|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 点击此处添加ICS号 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png CHBAS |   点击此处添加CCS号 |

河北省标准化协会团体标准

T/CHBAS XXXX—2021

达氟沙星生物条形码检测试剂盒生产规程

Technical regulations for Darfloxacin bio-barcodes assay kit

2021 - XX - XX发布

2021 - XX - XX实施

河北省标准化协会  发布

1. 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。

本文件由河北北方学院提出。

本文件由河北省标准化协会归口。

本文件起草单位：河北北方学院、张家口市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：魏东、曲丽洁、孙丰梅、栗慧、刘镇、周沫茏、于苗。

达氟沙星生物条形码检测试剂盒生产规程

* 1. 范围

本文件规定了达氟沙星生物条形码检测试剂盒的主要组成、生产流程、使用说明书和标签。

本文件适用于基于微孔板银染的生物条形码检测达氟沙星的试剂盒的生产。

* 1. 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。

GB/T 2828.1 计数抽样检验程序 第1部分：按接收质量限(AQL)检索的逐批检验抽样计划

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

HG/T 3921 化学试剂 采样及验收规则

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

生物条形码检测 bio-barcodes assay

使用寡聚核苷酸作为生物条形码，金纳米颗粒表面修饰有条形码DNA和抗体，用于捕获目标物，引入磁性纳米颗粒应用于目标物的分离，通过不同的检测手段对目标物进行检测。

基质 matrix

样本中除分析物以外的一切组成。

标准物质 reference material

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

参考方法 reference method

经过全面研究,清楚而严密地描述所需条件和程序，用于对物质一种或多种特性值进行测量的方法。该方法已经证明具有与预期用途相称的准确度及其他性能。

特异性 specificity

能准确、特异测定目标物的能力。

检测限 limit of detection

在给定的置信水平上，样品中的目标物能被可靠地与噪音背景区分的最低浓度或含量。

精密度 precision

在规定条件下,独立测试结果间的一致程度。

假阴性率/假阴性率 false negative/ positive rate

将阳性结果/阴性结果判断为阴性/阳性的比率。

* 1. 试剂盒的主要组成

试剂盒由一整套试剂和材料组成，应严格按照其说明书的规定使用：

1. 包被微孔板：在微孔板上包被链霉亲和素；
2. 纳米金复合探针：达氟沙星单克隆抗体或多克隆抗体和条形码DNA组装到纳米金表面形成纳米金复合探针；
3. 磁性探针：小分子与载体蛋白的偶联物结合于磁性颗粒表面形成磁性探针；
4. 条形码DNA释放液：二硫苏糖醇；
5. 生物素探针：生物素与寡核苷酸链偶联而成，可与条形码DNA杂交；
6. 纳米金检测探针：寡核苷酸链组装到纳米金表面而成，可与条形码DNA杂交；可与生物素探针和条形码DNA形成“生物素探针-条形码DNA-纳米金检测探针”的三明治杂交结构；
7. 银染增强A液和B液；
8. 系列标准溶液：定量检测用时，应配制至少5种浓度的标准溶液；
9. 洗涤液：磷酸盐缓冲溶液或其他缓冲溶液。
   1. 生产流程
      1. 前期准备
         1. 生产车间准备

车间准备如下：

1. 超净室：用于探针制备、包被酶标板等对环境要求高的实验；
2. 配液间：有生物安全柜；
3. 质检、产品调试间，质检室应满足GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求。
4. 生产间：可控制湿度；
5. 档案室，用于生产文件管理，标签、说明书打印；
6. 成品库两个：一个4℃，用于试剂盒质检留样、半成品、成品存放。一个常温，用于质检留样、成品暂存；
7. 原料库，存放试剂、耗材、包材；
8. 其他：更衣间、器具清洗间、空调机房、过道等必需设施；
9. 位置安排：制水间、器具存放间、配液间靠近；产品调试间、质检间、超净间、档案室尽量与生产间靠近。
   * + 1. 标准作业程序的准备
          1. 标准作业程序总则

企业应制定标准作业程序，并在生产的全过程按标准作业程序进行。标准作业程序应包括生产配方表，生产工艺流程图及质量控制点，生产操作过程及工艺条件，生产管理，质量标准及质量验收标准，设备一览表，产品批量及物料消耗定额，工艺、环境卫生，劳动组织与岗位定员、产品生产周期等内容。

* + - * 1. 生产配方表

生产配方表应详细规定各种基础缓冲液，中间体试剂溶液的配方表，配方表应标明组分、物料编号、配方、分装量（如有必要）等要素。同时需制定溶液配制的标准操作规范，例如溶液配制过程中移液器使用的标准操作规范。

* + - * 1. 生产工艺流程图及质量控制点

分析各工序，绘制出生产工艺流程图，并找出关键工序作为质量控制点。制定质量控制点的作业指导书。

* + - * 1. 生产操作过程及工艺条件

生产操作过程及工艺条件需详细制定每个工序的作业指导书，应包括作业地点、作业相关设备及器材和作业规范，该工序为关键工序时也需注明。

* + - * 1. 生产管理

试剂盒生产过程所涉及的中间体以及成品批号，企业需编制并执行《批号管理规程》；生产现场应做到井然有序，需编制并执行《生产现场管理规程》；半成品分装、成品组装等生产环节需要进行物料平衡，需编制并执行《物料平衡管理规程》；清场作业，需编制并执行《清场管理规程》；如果生产过程中某工序需要返工，需编制并执行《返工管理规程》。

* + - * 1. 质量标准及质量验收标准

原料、辅料、包装材料需制定验收标准，验收标准应包括材料的名称、编号和对应质量标准名称及编号。成品需制定质量标准，质量标准应包括成品名称、编号和对应质量标准名称及编号。

* + - * 1. 设备一览表

应制定主要生产设备一览表和主要质检设备一览表。设备一览表应包括设备编号、设备名称、规格型号、存放位置、数量和相关规范使用文件及编号。

* + - * 1. 批量及物料消耗定额

需根据企业生产能力，确定产品批量与试剂生产量，计算原料消耗定额和包装材料消耗定额，应包含物料名称、编号、理论需求量。

* + - * 1. 工艺、环境卫生

针对对物料卫生、人员卫生、环境卫生制定规程。物料进出洁净区需编制并执行《物料进出洁净室清洁规程》：

1. 人员进出洁净区需编制并执行《人员进出洁净室管理规程》；人员进出洁净区时清洁需编制并执行《人员进出洁净室清洁规程》；人员在洁净区内作业需编制并执行《净化车间个人卫生管理规程》；编制并执行《员工健康管理规程》，对生产人员定期进行体检，体检合格才能上岗，并建立个人健康档案；编制并执行《员工培训管理规程》，生产人员上岗前必须按规程要求进行培训，培训合格并发上岗证才能上岗。
2. 编制并执行《洁净区使用管理规程》，对洁净区进行使用和维护，定期检测微生物和尘埃粒子；编制并执行《洁净区卫生管理规程》，对洁净区进行卫生管理；编制并执行《洁净区清洁标准操作规程》，对洁净区进行清洁作业；编制并执行《洁净区消毒标准操作规程》，对洁净区进行消毒作业；编制并执行《工作服、工作鞋清洁标准操作规程》，对工衣工鞋进行消清洁；编制并执行《容器具使用、清洁、维护及保养操作规程》，对生产过程所使用容器具按规程使用、清洁、维护及保养；编制并执行《产设备清洁标准操作规程》，对生产设备进行清洁。
   * + - 1. 劳动组织与岗位定员

按生产工序为单位，将生产人员分成生产小组进行生产组织，编制《试剂盒生产指令单》、《试剂盒组装指令单》等指令单，由小组负责人按照指令单组织小组成员完成生产任务。

对半成品、成品的生产和分装以及试剂盒的组装进行岗位定员及工时定额。

* + - * 1. 产品生产周期

确定生产一批成品的完成生产周期，并确定周期内每个作业内容的完成时段。

* + - 1. 生产准备

生产准备如下：

1. 试剂瓶清洗：器具清洗间对生产用的试剂瓶进行清洗；
2. 双蒸水制备：制水间进行双蒸水的制备；
3. 配制标准品、配液：配液间配制标准品和生产中需要的溶液；
4. 试剂质检：质检室对生产中使用的试剂进行质检。
   * 1. 启动生产
        1. 探针制备

制备纳米金复合探针、磁性探针、生物素探针、纳米金检测探针。超净室和生产间进行，要求环境洁净；视原料和工艺不同，需要准确控温4℃冰箱、恒温震荡机、高速冷冻离心机、恒温加热磁力搅拌器、磁分离器等设备。

* + - 1. 包被、封闭微孔板

超净室和生产间进行，要求环境洁净、有准确控温4℃冰箱、洗板机、37℃烘箱。

* + - 1. 试剂盒变异质检

由质检室对试剂盒进行变异质检。

* + - 1. 试剂盒调试

产品调试间对试剂盒进行调试。

* + - 1. 半成品质检

质检室对半成品进行质检。

* + - 1. 填写生产记录、打印说明书、标签

档案室填写生产记录，按照本标准5和6的规定打印说明书和标签。

* + - 1. 液体分装、包装

生产间对液体进行分装、包装。

* + - 1. 成品质检

质检室对成品进行质检。

* + - 1. 留样、产品入库

留样，产品入4℃贮存库。

* 1. 抽样和判定准则
     1. 组批

以采用同批原料一次性生产的同种规格的产品为同一组批。

* + 1. 抽样

从同一组批中随机抽样，试剂盒抽样按GB/T 2828.1 执行，试剂抽样按HG/T 3921执行。

* + 1. 检验规则

每组批产品均需按标准进行检查，检验合格后方可入半成品合格区。检验结果中一项不合格，允许进行二次抽样复检，若复检后仍不合格，则判定该批产品不合格。

* 1. 试剂盒评价方法
     1. 需要评价的技术指标

试剂盒分为定性检测用与定量检测用试剂盒。采用定性检测用试剂盒试验出具的检测报告仅出具阴性与阳性的判断结果,不报送具体检测数值。采用定量检测用试剂盒试验出具的检测报告报送在检测限以上的检测数值。

定性检测用试剂盒需评价试剂盒的灵敏度、特异性、假阴性率/假阳性率。定量检测用试剂盒需评价试剂盒的线性和范围、检测限、定量限、准确度、精密度。

* + 1. 定性检测用试剂盒技术指标的评价方法
       1. 基本要求

采用至少3个不同批次的试剂盒,每一批次的试剂盒分别对20份阴性控制样品、20份加标样品进行检测。加标样品的加标浓度与试剂盒提供的临界控制值一致。同时采用参考方法进行检测。参考方法与试剂盒方法检测结果的表示如表1所示。

表1 参考方法与试剂盒方法检测结果表示

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 测试样品实际状态a | 试剂盒检测结果b | | 合计 |
| 阳性 | a | b | a+b |
| 阴性 | c | d | c+d |
| 合计 | a+c | b+d | a+b+c+d |
| a参考方法的检出结果。  b试剂盒方法的检测结果。 | | | |

* + - 1. 灵敏度

灵敏度=a/(a+c)。

* + - 1. 特异性

特异性=d/(b+d)。

* + - 1. 假阴性率/假阳性率

假阴性率与灵敏度相对应，即灵敏度=1-假阴性率=c/(a+c)。

假阳性率与特异性相对应，即特异性=1-假阳性率=b/(b+d)。

* + 1. 定量检测用试剂盒技术指标的评价方法
       1. 线性和范围

以标准溶液考察线性和范围。标准浓度应包括一定梯度的至少5个浓度，每个浓度至少重复测定3次，其均值作为标准曲线的测定值，按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，通过标准溶液浓度的吸光值绘制标准曲线；标准曲线应覆盖样品可能的浓度范围。

* + - 1. 检测限

以20份空白样品测定读数的均值加3倍标准偏差计算检测限，以分析物的浓度单位进行表征。

* + - 1. 定量限

以20份空白样品测定读数的均值加10倍标准偏差计算定量限。定量限应等于或大于校准曲线上最低浓度点,对于定量分析来说，每种样品基体强标准至少加标6个点进行实际分析，而后计算得到定量限，定量限不能以外推法获得。定量限应大于标准曲线中最低浓度点并包括在线性范围内。在定量限水平，上重复至少6次实验。

* + - 1. 准确度
         1. 与参考方法的比较

采用试剂盒与参考方法分别对同一份样本进行至少6次的测试。参考方法可以是国际标准、国家标准、行业标准或其他经过验证的方法。比较结果需要采用适当的统计学方法进行分析（如配对t检验法）以证明两种方法之间的偏倚。

* + - * 1. 采用有证标准物质

对有证标准物质（CRM）进行6次重复检测；计算每次重复检测的分析物浓度；计算6次重复检测的平均值、标准偏差和变异系数；按式（1）计算正确度:

正确度（%）=检测值/认定值×100…………………………………………（1）

* + - * 1. 回收率

以添加回收率表征定量检测试剂盒的准确度。对于试剂盒所适用的每种基体，每种基体添加3个浓度水平的目标分析物，每个水平至少测定6次。所添加的浓度范围应涵盖高、中、低三个水平。

* + - 1. 精密度

针对每一种样品（基体）*n*的*m*个测试组分在*d*天内进行*r*次重复测定，其中*r*×*m*应不小于10；*n*至少为2；*d*至少为2。计算得到的重现性实验下的相对标准偏差（*RSD*r）值。

理论标准偏差按式（2）计算：

*PRSC*=*2C*-0.15 …………………………………………（2）

式中：

*PRSC*——理论标准偏差；

*C* ——以质量分数表示（如浓度为100%时，*C*为1，浓度为1μg/g时，C为0. 000 001）。

精密度用*HORRAT*值表示，按式（3）计算：

*HORRAT*= *RSD*r/*PRSC* …………………………………………（3）

式中：

*RSD*r ——重现性实验下的相对标准偏差；

*PRSC*——理论标准偏差。

* 1. 使用说明书

试剂盒应附产品使用说明书，或等同的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分：

1. 品种名称（中英文）；
2. 测定原理；
3. 适用范围，提及检测的目标物和适用的基质范围；
4. 使用单位需自备的设备和试剂；
5. 提供的材料和试剂；
6. 溶液配制方法；
7. 样品前处理的方法；
8. 详细的检测步骤或操作指南；
9. 结果判定；
10. 分析质量参数：定性试剂盒的灵敏度、特异性、假阴性率/假阳性率；定量试剂盒的标准曲线、检出限和定量限、正确度和精密度、交叉反应；
11. 保存条件和有效期。
    1. 标签

产品名称。

生产批号或生产日期。

规格和数量。

运输和保存温度。

有效期。

生产企业名称和地址。

