

附件：3306 血液制品生产用人血浆病毒核酸检测技术要求公示稿

本通则适用于血液制品生产用人血浆的乙型肝炎病毒 (HBV-DNA)、丙型肝炎病毒 (HCV-RNA)、I 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1-RNA) 的核酸检测。**人细小病毒 B19 (Human Parvovirus B19) 核酸检测也可参考本技术要求。**

本通则系采用核酸检测技术 (Nucleic Acid Testing, NAT) 直接检测病原体核酸。NAT 敏感性高, 可检出标本中存在的微量核酸, 相对于抗体和抗原酶联免疫检测方法可以明显缩短病毒检出期限, 降低血液传播病毒的风险。目前应用于血液筛查的 NAT 主要为 PCR 和转录介导的扩增系统 (TMA) 方法。

(1) PCR 方法 是一种体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术, 具有高灵敏性、高特异性和快速简单等优势。其基本原理为: PCR 是 DNA 片段或 RNA 经逆转录成 cDNA 后的特异性体外扩增的过程。反应体系以 DNA 或 cDNA 为模板, 在 DNA 聚合酶的催化下, 经高温变性、低温退火、适温延伸等 3 步反应循环进行, 使目的 DNA 得以指数级扩增, 其扩增产物可通过多种特异性和敏感性好的方法进行分析。通过技术改进, 目前已派生出不同的 PCR 方法。

(2) 逆转录依赖的扩增方法 包括 TMA 和核酸序列依赖扩增系统 (NASBA)。TMA 是一种利用逆转录酶、RNA 酶 H 和 RNA 聚合酶的共同作用, 在等温条件下扩增 RNA 或 DNA 的反应体系, 主要原理为: 目标序列在逆转录酶作用下, 以引物为引导进行逆转录, RNA 酶 H 将杂合链上的 RNA 降解后, 形成转录复合体, 并在 RNA 聚合酶作用下, 转录形成大量目标 RNA 序列, 且转录形成的 RNA 又可以作为下一个循环的模板。NASBA 与 TMA 原理相似, 只是在核酸提取和扩增产物的检测方法上有所不同。

供试品 (1) 供试品处理过程中应采取措施 (如控制供试品处理时间和温度), 确保核酸序列的稳定性。

(2) 如使用抗凝剂, 则应选择对反应体系无干扰的抗凝剂, 并经评估后使用。肝素是 Taq DNA 聚合酶的强抑制剂, 使用 PCR 方法时应不予采用, 可考虑采用 EDTA 及枸橼酸钠等其他抗凝剂。

(3) 应根据验证结果确定供试品的贮存和运输条件, 以确保供试品中待检病毒核酸序列的稳定性。供试品若在 72 小时内进行检测, 可存放于 2~8℃; 72 小时以上, 应保存于 -20℃ 及以下。

检测试剂 检测试剂应为经批准的用于混合血浆核酸检测用试剂。检测试剂的贮存、运输及使用应按试剂盒使用说明书进行。

测定法 (1) 供试品混合 在确保检测试剂灵敏度的前提下, 应按试剂盒使用说明书规定的供试品数量及相关要求, 将多个供试品分别等量抽取再混合制备混合样的供试品。制备过程应确保每份供试品与混合供试品能够互相追溯。

进行供试品混合时应有预防交叉污染的措施, 操作过程中尽可能减少气溶胶的形成, 以避免供试品交叉污染而导致假阳性结果的出现。

(2) 核酸提取、扩增及检测 按照核酸检测试剂盒说明书进行。

(3) 对照设立 为保证实验结果可靠, 应按照试剂盒说明书要求在核酸检测过程设置相应对照, 一般包括内质控、阴性对照和阳性对照。

① 内质控 除另有规定, 内质控一般是指含有引物结合位点的特定核酸序列。

内质控在供试品核酸提取前加入，与供试品一同提取、逆转录、扩增、检测，用以监测核酸提取、逆转录、扩增和检测的全过程。

②阴性对照 尽可能选择与待测供试品基质相同或相近、不含靶序列的阴性对照。

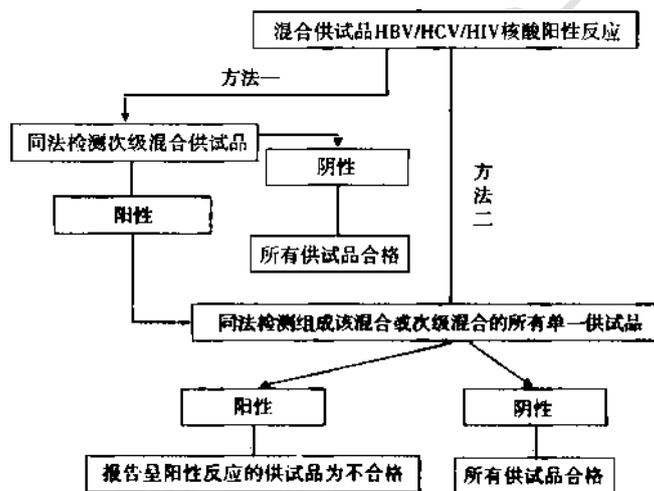
③阳性对照 尽可能选择与待测供试品基质相同或相近、含有适量靶序列的阳性对照。

上述对照应符合检测试剂盒规定的要求，检测结果方可视为有效。

结果判定 (1) 应按照所用检测试剂说明书的要求对检测结果进行评价与判断。

(2) 当混合供试品检测呈阴性反应时，则对应的单一供试品检测结果作阴性处理。

(3) 当混合供试品检测呈阳性反应时，则按下述程序实施进一步检测。



(4) 如混合供试品进行定量 PCR 核酸检测(如 B19 检测)，呈反应性且高于控制限时，可参照上述定性检测阳性程序或试剂盒说明书进行进一步检测。定量控制限应与实验方案同时确立。

质量控制 (1)人员要求 核酸检测人员需经上岗培训和在岗持续培训。上岗培训内容应至少包括：核酸检测技术及实验室管理要求，实验操作技能，质量控制，生物安全。要求掌握相关专业知识和技能，能独立熟练地操作，并经考核合格。在岗持续培训指在工作中根据需要接受培训，要求了解相关技术、质控及安全方面的新进展。实验室在使用新方法前，须对技术人员进行培训。

(2) 实验室要求 为保证操作人员和环境的生物安全，避免供试品的交叉污染，病毒核酸检测实验室应符合国家生物实验管理的相关要求，同时还应满足以下要求。

①实验室分区应按照核酸检测设备的实际情况进行设置。一般而言，核酸扩增前区和核酸扩增后区应分开。核酸扩增前区包括试剂准备区和供试品处理区，设在不同房间或区域；核酸扩增后区包括扩增区和扩增产物分析区，设在不同的房间或区域。应根据分区的功能要求，合理设定工作程序和设施、设备安置。

②实验室应配备相应的检测设备、冷藏设施及生物安全防护设施等；各区域的设施和设备为该区域专用，不得交叉使用；计量器具和关键设备按规定检定、校准或验证。

③实验室核酸检测系统应经过有效性验证，验证包括实验仪器、设备和方法学

验证。定性检测方法学验证应包括检测限、专属性等项目，定量检测方法学验证还应包括准确度、线性等项目。

④实验室生物安全和污染废弃物的处理应符合国家生物安全等相关要求。应定期对实验室环境进行监测，以确保检测实验室污染预防措施有效运行；应建立病毒污染的应急处理措施，一旦发生污染时，应及时查找污染源并清除污染后方可重新启用实验室和相关设施、设备。

(3) 实验室的质量控制 应定期开展实验室的质量评价，以保证检测体系的稳定和检测结果的准确可靠。

(4) 数据管理 应记录并管理包括供试品采集、供试品混合、核酸提取、扩增反应、扩增产物分析及最终结果报告等相关的所有数据和信息。

起草单位：中国生物技术股份有限公司

电话：010-84663377

修订说明：

1、增加人细小病毒 B19 (Human Parvovirus B19) 核酸检测也可参考本技术要求的内容。

2、增加了混合供试品进行定量 B19 PCR 核酸检测时，呈反应性且高于控制限时的处理要求。

3、增加定性和定量检测方法学验证应包含的项目。

征求意见稿