



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO 4307:2021

分子体外诊断检验 唾液检验前过程的规范 提取人类 DNA

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination
processes for saliva — Isolated human DNA

(ISO 4307:2021)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 总则 5

5 实验室外部 5

6 实验室内部 8

参考文献 11

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件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。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

分子体外诊断检验 唾液检验前过程的规范 提取人类 DNA

1 范围

本文件提供了在分子检验的检验前阶段，如何取材、贮存、处理和记录拟作人类DNA检验的唾液样本的要求和建议。

本文件适用于分子体外诊断检验，包括医学实验室进行的实验室自建项目；也适用于实验室客户、体外诊断开发人员和制造商、生物样本库、从事生物医学研究的机构和商业组织及监管机构。

用于收集唾液或通过漱口收集唾液需要的容器在本文件中没有描述。也没有保存和处理唾液中游离DNA、病原体和其他细菌或整个微生物组DNA的措施。

注：国际、国家及区域法规要求同样适用于本文件涉及的特定内容。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 15189，医学实验室——质量和能力要求

ISO 15190，医学实验室——安全要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环境温度 ambient temperature

未经调节的周围空气的温度。

3.2

分析物 analyte

被测量名称所代表的组分。

3.3

检测性能 examination performance

分析测试性能/分析性能：测试待测分析物的检验的准确度、精密度和灵敏度。

注：也适用于其他测试性能特性，比如稳健性、重复性等。

3.4

DNA稳定剂 DNA stabilizers

指能尽量减少DNA降解和碎裂的化合物、溶液或混合物。

3.5

封闭系统 closed system

供应商提供的不可改变的系統，包括分析所需的所有组成部分（即硬件、软件、程序和试剂）。

3.6

DNA

以双链或单链形式存在的脱氧核糖核苷酸聚合物。

3.7

检验 examination

分析测试：以确定一个特性的值或特征为目标的一组操作

注：从分离的分析物开始并包括各种用于定性或定量检验的参数测试或化学操作的过程。

3.8

检验人员 examination provider

分析实验人员：进行特定分析测试的人员。

3.9

干扰物质 interfering substance

可存在于样本中的能改变检验结果的内源性或外源性物质（例如稳定性）。

3.10

微生物 microorganism

包括细菌、真菌和原生动物。

3.11

检验前流程 pre-examination process

分析前阶段/检验前工作流程：按时间顺序从临床医生的申请开始，包括检验申请、病人的准备和身份识别、原始样品的采集、运送到医学或病理实验室和在实验室内进行运送、分析物的分离并以分析检验开始为结束的过程。

注：检验前阶段包括影响预期检验结果的准备流程。

3.12

原始样本 primary sample

标本：为检验、研究或分析一种或多种量或特性而取出的认为可代表全部的一独立部分的体液、呼出气、头发或组织。

3.13

能力验证 proficiency testing

利用实验室间比对，按照预先制定的准则评价参加者的能力。

3.14

室内温度 room temperature

本文件中是指18℃-25℃

注：当地或国家法规可能存在不同定义。

3.15

唾液 saliva

唾液主要由三大唾液腺（腮腺、颌下腺和舌下腺）和口腔内的唾液腺分泌物组成。

3.16

唾液收集器 saliva collection device

用于收集唾液标本的试管或其他容器。

3.17

样品 sample

取自原始样品的一部分或多部分。

3.18

稳定性 stability

样本或样品在特定储存条件下，在特定时间内保持特定属性值的能力。

注：本文件涉及的分析物是所分离的DNA。

3.19

贮存storage

在适宜的条件下长时间中断样品、分析物或其衍生物（如染色切片或组织块）的分析前工作流程，以保持其特性。

注：通常在实验室档案库或生物样本库中进行长时间贮存。

3.20

确认validation

通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。

3.21

验证verification

通过提供客观证据确认特定要求已得到满足

注1：“已确认”一词用于表明相应的状态。

注2：确认可包括以下活动：进行替代计算；比较新的设计规格与相似的已核实设计规格；进行测试和示范；以及在签发前审查文件。

3.22

工作流程workflow

完成一项工作所必需的一系列有组织的活动。

4 总则

医学实验室质量管理体系的通用要求，特别是标本采集、接收和处理（包括避免交叉污染），参照ISO 15189或ISO/IEC 17020。有关实验室设备、试剂和消耗品的要求应遵循ISO 15189 和ISO/IEC 17020。有关样本收集、运输、接收、处理及贮存的内容，请参照ISO/TS 20658。对于生物反应也可参照ISO 20387。

诊断工作流程的所有步骤都会影响最终的分析测试结果。因此，包括生物分子稳定性、样品贮存条件以及它们对拟被检测的生物分子的稳定性的影响在内的整个工作流程都应得到验证和确认。这包括发展体外诊断医疗仪器。在整个试验前过程中都应检验人类DNA的稳定性。性能的验证以及预实验的确认应考虑到唾液样本质量的可变性。

在设计和开发以唾液DNA为基础的实验时，应进行风险评估（另见ISO 14971）。如有需要，必须制定消除或减少已确定风险的措施，以确保检验工作的顺利进行。这部分内容包括审核前的工作流程步骤。

在设计检验之前或期间，应确保检验所需的最低DNA含量、大小及纯度等人类DNA质量参数，确保其不会影响实验结果。

关于运送和处理的安全说明参见ISO 15189和ISO 15190相关标准。

在整个检验前过程中，应采取预防措施避免不同标本/样品之间的交叉污染，例如：处理不同的标本/样品时，使用一次性的材料（可行时），或是采用适当的清洗程序。

所有预实验步骤，应遵循厂家的说明书（如果有）。

如因正当理由（例如未能满足病人的需要）而未按照厂家的说明书进行操作，则用户应对其使用和性能负责。

在首次使用任何有潜在危险的物料（例如稳定剂中的化学品）前，应详细阅读厂家的物料安全资料表。

5 实验室外部

5.1 标本采集

1.1.1 标本供体/患者信息

应该包括标本供体/患者的 ID，可以用代码的形式。应包括但不局限于：a) 标本供体/患者的相关健康状况，例如健康状况、疾病类型、伴随疾病、人口统计信息（如性别、年龄）；b) 收集唾液前的常规医学治疗和特殊治疗信息，例如麻醉剂、药物治疗；c) 所要求的检查类型和目的；d) 标本供体/患者的相应的知情同意。

1.1.2 实验室对唾液收集装置的选择

应选择有说明书的厂家，说明书应包含所用唾液收集装置的具体说明。如用户指定使用专用唾液收集器，则必须按要求使用相应品牌。如用户没有提供有关规格（例如由于以往法律框架较松），则由实验室指定、验证、确认及记录唾液收集装置。不规范的唾液收集程序、不适当的储存/运送条件和DNA分离程序均会影响人类DNA的质量及数量。为了防止细菌过度生长、人类DNA降解和碎片化，应该在专门研制的含有适当稳定剂的唾液收集装置中收集唾液样本。如果使用没有稳定剂的装置中收集唾液，则必须使用其他符合5.1.4.3标准的保存方法，如低温瓶或聚丙烯管。不建议在实验室外使用这种管子进行自我收集。

1.1.3 患者唾液样本的收集和稳定

1.1.3.1 概述

制定唾液标本采集的通用规范。

唾液标本采集前，应向标本供体/患者提供来自制造商、实验室或医生的书面说明资料。

用户说明必须包含唾液样本收集的规格及程序。如果没有的话（例如由于以往法律框架较宽松），则必须对唾液收集过程进行核实和记录。

收集样本的程序需包括：

- a) 唾液标本收集、鉴定、储存及运往实验室设施的全过程；
- b) 收集样本前须遵循的规定，特别是与营养、口腔卫生有关的要求，例如在收集样本前禁食；
- c) 收集样本时避免混有咳嗽/咳痰或鼻分泌物（打喷嚏）所产生的黏液。

为方便自行采集，标本供体/患者需配备合适的唾液采集装置、身份识别标签（例如标签、射频识别（RFID）），以及其他用于收集、贮存及运送样本的所需物品。

此外，必须为标本供体/患者提供电子的或纸质版的唾液标本收集的详细步骤。

收集标本的人以代码代称，并根据ISO 15189的要求，记录收集唾液的时间和日期。

对于唾液收集管的标签（样本/样本识别），需遵循ISO 15189的标准或附加要求（例如二维码）。

唾液收集装置应遵循操作说明，特别是：

- 1) 所需的唾液量；
- 2) 收集唾液后立即摇晃或倒置，使唾液与稳定剂混合。

注：如果唾液收集装置中的添加剂与样本没有均匀混合，那么可能会影响唾液DNA的质量和数量，从而影响检测结果的有效性和可靠性。

应记录所有对唾液的处理过程。

标本供体/患者或从标本供体/患者处收集唾液样本的人应确认与提供的唾液样本收集说明一致。

1.1.3.2 使用含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

用户应提交经过核实的唾液收集说明书（例如特定的收集装置、加入稳定剂的样本等）。

1.1.3.3 使用不含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

如果用户没有提供这些说明（例如由于以前的法律框架不那么严格），有关程序需由实验室进行指定、核实和记录。实验室必须为用户提供相应的可行的说明。这些说明应包括标本供体/患者采集标本前的准备工作，例如在唾液样本收集前至少30分钟不能吃、喝、吸烟、亲吻或咀嚼任何食物。

1.1.3.4 概述

制定唾液标本采集的通用规范。

1.1.3.5 使用含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

如果用户没有提供这些说明（例如由于以前的法律框架不那么严格），有关程序需由实验室进行指定、核实和记录。实验室必须为用户提供相应的可行的说明。实验室可以参考唾液收集装置制造商关于储存和运输条件的规定制定自己的规程。

1.1.3.6 使用不含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

不建议在实验室外使用不含DNA稳定剂的收集装置进行自我采集，贮存条件需要记录在案（即贮存时间及温度）。

1.2 转运要求

7

用户需为收集的唾液样本提供经过验证的可行的运输条件（例如持续时间、温度）。

如果用户没有提供这些说明（例如由于以前的法律框架不那么严格），有关程序需由实验室进行指定、核实和记录。实验室必须为用户提供相应的可行的说明。

实验室必须记录运输的条件，包括运输条件的变化，并以适当的方式（例如温度记录器）进行温度监控和记录。如果无法进行记录，则应该估计并记录周围的温度。这部分参考ISO 15189相关条例。标本运送到实验室的时间也是影响总储存时间的一个因素。这也包括运送到实验室之前的第三方处理时间。

1.2.2 使用含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

如果使用含DNA稳定剂的唾液收集装置，用户必须对厂家提供的运输条件（即持续时间和温度）进行验证。如果用户的要求更加严格，则应遵守更严格的要求。同时需要记录运送条件（即持续时间及温度）。

1.2.3 使用不含 DNA 稳定剂的唾液收集装置

如果使用不含DNA稳定剂的唾液收集装置，同样需要记录运送条件（即持续时间及温度）。如果使用不含DNA稳定剂的唾液收集装置，同时用户没有提供运输条件，则应参考5.1.4.3相关条例，即在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下运送样本，以尽量减少唾液DNA的降解和碎裂，同时需要记录运送条件（即持续时间及温度）。

6 实验室内部

1.3 标本准备

实验室应记录唾液样本的接收日期、时间和采集装置类型。同时收集并检查标本供体/患者或曾向标本供体/患者收集唾液样本的人士的收集合格确认书。与既定运送程序规程的任何偏离都应进行记录，如不符合规格的标签和运输条件、唾液体积不足或过量、渗漏/破损、变色器具、不适当的收集器具类型或收集规格等。如果标签、运输及贮存条件或唾液体积不符合规定，可能会影响检验的有效性和可靠性，标本需重新采集。

1.4 接收标本的负责人可以采用名称或代码记录。用户应提供经过核实的关于唾液储存的可行的要求（例如贮存时间、温度）。如果用户没有提供这些说明（例如由于以前的法律框架较宽松），有关程序需由实验室进行指定、核实和记录。实验室应为使用者提供相应的纸质说明书。实验室应记录样本收集到DNA提取之前的储存温度和时间。储存温度和总储存时间不得超过5.1.4和5.2相关规定。唾液标本的总储存时间应包括在唾液收集地点的时间（见5.1.4）、运往实验室的运输时间（见5.2）以及在实验室、生物库或其他机构中进一步储存的时间，总储存时间不得超过指定的最长贮存期限。

1.5 唾液 DNA 的分离

1.5.1 概述

用户需为唾液DNA的提取提供经过验证的可行程序。

为避免DNA检验过程中所生成的扩增物质产生交叉污染，应使用密闭系统，否则DNA分离与检测过程的扩增步骤不应在相同地方进行。

如果开发自动化的DNA分离程序，则需要采取措施以避免样本/样本之间的交叉污染。

用户所选用的DNA提取程序提取的DNA分子必须符合分子检验的要求和规格（例如DNA的质量和数量、DNA浓度、DNA长度）。

由于唾液样本含有微生物、病毒和食物残渣，所以分离出来的人类DNA通常会含有微生物DNA和少量来自食物的其他生物DNA。由于唾液样本中的微生物和病毒含量在样本供体/患者之间具有很大的变异性，所以微生物DNA污染的程度也不同，这会影响人类DNA的定量。一些研究显示，从含有稳定剂的特定收集管收集的每毫升唾液中，总DNA产量（不分人类和非人类DNA）介于0.1微克和26微克之间。在含有稳定剂的特定收集管内收集的样本，微生物含量中位数低于漱口水和口腔拭子样本。与DNA接触的试剂和消耗品应该是无DNA的。DNA提取性能应该在DNA能力验证中进行检测。

1.5.2 使用商品化试剂盒

如果用户要求使用市面上某种专用的DNA分离试剂盒，则必须严格按照试剂说明书进行操作。

如果用户没有明确要求（例如由于以往较宽松的法律框架），但唾液收集装置制造商已推荐某一DNA分离试剂盒，实验室可推荐使用此试剂盒。

如果两者都没有指定专用的DNA分离试剂盒，实验室需选择使用有批文的合适的DNA分离试剂盒。如果可能的话，选择指定样本为唾液的DNA分离试剂盒。实验室需验证所选试剂盒是否合适。

1.5.3 使用实验室自建的程序

如果所有的商用DNA分离试剂盒均无法满足实验要求，实验室应通过以下两种方式建立自己的规程：

- 以唾液为提取样本修改现有的DNA分离试剂盒提取程序；
- 使用市售的只用于研究的DNA分离试剂盒；
- 建立自己的规程。

经上述程序选择并确认的DNA分离程序，实验室应给出可按照执行的具体使用说明。

注1：不同的DNA分离程序获得的DNA片段长度可能不一。此外，DNA数量和质量（例如纯度）可能也会有所不同。

注2：采用离心、酶或化学液化等方法对粘性样品进行预处理，可使样品均匀化，提高核酸的提取效率。

注3：稳定分子可能会干扰实验，因此在DNA提取过程种，需要专门的步骤避免DNA稳定分子的污染。

1.6 DNA的定性和定量评估

在进行实验前，需要根据检验机构的程序，对DNA进行定性和定量评估，如果检验机构没有相应程序，则依照公认的物理、化学和生物化学程序验证。可能包括以下一种或多种检测技术（根据具体的检验测试做选择）：

- a) 通过检测吸光度（A260）或荧光光谱测定量；

注：唾液样本的核酸还含有大量微生物、病毒和食物残渣的DNA。这些共同构成了唾液核酸的总量。因此只能使用特定的实验（d）对人类DNA进行定量

- b) 通过测量吸光度检测纯度（如：波长扫描、计算A260/A280的比值）；

c) 检测DNA完整性，比如通过电泳、毛细管电泳、色谱、分子生物方法（如3'/5'分析或差异长度扩增子比率）；

d) 人类DNA定量（例如针对人类基因组中已知拷贝数的一个独特的保守序列的定量PCR或定向PCR，此方法需要一个初级或次级人类DNA标准进行校准）。

- e) 检测干扰物质的存在（使用外源性质控品，即加入DNA质控品；或检验异常的qRCP反应曲线）；

- f) 通过将增加的洗脱液体体积引入检验中，使用内源性DNA进行RT-qPCR抑制试验。

使用成熟的DNA测试程序监控DNA分离的全过程。

1.7 DNA 的储存

1.7.1 概述

用户需提供经核实的可行的唾液DNA储存说明书。

若果唾液DNA需要长期存储，通常将DNA冷冻在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。也可以采取经确认的更适合后续检测的其他方法。

长期贮存时，宜将DNA等分分装，以避免反复冻融。

DNA样本的任何解冻和冷冻都应记录在案。

对于少量DNA，宜使用能够减少管壁对核酸吸附的贮存容器。

宜避免DNA在长期贮存过程中因水分蒸发而意外产生的冷冻干燥。因此，在长期贮存过程中，宜使用适宜的贮存容器（如：带螺旋盖的低温小瓶）以避免水分蒸发。宜记录贮存容器的类型及盖子类型。应保证样品的可追溯性。若果DNA需要长期储存，宜建立一个经过确认的过程来组织并唯一标记含有分离DNA或其衍生物的等分试样的贮存容器。为避免样本遗失或混淆，建议使用适合贮存温度的标识，包括可读的RFID，一维或二维条形码，或制造商提供的、带有预先打印的唯一编码并适用于低温贮存的贮存容器。

1.7.2 使用商品化试剂盒提取的 DNA 的储存

如果用户没有提供唾液DNA储存说明（例如由于以前的法律框架不太严格），实验室可以以唾液DNA分离试剂盒制造商的使用说明作为基础，制定自己的经验证过的DNA储存程序。此储存程序应以书面形式呈现并要求严格遵守。

1.7.3 使用实验室自建规程提取的 DNA 的储存

如果用户没有提供唾液DNA储存说明，唾液DNA检测实验室应指定、核实和记录储存唾液DNA的条件，例如温度、时间和储存所需的其他条件。这些应以书面形式呈现并要严格遵守。为长期储存，分离的DNA应放在适当的缓冲液（例如TE）中，并储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。也可以使用其他经确认的储存方法。

参 考 文 献

- [1] ISO 14971, *Medical devices — Application of risk management to medical devices*
- [2] ISO/IEC 17020, *Conformity assessment — Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection*
- [3] ISO 20387, *Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking*
- [4] ISO 20395, *Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR*
- [5] ISO/TS 20658, *Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples*
- [6] RYLANDER-RUDQVIST T. HAKANSSON N., TYBRING G., WOLK A. Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated Oragene method- A pilot study on the cohort of Swedish men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006, **15** pp. 1742–1745
- [7] FEIGELSON H.S.RODRIGUEZ C., ROBERTSON A.S., JACOBS E.J., CALLE E.E., REID Y.A. et al. , Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001, **10** pp. 1005–1008
- [8] Salimetrics-Saliva Bio-Saliva collection and handling advices-3 Edition, 2015
- [9] FABIAN T.K., FEJERDY P., CSERMELY P. Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: the emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases. *Curr. Genomics.* 2008, **9** pp. 11–21
- [10] ABRAHAM J.E.MARANIAN M.J., SPITERI I., RUSSEL R., INGLE S., LUCCARINI C. et al. , Saliva samples are viable alternative to blood sample as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Med. Genomics.* 2012, **5** pp. 19–24
- [11] LAURELL H., IACOVONI J.S., ABOT A., SVEC D., MAORET J.J., ARNAL J.F., KUBISTA M. Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Res.* 2012, **40** (7) pp. e51–e51
- [12] TICHOPAD A.BAR T., PECEN T. et al. , Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods.* 2010, **50** pp. 308–312
- [13] BAR T., KUBISTA M., TICHOPAD A. SURVEY AND SUMMARY. Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2011, pp. 1–12