新型冠状病毒肺炎防控背景下临床基因扩增实验室

技术审核要点

凡任芝 沈佐君

中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院），安徽省临床检验中心

PCR即为聚合酶链反应(polymerase chain reaction)，该技术在医学领域可用于人体外源性（如病毒、细菌、支原体、衣原体等感染性疾病）和内源性（如遗传性疾病、肿瘤等）核酸的检测，是一种快速、特异的检验方法。在新冠疫情期间该技术发挥了关键性作用，国家卫生健康委办公厅发布的各版《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》均将“实时荧光RT-PCR检测新型冠状病毒（2019 novel coronavirus，2019-nCoV）核酸阳性”作为疑似新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019，COVID-19）患者最后确诊的重要条件之一。在《国家卫生健康委办公厅关于进一步加强新冠肺炎疫情防控期间发热门诊设置管理和医疗机构实验室检测的通知》（国卫办医函〔2020〕263号）文件内明确要求各三级综合医院及符合条件的专科医院、二级综合医院均应提高医疗机构临床实验室检测能力，尤其是COVID-19核酸检测能力。按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》，该检测技术在临床上运用前需要经过卫生主管部门的技术审核，相关依据为《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》，主要按照《临床基因扩增检验实验室技术审核表》对实验室设置和设备、设施和环境、人员、设备管理、检测方法、标本管理、记录、报告、质量控制、抱怨等共10章38款要求逐一审核。结合最新版的《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》和《新型冠状病毒实验室生物安全指南》等针对性标准要求，本文对新型冠状病毒肺炎防控背景下临床基因扩增实验室技术审核要点进行分析，目的是为了结合审核活动要求进一步规范COVID-19核酸检测技术在临床上的应用，关注检测过程的生物安全问题，同时确保检测结果的准确性。

1实验室生物安全管理体系

1.1生物安全管理体系

生物安全即针对生物危害，通过深入分析和研究各种生物相关因素对人类社会、经济、健康及生态环境所产生的危害或潜在危害，在风险评估基础上，通过采用系统化管理和综合性防护措施，预防控制或消除实验室感染相关的各项风险因素，进而提高生物安全防护能力。结合最新的生物安全指南相关要求，COVID-19核酸检测技术审核上需要关注生物安全体系的建立、实验室设施、人员的管理、风险评估和管控以及实验室清洁消毒管理等方面内容。

1.2生物安全管理的核心要点

1.2.1实验室基础建设

COVID-19核酸检测除了考虑扩增产物污染外，还需要重点关注生物安全问题。按照工作导则要求，“各区域在物理空间上必须是完全相互独立的，不能有空气的直接相通”，为防止核酸污染以及气溶胶扩散，每个区应有独立新风系统，不能共用一个空调系统；“按照从试剂储存和准备区→标本制备区→扩增区→扩增产物分析区方向空气压力递减的方式进行”，可通过负压排风装置、排风扇或其他可行的方式实现；执行实验室通风要求的同时考虑气溶胶扩散的危害；有条件的机构应将新冠病毒核酸检测实验室设置在相对独立的建筑单元。

1.2.2标本运输和样本管理

样本运输是重点的风险管控点，特别是院外运输，需按照生物安全指南要求照A类或B类感染性物质进行三层包装，运输应当按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（卫生部令第45号）办理“准运证书”，鉴于转运人员可能存在专业知识不足的问题，需进行专门的生物安全知识培训并建立考核机制。按要求新型冠状病毒毒株和相关样本应当由专人管理，需要准确记录毒株和样本的来源、种类、数量、编号登记，采取有效措施确保毒株和样本的安全，严防发生误用、恶意使用、被盗、被抢、丢失、泄露等事件。目前标本采集主要依靠医护人员，除了按照规范制定和发放检验采集手册外，就未能及时得到转运的标本也需要有明确的暂存管理方案。

1.2.3标本接收及处理

在COVID-19核酸检测技术和生物安全指南里均重点强调样本接收和处理的安全性问题，实验室应认真梳理相关流程并不断优化，尽量减少风险暴露的可能性。“标本接收”除需建立规范的SOP文件、在生物二级生物安全柜内操作外，如需要样本签收，且步骤可能要在病毒灭活前完成，需考虑暴露和污染风险，有医院采用双标签的方式，可有效的降低风险；有专家建议利用上下两层传递窗的设计实现样本进入和废弃物转出标本制备区，从而降低对缓冲间“污染”的风险，同时需加强传递窗密封性、单向开启及清洁消毒等措施；在标本前处理前，应严格按照相关标准使用和监测生物安全柜的运行情况，提前准备好样本处理所需的所有可能物品，且处理过程中动作要尽量做到轻拿轻放；无论手工提取还是使用核酸提取仪，都应有处理气溶胶产生的方案和措施。

1.2.5废弃物处理

检测过程中产生的有潜在感染性的废弃物，如包装、试验耗材及废液等，均应采用化学消毒或物理消毒方式处理，并对消毒效果进行监测。可以在样本制备区内高压消毒后再进一步转出处置，以降低对后续各环节的“可能”风险。

1.2.6实验室清洁消毒

工作导则明确要求“工作结束后，必须立即对工作区进行清洁”。生物安全指南要求工作后需对整个样本制备区域、生物安全柜、其他使用仪器、工作台面和地面以及存放标本容器等根据其不同特性选择有效的清洁消毒方式。COVID-19核酸检测需严格关注核酸污染和生物安全问题，例如悬挂紫外消毒灯和移动紫外消毒车的规范使用和有效光强度检测工作，各清洁消毒剂配制比例和有效期问题等。

1.2.7意外事件防范及处理

按照《医疗机构临床实验室管理办法》要求，COVID-19核酸检测需要制定意外事故处理程序和职业暴露处置流程，该检测涉及到的采样、转运、检测及后续废弃物处理过程中，当防护用品破损或污染物泼溅时应理解更换或处理；应在实验室前将各项防护措施提前准备好，并确保在有效期内。

2加强质量体系建设，确保检测能力

2.1质量体系建设

按照管理办法要求，临床基因扩增实验室在开展每个项目前应建立相应的质量管理体系，除涉及到具体的质量手册、程序文件、标准操作规程（SOP）以及记录外，还需确保体系文件的法规性、唯一性、和可操作性，同时也应保证文件的可获取性。针对COVID-19核酸检测还应将风险管理引入到质量体系文件建设中，系统地应用管理政策、程序和实践来完成风险的分析、评价、控制和监测的任务，帮助实验室对特定的过程建立特定的质量控制计划，使系统固有的质量控制、外部质量控制及其他质量控制程序达到最佳的平衡，从而保证检测结果的准确性。

2.2加强质量体系建设核心要点

2.2.1人员培训

按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》要求，核酸检测人员需经过指定机构培训并取得“上岗证”，在此次疫情期间，由于标本量突发且较大，不少机构存在具备资质人力不足的现象，实验室需提前做好人才储备工作。由于分子生物学技术的快速发展，还需做好人员后续继教培训以及效果考核工作。针对COVID-19核酸检测，还需对参与标本采集、转运等环节人员进行培训和考核，针对不同的岗位设计培训内容及考核内容。

2.2.2标本采集

基因扩增检测对标本采集的要求十分严格，特别是宏基因组、测序时代，不仅要取得目标基因，还要充分考虑防范“污染”基因的可能。针对COVID-19核酸检测，《技术指南》明确指出可以检测的标本，已有大量研究对标本类型的检出率等做了比对工作。相关数据实验室应在标本采集手册内体现并告知临床，进一步明确标本采集时机、有效的标本类型等。针对不同样本类型，实验室需制定对应的样本处理程序，建立基于标本类型的性能数据供临床参考。

2.2.3仪器维护与校准

按照审核条款要求主要设备（离心机、加样器、扩增仪和/或酶标仪、生物安全柜等）应有维护程序文件及维护记录。特别针对实验过程中使用到加样系统、温湿度系统、及各检测系统应根据具体仪器的说明书等完善主要设备维护、校准程序，并做好相应的维护、校准计划和相关记录工作。

2.2.4试剂和关键耗材质检

审核条款要求使用经国家药品监督管理局批准的试剂，实验室应按照扩增平台选用试剂厂家声明“适用性”的试剂，并按照相关规范做好试剂质检工作。对COVID-19此类RNA病毒检测，关键性耗材的酶抑制物质检十分重要。

2.2.5质量控制策略

类似其他常规核酸检测项目，COVID-19核酸检测需制定完整的质量控制策略。外部质量评价方面，国家临床检验中心、上海市临床检验中心等组织通过无生物传染危险性病毒特定RNA序列的病毒样颗粒（VLPs）等方式为国内检测实验室提供免费的室间质评（EQA）活动，有力的保障了实验室的检测结果的准确性。实验室也可以定期通过其他检测系统建立比对方案，来监督、评估检测系统的能力情况。如使用两套以上检测系统，实验室内部也应建立比对程序，并做好定期比对工作。

室内质控（IQC）是实验室应重点关注的内容，COVID-19核酸检测应在试剂盒阴、阳性对照外，应建立覆盖核酸提取和扩增全过程的室内质控策略，鉴于商务商品化质控品购置难度，可以利用既往较低浓度阳性样本用于批间重复性的监测。此外实验室应关注每日检测阳性率变动情况，当检测一定数据后可依据本实验室阳性率开展质控，依据二项式分布计算阳性概率，制作P控制图，当阳性率超过后低于控制范围时应停止实验，查找原因，排除污染或其他影响因素后才能开展检测工作。因各实验室面对的标本来源不同，报告模式不同，实验室间阳性率没有可比性。同时阴性质控设置也需要重点关注，按照技术指南要求合理的设置阴性质控策略，可有效的避免“假阳性”问题。

2.2.5检测方法的性能验证

鉴于COVID-19核酸检测对临床的重要意义，实验室应在正式开展检测之前，完成性能验证工作，并覆盖到可能的样本类型。需根据试剂盒声明的性能参数设计合理的方案，至少包括精密度、符合率和检出限等。更换或者上新系统期间实验室应加强临床的沟通，注意监控检测结果与临床诊断的一致性。

2.2.6结果报告及规范性

实验室需关注结果报告及规范性并建立相应的程序文件。在COVID-19核酸检测报告单上除常规内容外，还应明确标本类型，使用的试剂和仪器等信息。鉴于不同试剂厂家扩增靶区域、阳性结果标准设置的不同，推荐使用《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》中阳性判断标准（实验室确认阳性病例需满足以下两个条件中的一个：（1）同一份标本中新型冠状病毒2个靶标ORF1ab、N，实时荧光RT-PCR检测结果均为阳性。如果出现单个靶标阳性的检测结果，则需要重新采样，重新检测。如果仍然为单靶标阳性，判定为阳性。（2）两种标本实时荧光RT-PCR同时出现单靶标阳性，或同种类型标本两次采样检测中均出现单个靶标阳性的检测结果，可判定为阳性）。

2.2.7患者信息安全

按《国家卫生健康委办公厅在重大突发传染病防控工作中加强生物样本资源及相关科研活动管理工作的通知》要求“未经批准，不得向任何其他机构和个人提供生物样本、病原体、培养物及其相关信息”。鉴于新冠病毒检测的特殊性，临床实验室，尤其第三方检验检测机构存在患者样本及信息外泄的风险。各机构在保证质量的前提下，进一步完善患者样本保存及信息安全制度。做好各环节交接记录和监控措施。

疫情期间，各医疗机构PCR实验室在病人确诊方面起到了关键作用，并在随后复工复产和入境等各种筛查中发挥了重要作用。作为与病毒零距离接触的科室，未见核酸检测实验室源感染的报道，这些得益于卫生主管部门和以李金明教授为代表专家们的不懈努力，在近二十年的临床应用中，建立健全了严格的临床基因扩散技术审核制度。随着高通量测序技术的出现，以PCR技术为基础的各项新技术得到了快速发展，无创产前筛查(noninvasive prenatal screening, NIPS)、肿瘤基因突变、遗传病、胚胎植人前遗传学筛查( preimplantation genetic screening, PGS )和胚胎植人前遗传学诊断( preimplantation genetic diagnosis, PGD)、病原微生物及宏基因组学( metagenomics)等展现了极为广阔的临床及科研应用前景。目前这些新技术的技术审核还主要依据管理办法和工作导则，同时参考类似《孕妇外周血胎儿游离DNA产前筛查与诊断技术规范》、《感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南》和《个体化医学检测微阵列基因芯片技术规范》等规范指南。

实际工作中，按照“各区独立、注意风向、因地制宜和方便工作”的原则，COVID-19核酸检测实验室应合理规划相关布局及流程，确保实验室设施与环境满足要求；使用的仪器、试剂和关键耗材应满足行业规范要求，检测人员应取得相应资质，所有参与人员均应经过岗前培训；建立规范的新型冠状病毒核酸检测质量管理体系；提前做好生物安全风险评估工作，完善生物安全相关制度及各类管理程序，保障日常生物安全管理、标本管理、实验室清洁消毒等所需措施；实验室应关注检测活动对环境和其他人员带来风险的可能。总之，各临床基因扩增检测实验室应进一步理解技术审核的目的，完善实验室生物安全管理、防止核酸污染、规范化操作与流程优化等问题。