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；
- e) 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；
- f) 质量合格证书；
- g) 其他告知客户的事项。

8.3 溯源性文件

根据GB/T 21415-2008中第8条和GB/T 37868-2019中有关规定，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。

9 质量评价报告

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸qRT-PCR检测试剂盒的质量报告应包含RNA提取纯化、检出限、精密度、特异性、参考品的验证、试剂稳定性、试剂保存和使用要求、试剂盒包装标识和说明书要求等内容，并且全部结果应符合相应指标要求。
