

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号



# 中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ ISO/TS17822-1:2014

---

## 体外诊断检测系统 病原微生物检测和鉴定 用的核酸定性体外检验程序 第 1 部分：通用要求、术语和定义

*In vitro* diagnostic test systems – Qualitative nucleic acid-based *in vitro* examination procedures for detection and identification of microbial pathogens – Part 1: General requirements, terms and definitions

(ISO/TS 17822-1:2014, IDT)

征求意见稿

2019-7-13

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

---

国家市场监督管理总局

中国国家标准化管理委员会 发布



## 目次

前言 .....	2
引言 .....	3
体外诊断检测系统 病原微生物检测和鉴定用的核酸定性体外检验程序 第1部分：通用要求，术语和定义 .....	4
1 范围 .....	4
2 规范性引用文件 .....	4
3 术语和定义 .....	4
4 核酸体外诊断检验原则 .....	11
4.1 通用原则 .....	11
4.1.1 设计和开发 .....	11
4.1.2 医学实验室实施与使用 .....	11
4.2 标本收集，运输和储存条件 .....	12
4.3 目标核酸序列的选择 .....	12
4.4 引物（或引物序列）的选择 .....	12
4.5 核酸制备和稳定性 .....	12
4.6 核酸扩增 .....	12
4.7 核酸检测和鉴定 .....	13
4.8 试剂稳定性与储存条件 .....	13
5 性能特征 .....	13
5.1 通用要求 .....	13
5.2 具体要求 .....	14
5.3 质量控制和质量保证程序 .....	15
5.4 结果报告 .....	16
6 风险管理 .....	16
6.1 通用 .....	16
6.2 设计和开发风险管理 .....	17
6.3 医学实验室风险管理 .....	17
参考文献 .....	18

# 前 言

GT/T xxxxx《体外诊断检测系统 病原微生物检测和鉴定用的核酸定性体外检验程序》计划由以下部分组成：

第1部分：通用要求、术语和定义

第2部分：医学实验室质量操作指南

本部分为GT/T xxxxx的第1部分

本部分按照 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

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

本部分使用翻译法等均采用 ISO/TS 17822-1:2014《体外诊断检测系统 病原微生物检测和鉴定用的核酸定性体外检验程序 第1部分：通用要求、术语和定义》。

与本部分中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

——YY/T 0287-2003医疗器械质量管理体系用于法规的要求（ISO 13485:2003，IDT）

——YY/T 0316-2008医疗器械风险管理对医疗器械的应用（ISO 14971:2007，IDT）

——GB/T 22576.1-2018医学实验室质量和能力的要求第1部分：通用要求（ISO 15189:2012，IDT）

——GB 19781-2005医学实验室安全要求（ISO 15190:2003，IDT）

——GB/T29791.1-2013体外诊断医疗器械. 制造商提供的信息(标签)第1部分术语、定义和通用要求(ISO 18113-1:2009，IDT)

——GB/T29791.2-2013体外诊断医疗器械制造商提供的信息(标示)第2部分：专业用体外诊断试剂(ISO 18113-2:2009，IDT)

——GB/T29791.3-2013体外诊断医疗器械制造商提供的信息(标签)第3部分专业用体外诊断仪器(ISO 18113-3:2009，IDT)

——YY/T 1579-2018体外诊断医疗器械体外诊断试剂稳定性评价（ISO 23640:2011，IDT）

本部分由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本部分起草单位：北京市医疗器械检验所、中国合格评定国家认可中心、深圳华大基因股份有限公司和中山大学达安基因股份有限公司。

本部分主要起草人

## 引 言

基于核酸的体外诊断检验程序目前常用于实验室医学中微生物病原体的检测和鉴定。这些检验程序对于检测不易培养的感染原特别有价值。与核酸扩增和检测技术（分子诊断）体外诊断检验程序的近期进展和当前实践相关的综述，参见参考文献[38],[35],[36],[37],[39],[41],[42]。

ISO/TS 17822-1 对用于人体样本中微生物病原体检测和鉴定的体外诊断定性核酸检验程序的相关概念进行了界定，并建立了其设计、开发和性能方面的通用原则。

传统的 PCR 检验程序通常包括三个步骤：（1）样品制备和核酸提取，（2）核酸扩增，（3）核酸的检测和鉴定。分析技术持续发展，最近的动力学方法（“实时 PCR”）将检测并入了扩增步骤中，多重 PCR 则将整个系统进行了整合。

由于核酸检验过程固有的复杂性和优良的分析敏感性，需要对其设计、开发和使用特别注意，注意事项包括分析和临床性能的确立、使用说明的文件化、医学实验室设施的设计、适当的质量保证措施的实施，由医学实验室在实际使用条件下对性能特征的验证，以及风险的管理。

与所有体外诊断检验程序一样，作为开发过程的一部分，必须证明以核酸为基础的检验程序适合其预期的临床用途。为检测和鉴定目标病原体，必须确定和验证分析性能特征。临床表现特征必须根据临床证据来确定和验证，包括评估对患者的益处和风险。使用说明必须明确文件化，必须规定有效的质量保证程序。

在对患者标本进行检验之前，检验程序是否正确执行必须由医学实验室在实际使用条件下进行验证。即必须以客观证据证明，验证过的检验程序已成功地从实验室或 IVD 制造商移植到医学实验室终端。在这一转移之后，对检验程序的任何修改可要求验证，验证其分析性能和/或临床表现是否仍然适用于其预期用途，包括重新评估修改可能导致的任何风险。

# 体外诊断检测系统 病原微生物检测和鉴定用的核酸定性体外检验程序 第1部分：通用要求，术语和定义

## 1 范围

本部分适用于

- 开发基于核酸的定性体外诊断检验程序,用于检测和鉴定人类标本中的微生物病原体的体外诊断医疗器械制造商、医学实验室和科研实验室以及
- 为检测和鉴定人类标本中的微生物病原体而进行基于核酸的体外诊断检验的医学实验室。

本部分不适用于

- 预期用途不是体外诊断的核酸检验, 或
- 基于核酸的定量体外诊断检验程序。

## 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。

ISO 13485:2003 医疗器械质量管理体系用于法规的要求 (Medical devices—Quality management systems—Requirements for regulatory purposes)

ISO 14971:2007 医疗器械风险管理对医疗器械的应用 (Medical devices—Application of risk management to medical devices)

ISO 15189:2012 医学实验室质量和能力的专用要求 (Medical laboratories—Particular requirements for quality and competence)

ISO 15190:2003 医学实验室安全要求 (Medical laboratories—Requirements for safety)

ISO 18113-1:2009 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标签).第1部分术语、定义和通用要求 (*In vitro* diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 1: Terms, definitions and general requirements)

ISO 18113-2:2009 体外诊断医疗器械制造商提供的信息(标签) -第2部分供专业人士使用的体外诊断试剂》 (*In vitro* diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 2: *In vitro* diagnostic reagents for professional use)

ISO 18113-3:2009 体外诊断医疗器械制造商提供的信息(标签) 第3部分专业用体外诊断仪器》 (*In vitro* diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 3: *In vitro* diagnostic instruments for professional use)

ISO 23640:2011 体外诊断体外诊断试剂稳定性评价 (*In vitro* diagnostic medical devices — Evaluation of stability of *in vitro* diagnostic reagents)

BIPM JCGM 200:2012 国际计量学词汇-通用、基本概念及相关术语第三版 (International vocabulary of metrology— Basic and general concepts and associated terms(VIM), 3rd edition)

## 3 术语和定义

在本文件中,术语和定义由ISO 13485、ISO 14971、ISO 18113-1、JCGM200给出。

注:ISO 18113-1来源的术语和定义优先于其他来源的。

## 3.1

**扩增产物** amplification product

**扩增子** amplicon

由目标扩增反应产生的核酸产物。

注1: PCR 反应产生的扩增子为双链 DNA; 基于核酸序列的扩增反应或转录介导的扩增反应产生的扩增子主要为单链 RNA

## 3.2

**分析性能** analytical performance

检验程序测量或检测特定分析物的能力。

[改写自GHITF/SG5/N 6:2012, 4.4.1]

注1: 分析性能由分析性能研究决定, 该研究被用于评估体外诊断检验程序测量或检测特定分析物的能力。

注2: 分析性能特征可以包括分析灵敏度、检出限、分析特异性(干扰与交叉反应性)、正确度、精确度与线性。

## 3.3

**分析特异性** analytical specificity

测量系统的能力, 用指定的测量程序, 对一个或多个被测量给出的测量结果互不依赖也不依赖于接受测量的系统中的任何其它量。

[引自: ISO 18113-1:2009, A.3.4]

注1: 缺乏分析特异性称为分析干扰(参见 ISO 18113-1:2009, A.3.2)。

注2: 免疫化学测量程序缺少分析特异性可能是由于交叉反应(参见 ISO 18113-1:2009, A.3.12)。

注3: 测量程序的特异性不应与临床特异性混淆(参见 ISO 18113-1:2009, A.3.16)。

注4: 对于该概念, JCGM 200:2008 使用了选择性而非特异性。

注5: 对于定性与半定量检验程序, 分析特异性取决于获得与参考方法一致的阴性结果的能力。

## 3.4

**退火** annealing

在特定条件下核酸互补链的杂交过程, 例如: 引物或探针与互补的目标核酸序列结合。

[引自: ISO 22174:2005, 3.4.15]

## 3.5

**临床准确度** clinical accuracy

**诊断准确度** diagnostic accuracy

(检验医学)检验程序区分有特定情况的患者和没有特定情况的患者的能力。

[引自: CLSI EP29-A]

注1: 临床准确性的测量包括临床敏感性与临床特异性。

注2: 临床准确性受靶标疾病的患病率或环境的影响。在敏感性与特异性相同时, 特定检验程序的临床准确性将随疾病患病率降低而升高。

## 3.6

**临床评价** clinical evaluation

(检验医学)对临床证据进行评估和分析, 以验证体外诊断检验程序的临床安全性和有效性。

[引自: 基于GHITF/SG5/N2R8:2007]

## 3.7

**临床证据** clinical evidence

(检验医学)证明某一特定用途的科学有效性和性能的所有信息。

[改写自: GHITF/SG5/N 6:2012, 4.2]

注1：临床证据或数据可包括体外诊断检验程序的任何临床调查或研究的结果，科学文献中报告的相关研究的结果，以及已发表或未发表的其他临床经验（如不良事件报告）。

注2：临床证据用于支持 IVD 医疗设备的认证，包括任何关于该设备或检验程序的科学有效性和性能的声明。

### 3.8

#### 临床性能 clinical performance

（检验医学）体外诊断检验程序是否能够根据目标人群和预定使用者的情况得出与特定临床条件或生理状态相关的结果。

[改写自：GHTF/SG5/N 6:2012, 4.4.2]

注1：虽然有时被称为诊断性或临床有效性；临床性是全球协调工作队（GHTF）及其后续机构国际医疗器械监管论坛（IMDRT）认可的统一术语。

注2：对临床表现的评价往往依赖于其他类型的临床检验的结果来定义“真正的阳性或真阴性”的结果。

### 3.9

#### 临床灵敏度 clinical sensitivity

#### 诊断灵敏度 diagnostic sensitivity

（检验医学）体外诊断检验程序可以识别与特定疾病或状态相关的目标标志物存在的能力。

[引自：ISO 18113-1:2009, A.3.15]

注1：在目标标志物已知存在的样品中也定义为阳性百分数。

注2：诊断灵敏度以百分数表达（数值分数乘以 100）。以  $100 \times \text{真阳性值数 (TP)} / (\text{真阳性值数 (TP)} + \text{假阴性值数 (FN)})$  的和来计算，或  $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$ 。此计算基于从每个对象中只取一个样品的研究设计。

注3：目标状态由独立于被考察检验程序的标准定义。

### 3.10

#### 临床特异性 clinical specificity

#### 诊断特异性 diagnostic specificity

（检验医学）体外诊断检验程序可以识别特定疾病或状态相关的目标标志物不存在的能力。

[引自：ISO 18113-1:2009, A.3.16]

注1：在目标标志物已知不存在的样品中也定义为阴性百分数。

注2：诊断特异性以百分数表达（数值分数乘以 100）。以  $100 \times \text{真阴性值数 (TN)} / (\text{真阴性值数 (TN)} + \text{假阳性值数 (FP)})$  的和来计算，或  $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$ 。此计算基于从每个对象中只取出一个样品的研究设计。

注3：目标状况由独立于被考察检验程序的标准定义。

### 3.11

#### 临床用途 clinical utility

（检验医学）体外诊断检验结果的效用以及这些<sup>2</sup>信息对患者和（或）广大民众的价值。

[改写自：GHTF/SG5/N 6:2012, 4.7]

注1：临床用途支持患者管理的临床决策，例如有效的治疗或预防策略。

### 3.12

#### 互补DNA complementary DNA

#### cDNA

与在逆转录酶存在下合成的与给定的RNA互补的单链DNA，作为合成DNA拷贝的模板。

### 3.13

#### 污染物 contamination

引入的非预期的材料或物质。

### 3.14

#### 临界值 cut-off value

（检验医学）用于鉴别样品，作为判断特定疾病、状态或被测量存在或不存在的界限的量值。

注1：测量结果高于临界值被认为是阳性而低于临界值被认为是阴性。

注2：测量结果接近临界值可被认为是非确定性。

注3：临界值的选择决定检验的诊断特异性和诊断灵敏度。

[引自：ISO 18113-1:2009, 定义 A.3.13]

### 3.15

**变性 denaturation**

破坏或改变分析物的结构、功能、酶或抗原特性的物理和/或（生物）化学处理。

[引自：ISO 21572:2013, 3.1.6]

注1：DNA的变性导致双链DNA分离为单链DNA

### 3.16

**脱氧核糖核苷三磷酸 deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP**

含有脱氧腺苷三磷酸，脱氧胞苷三磷酸，脱氧鸟苷三磷酸，脱氧胸苷三磷酸和/或脱氧尿苷三磷酸的溶液。

[引自：ISO 22174:2005, 3.3.7]

### 3.17

**检出限 detection limit, limit of detection**

通过给定的测量程序获得的测量量值，其中虚假声称材料中不存在成分的概率为 $\beta$ ，给出虚假声称其存在的概率 $\alpha$ 。

[改写自：JCGM 200:2008, 4.18, 已删除注释]

注1：术语分析灵敏度有时用于表示检出限，但现在不鼓励这种用法。更多信息参见ISO 18113-1:2009, A.2.7与A.2.8。

注2：在基于核酸的鉴定检验中，检出限为方法特定的实验条件下规定量的基质中可以被恒定检出的靶标微生物的最低浓度或含量。

[引自：ISO 22174:2005, 3.1.8]

### 3.18

**脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid, DNA**

以双链(dsDNA)或单链(ssDNA)形式存在的脱氧核糖核苷酸聚合物。

[引自：ISO 22174:2005, 3.1.2]

### 3.19

**PCR用DNA聚合酶 DNA polymerase for PCR**

反复催化DNA合成的耐热酶。

[引自：ISO 22174:2005, 3.4.17]

### 3.20

**DNA测序 DNA sequencing**

确定DNA分子中碱基（腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶）顺序的方法。

注1：序列一般从5'端开始描述。

### 3.21

**设备确认 equipment qualification**

通过检查、测试和文件确认正确的设备已按照事先确定的要求正确安装和运行。

### 3.22

**外扩增对照 external amplification control**

以确定量或拷贝数添加到一份分装的提取核酸中的对照DNA，作为独立反应的扩增对照。

[引自：ISO 22174:2005, 3.5.3.2]

### 3.23

**正向工作流程 forward work flow**

### 单向工作流程 unidirectional work flow

(检验医学)物料/样品处理的原则,用于确保原始样品与处理过的样品(包括扩增后的DNA)在整个检验过程中保持物理隔离。

[改写自: ISO 24276:2006]

### 3.24

#### 杂交 hybridization

在适当反应条件下互补核酸序列特异性结合的过程。

[引自: ISO 22174:2005, 3.6.3]

### 3.25

#### 鉴定 identification

识别特殊属性来鉴定被测对象的过程。

注4: 在基于核酸的鉴定检验中,确定分离物属于既定目标核酸序列或生物的过程。

### 3.26

#### 内扩增对照 internal amplification control

将确定量或拷贝数的已知DNA添加到每个PCR反应体系中的对照DNA,作为扩增反应的内部对照。

[引自: ISO 22174:2005, 3.5.3.1]

### 3.27

#### PCR反应混合液 mastermix

除目标DNA和对照外的其他PCR反应成分。

[引自: ISO 22174:2005, 3.4.18]

### 3.28

#### 多重PCR multiplex PCR

使用多对引物进行的PCR反应。

[引自: ISO 22174:2005, 3.4.11]

### 3.29

#### 阴性提取对照 negative extraction control

#### 提取空白 extraction blank

参与核酸提取全部步骤的不使用检测样品的对照。

[引自: ISO 22174:2005, 3.5.4]

### 3.30

#### 阴性PCR对照 negative PCR control

在无任何PCR抑制剂的条件下,以无核酸水为模板进行的反应。

[引自: ISO 22174:2005, 3.5.6]

### 3.31

#### 阴性过程对照 negative process control

收集的无目标病原体的样品,该标本作为对照贯穿在分析过程的所有阶段。

注1: 基于核酸的检验过程通常包括样品制备、富集、核酸提取和靶扩增。

[改写自: ISO 22174:2005, 3.5.2]

### 3.32

#### 非互补性 noncomplementarity

两条DNA或RNA序列无法在序列的每个位置都反向平行配对。

### 3.33

#### 核酸酶 nuclease

将核酸降解成更小的核苷酸单位的酶。

### 3.34

#### 核酸酶抑制剂 nuclease inhibitor

抑制核酸酶活性的物质。

## 3.35

**核酸 nucleic acid**

作为遗传信息或信息表达媒介的大分子。

[引自：ISO 22174:2005, 3.1.1]

注1：核酸有DNA和RNA两种类型。

## 3.36

**核酸提取 nucleic acid extraction**

从其他生物物质中分离出核酸。

注1：一般是通过对核酸进行扩增和分析。

## 3.37

**核酸引物 nucleic acid primer**

存在DNA聚合酶和三磷酸脱氧核糖核苷酸时，与互补DNA序列杂交，作为DNA合成起始点的核酸链。

## 3.38

**核酸引物延伸 nucleic acid primer extension**

在引物序列的3'端加入单个脱氧核糖核苷酸形成新DNA链的酶促反应过程。

[引自：ISO 22174:2005, 3.4.16]

## 3.39

**核酸探针 nucleic acid probe**

通过杂交检测目标核酸的标记的已知序列核酸分子。

[引自：ISO 22174:2005, 3.6.1]

## 3.40

**核酸纯化 nucleic acid purification**

使DNA和/或RNA更为纯净的过程。

[改写自：ISO 22174:2005, 3.2.2]

## 3.41

**聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR**

体外扩增DNA的酶促反应过程。

[引自：ISO 22174:2005, 3.4.1]

## 3.42

**PCR级DNA PCR-quality DNA**

具有足够长度，纯度和数量的，用于PCR反应的DNA模板。

[引自：ISO 24276:2006, 3.2.3]

## 3.43

**阳性PCR对照 positive PCR control**

含一定量或拷贝数目标核酸的PCR反应。

[引自：ISO 22174:2005, 3.5.5]

## 3.44

**阳性过程对照 positive process control**

含有靶核酸的样品，其处理方法与检测样品相同。

[改写自：ISO 22174:2005, 3.5.1]

注1：基于核酸的检验过程通常包括样品制备、浓缩、核酸提取和靶扩增。

## 3.45

**逆转录酶** reverse transcriptase  
催化逆转录的酶。

[引自：ISO 22174:2005, 3.3.2]

3.46

**逆转录** reverse transcription

在脱氧核糖核苷的存在下，应用逆转录酶和逆转录引物从RNA模板合成DNA。

[改写自：ISO 22174:2005, 3.3.1]

3.47

**核糖核酸酶** ribonuclease

降解RNA的酶。

[引自：ISO 22174:2005, 3.3.3]

3.48

**核糖核酸酶抑制剂** ribonuclease inhibitor

抑制核糖核酸酶活性的物质。

[引自：ISO 22174:2005, 3.3.4]

3.49

**核糖核酸** RNA ribonucleic acid

以双链或单链的形式存在的核糖核苷酸聚合物。

[引自：ISO 22174:2005, 3.1.3]

3.50

**逆转录聚合酶链式反应** reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

由RNA逆转录为cDNA和PCR扩增两步反应组成的方法。

[改写自：ISO 22174:2005, 3.4.2]

3.51

**RT-PCR级RNA** RT-PCR quality RNA

具有足够长度、纯度和数量的，用于逆转录和聚合酶链反应的RNA模板。

[引自：ISO 22174:2005, 3.2.4]

3.52

**逆转录引物** reverse transcription primer, RT-primer

用于逆转录反应的引物。

[改写自：ISO 22174:2005, 3.3.5]

3.53

**序列数据库** sequence database

（生物信息学）由核酸序列、蛋白质序列或其他聚合物序列及相关注释组成的生物数据库。

注1：注释可与有机体、物种、功能、与特定疾病相关的突变、功能或结构特征、参考书目等有关。

注2：所有已发表的基因组序列都可以通过互联网获得，因为每个科学期刊都要求任何已发表的DNA、RNA或蛋白质序列必须存储在公共数据库中。

3.54

**严格性** Stringency

反应中的使用条件的程度，影响杂交特异性，或退火或洗涤。

[改写自：CLSI MM01:2012, 4.2——注释已删除]

3.55

**目标DNA** target DNA

用作扩增的DNA序列。

[引自：ISO 22174:2005, 3.4.13]

3.56

**热循环仪（PCR仪）** thermal cycler

运行PCR反应温度转换程序的自动装置。

[引自：ISO 22174:2005, 3.4.20]

## 4 核酸体外诊断检验原则

### 4.1 通用原则

#### 4.1.1 设计和开发

基于核酸的体外诊断检验程序（包括试剂、设备、软件和使用说明）的设计和开发应遵循文件化的设计和开发控制过程。

设计和开发活动，包括设计和开发控制，应根据既定程序进行规划和批准。

注1：设计和开发计划可包括设计和开发阶段；审查、验证、确认、临床评估和转化活动（适用于每个设计和开发阶段）、参与设计和开发的不同组之间的对接；风险管理计划（见6.1）；以及相应设计和开发的责任和权限。

设计和开发控制应包括以下内容：

- a) 定义预期医疗用途；
- b) 基于预期用途的性能要求和其他设计要求；  
 示例：检测限、临界值、分析特异性（包括交叉反应性和干扰）、精密度、携带污染、线性，以及在适当情况下，校准物的互换性和结果对参考物质或参考测量程序的溯源性。
- c) 验证各项设计要求得到满足；
- d) 确认性能特性适合预期用途；
- e) 控制检验程序后续变更；
- f) 用户和患者的健康和安全管理。

注2：ISO 13485:2003, 7.3中描述了一种适用于体外诊断检验程序的IVD制造商和其他核酸研发人员的设计和开发控制过程。

ISO 13485:2003, 4.2.3的要求适用于与制定检验程序有关的文件和记录的控制。

注3：设计、开发和文件控制的要求不适用于IVD医疗设备或检验程序的开发前的研究活动。

应按照ISO 18113-1:2009、ISO 18113-2:2009和ISO 18113-3:2009的要求编写使用说明，包括适当的操作手册。检验所需的每个步骤，所需的质量保证措施，以及对实验室设备与公共设备的要求应在使用说明中加以描述。

示例：标本采集和处理、核酸提取、核酸扩增、靶标微生物病原体核酸的检测和鉴定、实验室设计、工作流程和实验室实践。

此外，使用说明应包含可在检验程序中处理的核酸序列的说明。

如适用，应在使用说明中解释检验结果的医疗用途及临床用途。

#### 4.1.2 医学实验室实施与使用

医学实验室应当记录其检验程序，并保存其决定和实施的记录。实验室处理的核酸序列应记录在案。

ISO 15189:2012, 4.3和4.13的要求适用于文件和记录的控制。

示例：设备安装和维护、校准品溯源性和测量不确定度、生物参考区间、质量控制程序和标准。

注：ISO 15189中描述了一种适用于医学实验室和其他核酸使用者的基于体外诊断检验程序的质量管理系统。

实施未经修改且经确认的基于核酸的体外诊断检验程序的医学实验室，应当在其投入常规使用前对其性能进行验证。适用于ISO 15189:2012, 5.5.1.2的要求。

对经确认的检验过程的后续修改应得到验证。适用于ISO 15189:2012, 5.5.1.3的要求。

## 4.2 标本收集，运输和储存条件

标本的收集、运输和储存要求应在使用说明中规定。适用于ISO 18113-2:2009的要求。

注：《分子方法的标本收集、运输、制备和储存》指南见CLSI MM13-A2[22]和JCCLS MM5-A1[28]。

应特别注意标本采集、运输和储存对标本的核酸提取所需步骤的潜在影响。

示例：标本类型、标本容器、标本可接受性标准、标本处理程序以尽量减少因核酸丢失或污染而产生的变化、所需数量、所需添加剂、运输条件、储存条件、稳定性因素和预防措施。

医疗实验室应将标本采集、运输和储存的要求作为说明纳入样品采集手册的相应章节。

## 4.3 目标核酸序列的选择

选择核酸目标和序列的标准应在使用说明中规定。

目标序列应根据目标微生物病原体的核酸进行鉴定。

例：基因组或者质粒DNA，转录物如病毒mRNA或rRNA或cDNA，基因组RNA，或细菌16S rRNA或23S rRNA。

应酌情使用公开的核酸序列数据库，评估目标序列与其他生物之间的同源程度。

例：国际核苷酸序列数据库合作联盟，其中包括欧洲分子生物学实验室（EMBL）核苷酸存档，[30]日本的DNA数据库（DDBJ），<sup>[31]</sup>和美国国家生物技术信息中心的GenBank。<sup>[32]</sup>这三个组织每天交换数据。

注：只有一小部分已知的细菌和病毒种类被测序。有些序列还没有得到验证。

实验室应定期检查序列数据库以了解更新情况，以确定是否需要修改实验室的技术程序。

如果目前没有证据表明目标病原微生物中普遍存在目标序列，那么需要检测有统计学意义的足够数量的菌株进行验证。

例：如果5%的生物缺少目标序列，那么至少应对60%的菌株进行检验才能保证有95%的可能性发现至少一株缺少目标序列的菌株。

## 4.4 引物（或引物序列）的选择

选择引物序列的程序应被设计用于检测目标微生物病原体。

选择引物的过程应该遵循适当的设计标准，例如，长度，鸟嘌呤和胞嘧啶含量，熔解温度，避免二聚体形成和非源性互补配对，以便于检测目标病原微生物。

应评价多对引物以达到预期性能。

注：可用软件来帮助设计引物。

## 4.5 核酸制备和稳定性

应在使用说明中定义、确认并记录确保核酸充足制备与提取后核酸稳定的条件。

从样本中提取的核酸的纯度、完整性和产量应足以满足预期用途。如果样品中没有足够的核酸，则应使用同一样品重复提取，或收集另一样品进行提取。

注：有关核酸制备和稳定性的信息，请参考ISO 21571:2005, 5.2[2]。

实验室应按照使用说明制备和储存核酸提取物，以确保纯度、完整性和稳定性足以进行检验。

## 4.6 核酸扩增

目前存在几种不同的扩增方法。[38] [40]在含有寡核苷酸引物和脱氧核糖核苷三磷酸的反应缓冲液中，目标序列的体外扩增通过DNA聚合酶的催化进行。对于RNA生物体，在扩增目标序列之前需要进行逆转录。

应当采取预防措施，避免反应混合物带有聚合酶抑制剂。

注：有关核酸制备和稳定性的信息，请参考ISO 21569:2005, 7.3 [1]。

#### 4.7 核酸检测和鉴定

检测扩增目标的方法应能够揭示研究中遗传因素的存在、缺失或特征，与适当的对照相比，并在所用检验程序和所检测样品的检测限内。

所选扩增目标序列的检测方法应确认其检测扩增的能力。确认应包括与参考测量程序或其他公认的检验程序进行比对。

注：有关核酸检测和鉴定方法的信息，请参考ISO 21569:2005，7.6[1]。

#### 4.8 试剂稳定性与储存条件

应规定和确认试剂的稳定性和储存条件，并在使用说明中说明。适用于ISO 23640:2011和ISO 18113-2:2009的要求。

应特别注意如下内容：

- a) 确立试剂保存期，包括合适的运输条件，以确保产品性能得到保持。
- b) 确立第一次打开主容器后所用试剂的稳定性，  
例：运输稳定性、复溶稳定性、开瓶稳定性。
- c) 监测已投放市场或已分发使用的试剂的稳定性，以及
- d) 在对试剂进行可能影响稳定性的修改后验证稳定性指标。

根据使用说明，在适当的情况下，实验室可将分析方法所需的反应溶液进行分装，以避免反复冻融，并减少污染的机会。

### 5 性能特征

#### 5.1 通用要求

##### 5.1.1 开发设计

与微生物病原体检测和鉴定相关的分析和临床临界值以及性能特征，应根据预期用途进行确定和验证，并记录在使用说明中。适用于ISO 18113-2:2009，7.16的要求。

除非另有规定，否则性能特征应代表整个检验过程的性能。

规定的分析性能特征应包括分析灵敏度、检出限、分析特异性（交叉反应性和干扰），以及在适当情况下的正确度和测量精密密度。应描述和记录用于确定分析性能特征的统计方法和理论依据。

具体的临床表现特征应取决于检验结果的预期用途。

例：特定传染病的诊断。

应在使用说明中确定、确认和规定维持所需性能特征所需的控制程序和控制材料。ISO 18113-2:2009，7.13的要求适用。

##### 5.1.2 医学实验室的实施与使用

与预期用途有关的性能特征，在检验程序投入常规使用前，应由医学实验室进行验证。适用于ISO 15189:2012，5.5.1.2的要求。

注1：有关评价定性检验程序性能的指南，请参阅 CLSI EP 12:2008. [15]。

测量不确定度应足以满足预期用途。

注2：有关测量不确定度评定的信息，请参阅 JCGM 100:2008 (“GUM”)，[12]技术报告 1/2006，欧洲实验室，2006[27]和 CLSI EP29-A:2012[19]。

注3：扩展的测量不确定度可用于描述临界值周围的不确定“灰色区域”。

实验室应制定质量保证程序，并考虑使用说明中的建议。应记录选择控制材料和控制程序的理由。

注4：有关建立质量保证程序的指南，请参考 ISO 24276:2006。

在任何影响检验的程序更改后，应重新评估相关的性能特征，并定期进行审查。重新评估的频率应基于与错误结果相关的风险。

例：校准、试剂更换、设备维护、新操作人员。

## 5.2 具体要求

### 5.2.1 临界值

检测和鉴定目标微生物病原体的分析临界值应根据预期用途的要求确立。

注1：有关使用受试者工作特性曲线确立临界值的信息，请参考 CLSI EP24-A2:2012。

检验程序最初投入使用时，应验证临界值，并应在批次变更、仪器维护和适用于预期用途的周期内进行验证。

### 5.2.2 检出限

应确定95%置信度的样品中可检测到的目标DNA序列的最小量。

注1：有关确定检出限的信息，请参阅 CLSI EP17-A2:2012.[16]。

检出限应在检验程序最初投入使用时进行验证，并应在批次变更（如新的主混合料）、仪器维护以及适用于预期用途的周期内进行验证。

### 5.2.3 分析特异性

应在整个检验过程中确定目标微生物病原体的分析特异性。

交叉反应性应由一组相关生物体进行检查。干扰应由一组相关内源和外源物质进行检查。

假阳性率应以足够数量的无靶序列的样品（阴性标本）确定，。

应评价样本处理程序从核酸提取步骤到微生物病原体的检测和鉴定步骤中对检验程序的干扰。

注1：有关“分析特异性”的信息，请参考 ISO 18113-1:2009, A.2.6。

注2：有关评价分析干扰和交叉反应性的指南，请参考 CLSI EP07-A2:2005。

### 5.2.4 测量精密度

在适当情况下，应确定测量结果的相关精密度特征。

例：重复性、中间精密度、再现性

注1：如果定性结果（如阳性和阴性结果）是由数值测量结果确定的，则临床临界值附近的测量精度是相关的性能特征。

注2：有关测量精密度评价的通用原则和确定测量精密度相关组成部分的指南，请参考 CLSI EP05:2004, [13]ISO 5725-1, [7]ISO 5725-2, [8]ISO 5725-3, [9]和 ISO/TR 22971:2005[10]。

注3：有关体外诊断医疗器械标签中测量精密度要求（重复性、中间精密度和再现性）的信息，请参考 ISO 18113-1:2009, A.2.3。

测量精密度应在检验程序最初投入使用时进行验证，并应持续监测。合适的控制物质可用于监测测量精密度。监测间隔应适合预期用途。

注4：有关测量不确定度确定中重复性、再现性和正确度评估的使用指南，请参考 ISO 21748:2010。

### 5.2.5 临床性能

与预期用途有关的检验程序的临床性能特征，应当根据临床证据确定。

由于临床表现取决于被评估人群中目标条件的流行程度,因此任何临床表现的声称都应附有预期人群的描述和统计方法。

例: 临床敏感性、临床特异性、临床准确性。

注1: 有关临床证据和临床表现的信息, 请参阅 GHTF SG5/N 6:2012。[25]

注2: 有关临床准确性的信息, 请参阅标准化倡议。[33]

注3: 有关体外诊断医疗器械的科学有效性测定和临床性能评价的信息, 请参阅 GHTF SG5/N7:2012。[26]

临床证据应当包括对确诊为感染者和未确诊为感染者的标本的研究。临床研究中使用的样品数量应具有统计合理性。

注4: 临床准确度的评价可以基于分析和临床标准的结合, 以确定是否存在预期的感染。

### 5.3 质量控制和质量保证程序

#### 5.3.1 控质物质

应确定并使用适当的控制措施, 以降低由于检验程序执行不当而产生错误结果的可能性。应进行错误可能性评估和适当的控制, 以尽量减少错误可能性, 并记录选择控质物质和程序的原因。

例如:

- a) 阳性对照 (包含目标核酸) 监测对目标病原体的检测能力。
- b) 阴性对照 (无目标核酸) 监测分析特异性。
- c) 在适当情况下, 空白对照验证试剂无污染或无不可接受的背景信号。

可将内对照加入原始样品基质中 (血清, 血浆, 培养基) 并独立于目标进行提取、扩增、分析和检测。内对照应与目标在同一试管中进行处理。

考虑到使用一个内对照的固有困难, 公认的具有良好性能的外对照在试验中也可以与试验样品并行运行。

例: 将阳性和阴性患者样品分别用作阳性和阴性对照。

#### 5.3.2 医学实验室设计和工作流程

用于进行核酸检测程序的医学实验室的设计和布局, 应当考虑到这些程序的特殊需要。应采取适当的预防措施, 最大限度地降低污染导致假阳性结果的风险 (见第6条)。

例:

- a) 试剂制备、标本制备 (包括DNA和RNA分离) 和目标检测的单独工作区。  
注: 通过使用不同房间进行物理隔离是最有效的, 因此也是分隔工作区域的首选方式。
- b) 人员流动和单项工作流程从样品制备区到样品分析区。文件化实验室程序 (见5.3.3), 以减少接触扩增后分析区域的实验室设备、衣物和人员污染试剂制备及样本制备区域的机会。

注: 通用说明和要求见ISO 24276:2006, 6.4。[6]

#### 5.3.3 医学实验室操作规范

设计和实施医学实验室内的工艺流程, 防止污染, 确保检验质量。

实验室程序应至少包括以下预防措施, 如适用, 以减少污染的可能性。对试剂制备、标品制备、扩增和检测使用单独设备和用品的要求不适用于在同一仪器上执行的步骤。

- a) 使用专用的设备和相关材料用于试剂准备, 标本制备, 和扩增后分析。
- b) 每一操作步骤更换手套, 或者如有需要可更频繁的更换, 以及在进入或重新进入各个分离的实验区时更换手套。

- c) 放置实验服至特定区域，当进入或离开每一区域时更换实验服。
  - d) 加入样品前，首先将非样品成分加至反应管中。
  - e) 不使用试剂时，保持试剂管盖紧。
  - f) PCR扩增子的后续操作（如凝胶电泳或DNA测序），在打开PCR反应管盖之前短暂离心。
  - g) 实验手册或记录本不允许从含有样品核酸或扩增子的区域移动到“洁净”区域。
  - h) 不允许将在含有样品核酸或扩增子的区域（污染区域）打印的凝胶电泳照片移至不含有样品核酸或扩增子的区域（清洁区域）。不允许将相机的存储卡从扩增后的区域移至另一区域打印。
- 注：在含有样品核酸或扩增子的区域中产生的凝胶图像可以通过电子传输打印。

#### 5.3.4 商用设备（包括软件）

应根据制造商的使用说明和实验室程序文件安装、鉴定、校准和维护用于进行核酸检验的设备，包括进行分析所需的软件。适用于ISO 15189:2012, 5.3的要求。

如适用，应验证实验室仪器与现有IT基础设施的整合情况。

适用于ISO 15189:2012, 5.10的要求。

例：数据库连接、生物信息功能等。

#### 5.3.5 医学实验室人员

核酸检验的操作人员需要具有操作资格并经过培训，还应持续学习以维持能力。适用于ISO 15189:2012,5.1的要求。

#### 5.3.6 质量保证程序

应执行适当的质量保证程序确保核酸检验结果的质量。适用于ISO 15189:2012,5.6的要求。

特别是，质量保证程序的设计应尽量减少假阳性和假阴性结果。应采取控制措施，防止核酸体外诊断检查三个主要阶段的潜在失败：（1）样品制备和核酸提取；（2）核酸扩增；（3）核酸检测和鉴定（见第6条）。

### 5.4 结果报告

应实施适当的程序以确保及时报告结果。适用于ISO 15189:2012, 5.8的要求。

除了ISO 15189:2012第5.8.3条的要求外，报告还应包括以下内容：

- a) 目标核酸；
- b) 采样日期和检验日期；
- c) 检验结果；
- d) 所用程序的描述，包括扩增和提取；
- e) 使用的质控；
- f) 样本的来源证明和样本类型；
- g) 重要结果和/或结果解释；
- h) 检验程序的局限性。

应说明微生物病原体定性检测和鉴定的参考区间。

例：“未检出”或“低于检出限”。

## 6 风险管理

### 6.1 通用

任何开发、制造、传播和/或执行核酸体外诊断检验程序的机构，都有管理患者、用户和其他个人的健康和安全风险方面的责任。

风险管理过程应作为一个持续的过程进行建立、记录和维护，以识别与使用体外诊断检验程序相关的危险，估计和评价相关的风险，将这些风险控制在可接受的范围内，并监控风险控制的有效性。

风险管理的职责和活动应由最高管理者按照既定程序进行规划和批准。

注：风险管理计划可以包括：风险可接受性标准；职责和权限；风险分析和评价；风险控制验证活动；风险管理评审要求；风险效益分析；以及与监测持续使用检验程序的风险相关的活动。

## 6.2 设计和开发风险管理

应根据预期用途在检验程序开发的过程中分析使用核酸体外检验微生物病原体的相关风险，并评估风险是否可接受。这些活动应按照程序文件执行。

考虑的风险至少应包括

- 假阴性和假阳性检验结果对患者的风险，以及
- 对实验室工作人员和其他与执行检验程序有关的用户的风险，包括生物危害。

应分析核酸检验的三个主要阶段中可能出现的潜在失败模式和使用错误，以识别危害和危险情况并估计风险。不可接受的风险应降低到可接受的水平，或在合理可行的范围内尽量降低。可进行风险效益分析，以确定风险的可接受性。

注1：有关适用于体外诊断检验程序的体外诊断设备制造商和其他开发商的风险管理过程，请参考 ISO 14971:2007。附件 H 中描述了体外诊断医疗器械的指南。

注2：有关在质量管理体系中实施风险管理原则和活动的指南，请参阅 GHTF/SG3/N15R8:2007。

检验程序附带的使用说明应包括使医学实验室能够控制假阴性和假阳性检查结果对患者的风险的信息，以及在适当情况下控制风险的建议。应披露任何重大的剩余风险。

注3：风险控制措施可包括质量控制活动、警告、具体使用说明、预防性维护等。

## 6.3 医学实验室风险管理

医学实验室应分析核酸检验过程，以确定潜在的失败模式、使用错误、危害和危险情况，并在执行检验过程之前，应对患者和实验室工作人员的风险进行估计和评价，以确定其可接受性。

根据风险管理计划，验证并执行保护患者和实验室工作人员免受已识别的危险和危险情况影响所必需的风险控制措施。

医疗实验室应确保实验室工作人员和服务人员的安全和防护。

适用于 ISO 15190:2003 的要求。

注1：ISO 14971:2007 和参考文献<sup>[23]</sup>中描述的一般原则和风险管理实践也可适用于医学实验室。

注2：有关减少实验室误差的通用指南，请参考 ISO/TS 22367:2008<sup>[11]</sup>。

注3：有关基于风险管理原则的质量控制计划的信息，请参阅 CLSI EP23<sup>[17]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] ISO 21569:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods
- [2] ISO 21571:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction
- [3] ISO 21572:2013, Foodstuffs — Molecular biomarker analysis — Protein-based methods
- [4] ISO 21748:2010, Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation
- [5] ISO 22174:2005, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions
- [6] ISO 24276:2006, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions
- [7] ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
- [8] ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- [9] ISO 5725-3:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method
- [10] ISO/TR 22971:2005, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Practical guidance for the use of ISO 5725-2:1994 in designing, implementing and statistically analysing interlaboratory repeatability and reproducibility results
- [11] ISO/TS 22367:2008, Medical laboratories — Reduction of error through risk management and continual improvement
- [12] BIPM JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (“GUM”)
- [13] CLSI EP05-A2. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. Approved Guideline, Second Edition, 2004
- [14] CLSI EP07-A2:2005, Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline
- [15] CLSI EP12-A2. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance. Approved Guideline, Second Edition, 2008
- [16] CLSI EP17-A2. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation. Approved Guideline, Second Edition, 2012
- [17] CLSI EP23. EP23-A—Laboratory Quality Control Based on Risk Management. Approved Guideline, 2011
- [18] CLSI EP24-A2. Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves. Approved Guideline, Second Edition, 2012
- [19] CLSI EP29-A. Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine. Approved Guideline, 2012
- [20] CLSI MM01-A3. Molecular Methods for Clinical Genetics and Oncology Testing. Approved Guideline, 2012
- [21] CLSI MM03-A2:2006, Guidelines for appropriate design criteria for primer selection

- [22] CLSI MM13-A2:2005, Collection, Transports, Preparation and Storage of specimens for Molecular methods
- [23] GHTF/SG3/N15R8:2007, Implementation of risk management principles and activities within a Quality Management system
- [24] GHTF/SG5/N2R8:2007, Clinical Evaluation
- [25] GHTF/SG5/N6:2012 Clinical Evidence for IVD Medical Devices – Key Definitions and Concepts
- [26] GHTF/SG5/N7:2012 Clinical Evidence for IVD Medical Devices – Scientific Validity Determination and Performance evaluation
- [27] EUROLAB Technical report No. 1/ 2006, Guide to the evaluation of measurement uncertainty for quantitative tests results ([www.eurolab.org](http://www.eurolab.org))
- [28] JCCLS MM5-A1, Guideline for a quality management of specimens for molecular methods: The procurement, transport, and preparation of specimens
- [29] WHO. Laboratory quality management system; handbook ( 2011). Available at [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548274\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548274_eng.pdf)
- [30] European Molecular Biology Laboratory ( EMBL) N ucleotide Archive. [www.ebi.ac.uk/embl/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)
- [31] Japan: DNA Data Bank of Japan (DDBJ), ([www.ddbj.nig.ac.jp/](http://www.ddbj.nig.ac.jp/))
- [32] US National Institutes of Health (NIH). National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- [33] Bossuyt P.M., Reitsma J .B., Bruns D .E., Gatsonis C .A., Glasziou P.P., Irwig L.M. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. Clin. Chem. 2003, 49 () pp. 1–6
- [34] Burd E.M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 2010 Jul, 23 () pp. 550–576
- [35] Keer J.T., & Birch L. eds. Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach. Royal Society of Chemistry, First Edition, 2008
- [36] Huggett J., & O’Grady J. eds. Molecular Diagnostics: Current Research and Applications. Caister Academic Press, 2014
- [37] Persing D.H., & Tenover F.C. eds. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. ASM Press, 2004
- [38] Mullis K .B., & Faloona F .A. S pecific s ynthesis o f D NA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. Methods Enzymol. 1987, 155 pp. 335–350
- [39] Roa J .R., F leming C .C., M oore J .E. e ds. M olecular Diagnostics: C urrent T echnology and Applications. Horizon Bioscience, First Edition, July 2006
- [40] Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985, 230 pp. 1350–1354
- [41] Viana R .V., & Wallis C.L. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories, in Wide Spectra of Quality Control (Akyar I, editor). InTech, 2011. Available from : <https://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/good-clinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories>

[42] Viljoen G .J., Nel L .H., C rowther J .R. M olecular D iagnostic P CR H andbook. IAEA, S pringer Press, 2005

---