

核酸扩增检测用试剂（盒）

1 范围

本标准规定了核酸扩增检测试剂（盒）【以下简称“试剂（盒）”】的术语和定义、命名和分类、技术要求、试验方法、标识、标签和说明书、包装、运输和贮存等。

本标准适用于核酸扩增检测试剂（盒）的质量控制。核酸扩增检测试剂（盒）应包括核酸提取、核酸扩增及产物分析试剂组份，如核酸扩增检测试剂（盒）内不含有核酸提取组份，应由生产企业说明或指定提取试剂（盒）。

本标准不适用于基因分型、基因芯片和病毒基因分型/突变检测用试剂（盒）及血源筛查的试剂（盒）。

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 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

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1 聚合酶链反应 polymerase chain reaction,PCR

聚合酶链反应或多聚酶链反应是一种对特定的 DNA 或 RNA 片段在体外进行快速扩增的方法，由变性-退火-延伸三个基本反应步骤构成。

3.2 PCR 杂交（膜上、板上）PCR hybridization

具有一定同源序列的两条核酸单链（DNA 或 RNA）可以通过氢键的方式，按碱基互补配对原则相结合，探针结合于特定核酸序列或 PCR 产物的杂交过程可以在液相中进行，也可以将其中一个固定在固相载体上进行。

3.3 PCR 电泳 PCR electrophoresis

根据 PCR 产物分子质量和所带电荷的不同在电场中进行分离的技术。

3.4 实时荧光 PCR real-time polymerase chain reaction,PCR

在 PCR 过程中利用荧光染料释放的荧光定量的变化直接反映出 PCR 扩增产物量的变化，荧光信号变量与扩增产物变量成正比，并通过对荧光的采集和分析以达到对原始模板量进行分析的 PCR。

注：在每个循环中检测扩增产物是否可被检测。

3.5 测量系统的线性 **linearity of a measuring system**

给出的测量结果与样品中被测量的值直接成比例的能力。

注 1：对与体外诊断医疗器械，线性相关于测量结果在一给定测量范围经校正或线性化以后的测量示值。

注 2：线性通过测量包含被测量已知配方或其间相对关系（不必绝对知道）的样本来评估。当测量结果相对被测量绝对或相对数值作图时，所画曲线对直线的符合程度及线性度的量度。

3.6 样本线性 **linearity of series diluted samples**

对高浓度样本进行系列稀释，得到的检测浓度对数值与稀释比例之间相关。

3.7 分析特异性 **analytical specificity**

测量程序只测量被测量的能力。

3.8 测量精密度 **precision of measurement**

在规定条件下，相互独立的测量结果间的一致程度。

注 1：测量精密度不能用于被测量有关的数字值表示，在指定目的下只能以“足够”或“不足”进行描述。

注 2：精密度的程度通常与精密度相反的测量不精密度统计量表示，如标准差和变异系数。

注 3：给定测量程序的“精密度”可以根据特定的精密度条件进行分类。“重复性”与基本不变的条件有关，常称为“序列内精密度”或“批内精密度”。“重现性”与条件改变有关，如：时间、不同实验室、操作者和测量系统（包括不同校准和试剂批号）。

3.9 计量学溯源性 **metrological traceability**

通过一条具有规定不确定度的不间断的比较链，使测量结果或测量标准的值能够与规定的参考标准，通常是与国家标准或国际标准联系起来特性。

注 1：通过校准传递方案确定的（参考）测量程序实现每一步比较。

注 2：溯源性有几种类型。本标准使用术语“计量学溯源性”。

3.10 检测限 **detection limit, limit of detection**

样品中以一定概率可被申明与零有差异的被测量的最低值。

注 1：也被描述为“最低检测限”（minimum detectable concentration）（或剂量或值）。

注 2：有时被不正确地指作分析灵敏度。

注 3: 本标准中的最低检测限为区别于零的不低于 95%可信区间的最低浓度。

3.11 定量限 limit of quantitation

给定分析程序能定量检测分析物的最小浓度或量。

3.12 阈值循环数 Ct (Cp) cycle threshold,crossing point

实时监测扩增过程中，反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前 3 到 15 个循环的荧光值的 10 倍标准差为阈值，当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数 (Ct)。

3.13 基因型 genotype

一个有机体的遗传组成，即明确界定具体等位基因位点的基因组。

3.14 内标 internal control

在同一反应管中与靶序列共同扩增的一段非靶序列分子，其目的是鉴别仪器故障、试剂因素、聚合酶活性因素或样本中存在抑制物等造成的结果不理想的原因。

4 命名和分类

4.1 命名

***核酸 (DNA 或 RNA) 扩增检测试剂 (盒) (方法学)。

4.2 分类

可按如下方式分类：

- a) 根据核酸扩增检测分析采用的方法学原理分为：实时荧光 PCR 试剂 (盒)、RT-PCR 试剂 (盒)、PCR 杂交检测试剂 (盒)、PCR-电泳法检测试剂 (盒) 等。
- b) 根据对试验结果的判定可分为：定量和定性。

5 技术要求

5.1 外观

外观应满足以下条件：

- a) 试剂（盒）应符合生产企业规定的外观要求；
- b) 试剂（盒）应组份完全，包装外观清洁、无泄漏、无破损；标志、标签字迹清楚。

5.2 溯源性

生产企业应根据 GB/T 21415-2008 及有关规定提供所用核酸标准品的来源、溯源的赋值过程和相应要求，以及测量不确定度等内容。

5.3 测量系统的线性

5.3.1 样本线性

线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

5.3.2 试剂（盒）系列标准品线性

试剂（盒）标准品应不少于 4 个浓度，宜包含线性范围上限和下限，线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

5.4 准确度

5.4.1 定性试剂

对阳性参考品进行测定，检测结果应为阳性。

5.4.2 定量试剂

准确度应符合如下要求之一：

- a) 检测国家标准品（或参考品）/国际标准品（或参考品），绝对偏差不超过 ± 0.5 个对数数量级；
- b) 回收试验：回收率在 85%~115% 范围内。

5.5 分析特异性

分析特异性应满足以下要求：

- a) 检测一定数量的不含被测物的样本，结果应为阴性；
- b) 检测可能引起非特异反应的样本，如与被测物种属相近、感染部位相同或感染症状相似的其他样本，结果应为阴性。

5.6 亚型检测能力

检测生产企业规定试剂检测范围内国内常见亚型，应能检出。

注：只有当分析物具有不同亚型时应满足此项要求。

5.7 精密度

5.7.1 定性试剂

批内精密度应符合 Ct 值的变异系数 (CV,%) $\leq 5\%$

5.7.2 定量试剂

批内精密度应符合检测浓度对数值的变异系数 (CV,%) $\leq 5\%$ 。

5.8 检测限/定量限

5.8.1 定性试剂

检测限应符合生产企业声称的值。

5.8.2 定量试剂

定量限应符合生产企业声称的值。适用时，检测限应符合生产企业声称的值。

5.9 干扰物质

对血液样本，检测含有生产企业规定浓度的干扰物质如血红素及其代谢产物、脂血等样本，及含过量 EDTA 抗凝剂的样本，应符合生产企业规定的要求。

5.10 稳定性

可选用以下方法进行验证：

- a) 效期稳定性：生产企业应规定产品的有效期。取到效期后的样品检测测量线性、准确度、分析特异性、亚型检测能力、精密度、检测限/定量限、干扰物质，应分别符合 5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 的要求。
- b) 热稳定性试验：测量线性、准确度、分析特异性、亚型检测能力、精密度、检测限/定量限、干扰物质，应分别符合 5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 的要求。

注 1：热稳定性不能用于推导产品有效期，除非是采用基于大量的稳定性研究数据建立的推导公式。

注 2：根据产品特性可选择 a),b)方法的任意组合，但所选用方法宜能验证产品的稳定性，以保证有效期内产品性能符合标准要求。

6 试验方法

6.1 外观

在自然光下目视检查外观，结果应符合 5.1 的要求。

6.2 溯源性

生产企业提供的溯源性资料应符合 5.2 的要求。

6.3 测量系统的线性

6.3.1 样本线性

在生产企业规定的线性范围内，取接近线性范围上限的高值样本按一定比例（例：5 倍或 10 倍）稀释为至少 5 种浓度，其中低值浓度样本需接近线性范围的下限。按试剂（盒）说明书进行操作，将每一浓度样本重复检测 3 孔，计算每一浓度的对数值和 Ct 均值，以浓度的对数值为 Y，Ct 均值为 X,进行线性拟合，计算其线性相关系数 r,结果应符合 5.3.1 的要求。

6.3.2 试剂（盒）系列标准品线性

按试剂（盒）说明书进行操作，试剂（盒）中每一标准品重复检测 3 孔，计算每一标准品的标示浓度的对数值与 Ct 值的均值，以浓度的对数值为 Y, Ct 均值为 X,进行线性拟合，计算其线性相关系数 r，结果应符合 5.3.2 的要求。

6.4 准确度

6.4.1 定性试剂

对阳性参考品进行测定，检测结果应符合 5.4.1 的要求。

6.4.2 定量试剂

建议按如下优先顺序，采用下列方法之一测试定量试剂（盒）的准确度，应符合 5.4.2 的要求。

a) 绝对偏差

用试剂盒对参考物质或有证参考物质（CRM）和相应的参考测量程序按照符合 GB/T 21415-2008 规定的溯源顺序进行测试，重复测定 3 次，取测试结果均值（M）,按公式（1）计算绝对偏差（B）,结果应符合 5.4.2a)的要求。

或用有参考方法定值的高、中、低 3 个浓度的样本（可参照 EP6-A 的要求适当添加被测物，以获得高浓度的样品）对试剂（盒）进行测试，每个浓度样品重复测定 3 次，分别取测试结果均值，按公式（1）计算绝对偏差，结果应符合 5.4.2a)的要求。

$$B=M-T \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

B-绝对偏差；

M-测试结果均值；

T-参考物质标示值，或各浓度人血清定值。

b)回收试验

在样品中加入一定体积标准溶液（标准溶液体积与样本体积比应不大于 1:20，或其体积比不会产生基质的变化，加入标准溶液后样品总浓度必须在试剂（盒）测定线性范围内），重复

测定 3 次，取平均值，按公式（2）计算回收率，结果应符合 5.4.2b)的要求。

$$R = \frac{c \times (V_0 + V) - c_0 \times V_0}{V \times c_s} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

R-回收率；

V-加入标准溶液的体积；

V₀-样品的体积

c-样品加入标准溶液后的测定浓度

c₀-样品的测定浓度

c_s-标准溶液的浓度

6.5 分析特异性

检测可能引起非特异反应的样本，如与被测物种属相近、感染部位相同或感染症状相似的其他样本，结果应符合 5.5 的要求。

6.6 亚型检测能力

检测生产企业规定实际检测范围内国内常见亚型样本，样本个数应至少一个亚型有一个样本，检测结果应符合 5.6 的要求。

6.7 精密度

6.7.1 定性试剂（盒）

用至少高、低 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次，计算 C_t 值变异系数（CV,%），结果应符合 5.7.1 的要求。

6.7.2 定量试剂（盒）

用至少高、低 2 个浓度水平的样本各重复检测 10 次，其浓度对数值变异系数（CV,%）应符合 5.7.2 的要求。

6.8 检测限/定量限

6.8.1 定性试剂

检测生产企业生产浓度值的样本 20 次，至少 17 次检测结果符合 5.8.1 要求。

6.8.2 定量试剂

检测生产企业声称浓度值的样本 25 次，至少 22 次检测结果符合 5.8.2 要求。

6.9 干扰物质

按照生产企业规定的方法进行检测，结果应符合 5.9 的要求。

6.10 稳定性

可选用以下方法进行验证：

- a) 效期稳定性：取到效期后的样品进行检测，应符合 5.10a) 的要求。
- b) 热稳定性试验：取有效期内样品按生产企业规定的方法进行检测，应符合 5.10b) 的要求。

7 标识、标签和使用说明书

7.1 标识、标签

试剂（盒）外包装上的标识、标签应至少包括以下内容：

- a) 产品名称、型号或规格；
- b) 生产企业名称、地址、联系方式；
- c) 医疗器械注册证书编号；
- d) 产品标准编号；
- e) 主要成份；
- f) 产品用途、适用范围；
- g) 贮存方法；
- h) 生产日期或批号，有效期限。

7.2 使用说明书

试剂（盒）包装内应放置使用说明书，使用说明书应至少包括以下内容：

- a) 产品名称、型号或规格；
- b) 生产企业名称、地址、联系方式及售后服务单位；
- c) 《医疗器械生产企业许可证》编号、医疗器械注册证书编号；
- d) 产品标准编号；
- e) 主要成份；
- f) 产品用途、适用范围；
- g) 注意事项；
- h) 详细使用说明；
- i) 贮存方法；
- j) 生产日期或批号，有效期限。

8 包装、运输和贮存

8.1 试剂（盒）应采用适宜的包装容器。

8.2 试剂（盒）的包装应能满足合同规定的要求，保证产品包装在长途运输中不受损坏，不

泄漏。

8.3 试剂（盒）应在符合规定的条件下贮存。

附录 A

(规范性附录)

对体外诊断用 HIV、HBV、HCV 核酸扩增检测试剂盒产品设计要求

体外诊断用 HIV、HBV、HCV 核酸扩增检测试剂盒产品设计要求：

- a)在产品设计中，应加入全程参与的内标；
- b)在扩增检测前，样品（含质控品、标准品）应进行核酸提取、纯化；
- c)核酸加样体积不小于 20ul;总反应体积不小于 40ul.