

# 医学实验室质量和能力认可准则 在分子诊断领域的应用说明解释 CNAS-CL02-A009

2014年4月21日第一次修订，2014年11月1日实施

**沈佐君**

**zuojunshen@ustc.edu.cn**

# 1 范围

本文件规定了CNAS对分子诊断领域的认可要求，包括：**病原体核酸和人体基因等领域涉及的核酸扩增试验、杂交试验（包括解剖病理中的原位杂交试验）、核酸电泳分析等。**

注：“分子诊断”包括检验医学领域的“分子检验”以及病理学检查领域的“分子病理”。

# 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（包括修改单）适用于本文件。

**GB/T 20468-2006 临床实验室定量测定室内质量控制指南**

**CNAS-RL02 能力验证规则**

**CNSA-CL31 内部校准要求**

**临床技术规范·病理学分册**

**医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则**

**病理科建设与管理指南（试行），卫办医政发〔2009〕31号**

# 3 术语和定义

# 4 管理要求

## 4.1 组织和管理责任

- **4.1.1.2** 实验室为独立法人单位的，应有医疗机构执业许可；实验室为非独立法人单位的，其所属医疗机构执业证书的诊疗科目中应有医学实验室，**自获准执业之日起，开展分子诊断工作至少2年。**
- **4.1.2.5** 应至少有1名具有副高及以上专业技术职务任职资格，从事分子诊断工作至少5年。

# 5 技术要求

## 5.1 人员

- **5.1.2** 分子诊断实验室（以下简称实验室）负责人应至少具有中级专业技术职称、从事分子诊断工作至少3年。
- 分子诊断实验室操作人员应经过有资质的培训机构培训合格取得上岗证后方可上岗。
- 签发分子病理报告的医师应至少具有中级病理学专业技术职务任职资格，并有从事分子病理工作的经历。
- 认可的授权签字人应至少具有中级专业技术职务任职资格，从事申请认可授权签字领域专业技术工作至少3年。

# 5 技术要求

## 5.1 人员

- 5.1.3 实验室应至少具有2名检验/检查人员。
- 5.1.6 应每年评估员工的工作能力。对新进员工在最初6个月内应至少进行2次能力评审，保存评估记录。
- 当职责变更时，或离岗6个月以上再上岗时，或政策、程序、技术有变更时，应对员工进行再培训和再评估，合格后才可继续上岗，并记录。

# 5.1 人员

- 操作人员考核的主要内容：

标本接收与处理：流程和标本是否合格的要点

试剂耗材质检：为何要质检、如何做

核酸提取：原理和操作技术要领

防污染：措施和意识

质量控制：程序和实际运行情况、失控的分析处理

结果分析与判断：结果审核、报告发放

## 5.1 人员

- **在现场评审时要求安排人员比对：临床基因扩增检验的操作主要是标本处理中的核酸提取步骤，这其中所涉及的又主要是加样器的使用，尽管操作简单，但由于均为微量操作，最后扩增放大，因此要获得稳定可靠的测定结果，操作人员需要一定的专业技术知识和经验。**

# 5.1 人员

在现场安排实验时应考虑到的问题：

- 标本数量：一般5个；
- 标本要求：一份阴性，其余4份一般要尽可能涵盖高、中、低、临界等浓度差，尽可能涵盖测量区间。
- 最低检出限、线性区间、测量区间。



# 5.2 设施和环境条件(3-1)

**5.2.1** 应实施安全风险评估，如果设置了不同的控制区域，应制定针对性的防护措施及合适的警告。

**5.2.2** 涉及基因扩增检验的实验室原则上分四个独立的工作区域：试剂贮存和准备区；样品制备区；扩增区；扩增产物分析区。如使用自动分析仪（扩增产物闭管检测），扩增区和扩增产物分析区可合并。具体实验室分区应依据其所使用的技术平台及检验项目和工作量而定。

上述每个区域应有充足空间以保证：

- 样品处置符合分析前、后样品分区放置；
- 仪器放置符合维修和操作要求；
- 样品制备区放置生物安全柜、离心机和冰箱等仪器设备；
- 打印检验报告时交叉污染的控制。

## 5.2 设施和环境条件(3-2)

- 工作区域应符合如下要求：
- c) 实验室各分区应配置固定和移动紫外线灯，波长为254nm，照射时离实验台的高度一般为60~90cm；
- e) 样品制备区应配置二级生物安全柜和洗眼器，实验室附近应有喷淋装置。
- 所有分子病理实验室均应设置独立的标本前处理区，包括切片区和脱蜡区，用于组织切片、脱蜡、水化、染色等。脱蜡、水化及染色应在通风设施中进行。

## 5.2 设施和环境条件(3-3)

- **5.2.3**用以保存临床样品和试剂的设施应设置目标温度和允许范围，并记录。实验室应有温度失控时的处理措施并记录。
- **5.2.6**不同的实验区域应当有其各自的清洁用具以防止交叉污染。工作结束后应立即对工作区进行清洁，必要时进行消毒及去污染。

应依据所用分析设备和实验过程的要求，制定环境温湿度控制要求并记录。应有温湿度失控时的处理措施并记录。

扩增仪应配备不间断电源（UPS）；

应依据用途（如：RNA检测用水），制定适宜的水质标准（如：应除RNase），并定期检测。

分子检验各工作区域应有明确的标记。进入基因扩增实验室各工作区应按照单一方向进行，即试剂贮存和准备区→样品制备区→扩增区→扩增产物分析区。不同的工作区域宜使用不同的工作服（如不同的颜色）。工作人员离开各工作区域时，不应将工作服带出。

## 5.3 实验室设备、试剂和耗材(6-1)

- **5.3.1.1** 如从事RNA检测，宜配备-70℃的冷冻设备。需要时，配备高速冷冻离心机。标本制备区使用的一次性加样器吸头应带有滤芯。PCR试验用容器应可密闭，不同工作区域内的设备、物品不能混用。
- 组织标本前处理区的设备通常应包括切片机、裱片机、切片刀、电热恒温箱、脱蜡缸、水化缸及HE染色缸等。

## 5.3 实验室设备(6-2)

- **5.3.1.4** 应按国家法规要求对强检设备进行检定。应进行外部校准的设备，如果符合检测目的和要求，可按制造商校准程序进行。应至少对分析设备的加样系统、检测系统和温控系统进行校准（适用时）。分析设备和辅助设备的内部校准应符合CNAS-CL 31《内部校准要求》。
- **ABI 5700 FAM™/SYBR® Green I, VIC®/JOE™, NED™/TAMRA™/Cy3®, ROX™/Texas-Red®和Cy5®**
- 应定期对基因扩增仪、加样器、温度计、恒温设备、离心机和生物安全柜等进行校准。

**样本升降温速率：**快速模式：  $-1.6-+0.8^{\circ}\text{C}/\text{秒}$

标准模式：  $\pm 1.6^{\circ}\text{C}/\text{秒}$

**加热块最高升降温速率：**  $2.5^{\circ}\text{C}/\text{秒}$

**温度范围：**  $4^{\circ}\text{C}-100^{\circ}\text{C}$

**温度精度：** 设置值/显示温度的  $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$  ( $35^{\circ}\text{C}$ 至 $95^{\circ}\text{C}$ ) (时钟启动后3分钟开始测量)

**温度均一性：**  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ( $35^{\circ}\text{C}$ 至 $95^{\circ}\text{C}$ ) (时钟启动后30秒开始测量)

**光学系统：** 五色激发光滤光片，五色发射光滤光片和CCD成像系统

**安装时已校准染料：** SYBR<sup>®</sup> Green I, FAM<sup>™</sup>, VIC<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup>, NED<sup>™</sup>, TAMRA<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup>, Texas Red<sup>®</sup>, Cy3<sup>™</sup>, Cy5<sup>™</sup>。

**被动参照染料：** ROX<sup>™</sup>

## 5.3 实验室设备(6-3)

**5.3.1.5** 设备故障后，应首先分析故障原因，如果设备故障可能影响了方法学性能，故障修复后，可通过以下合适的方式进行相关的检测、验证：

(a) 可校准的项目实施校准验证，必要时，实施校准；

(b) 质控物检验；

(c) 与其他仪器或方法比对，偏差符合附录A.3的要求；

(d) 以前检验过的样品再检验，偏差符合附录A.5的要求。

## 5.3 实验室设备(6-4)

**5.3.2.1** 实验室应建立试剂和关键耗材（如离心管、带滤芯的吸头）的验收程序，相应程序中应有明确的判断符合性的方法和质量标准（宜参考附录A）。

**5.3.2.3** 实验室应对新批号或同一批号不同货运号的试剂和关键耗材进行验收，验收试验至少应包括：

**外观检查：**肉眼可看出的，如包装完整性、有效期等；

**性能验证：**通过实验才能判断的，如试剂的核酸提取效率和核酸扩增效率、试剂的批间差异、关键耗材的抑制物等。



## 5.3 实验室设备(6-5)

试剂性能验证记录应能反映该批试剂的核酸提取效率和核酸扩增效率。一般情况下，临床实验室在新批号试剂或关键耗材使用前，应验证试剂批间差异和耗材的抑制物，符合附录A.6要求即可视为满足要求。特殊情况下，如实验室怀疑提取试剂有质量问题，可采用凝胶电泳试验比较核酸提取物与核酸标准物确认核酸片段提取的完整性、260nm紫外波长测定确认核酸提取的产率、260nm/280nm比值确认核酸提取的纯度。

## 5.3 实验室设备(6-6)

用于定性检验的试剂，选择阴性和弱阳性的样品进行试剂批号验证。

用于定量检验的试剂，应进行新旧试剂批间的差异验证，方法和要求参照附录A.6要求。

耗材的抑制物验收：对关键耗材应检测是否存在核酸扩增的抑制物，方法和要求参照附录A.6要求。

# 试剂质检

强调采用**患者**标本进行试剂质检的意义：

- PCR实验时两个关键步骤：
  - （1）从标本中提取核酸；
  - （2）提取核酸的扩增。
- 商品化的质控品和标准曲线的结果良好，并非能反映提取试剂的质量。

# 推荐的试剂质检方案

- **标本选择：** 一般选择已用老试剂测定过的患者标本5份，其中一份阴性，其余4份一般要尽可能涵盖高、中、低、临界等浓度差。
- **结果判断：** 用新试剂重复测定上述5份标本，计算偏差(%)；判断标准(根据实验室室内质控RCV和能力验证允许总误差TEa)；关注临界值和高值！

类别	结果1	结果2	偏差	判定标准	结论
样品号	测试1	测试2	计算%	总误差	符合/不符合
1	A1	A2	$(A1-A2)/A1 \times 100\%$	XX %	符合
2	B1	B2	$(B1-B2)/B1 \times 100\%$	XX %	符合
3	C1	C2	$(C1-C2)/C1 \times 100\%$	XX %	符合
4	D1	D2	$(D1-D2)/D1 \times 100\%$	XX %	符合
5	E1	E2	$(E1-E2)/E1 \times 100\%$	XX %	符合

# 5.4 检验前过程

**5.4.4.3** 应规定分子诊断样品留取的具体要求，如：

- (a) 使用无DNase和/或无RNase的一次性密闭容器；
- (b) 正确使用抗凝管：通常全血和骨髓样品应进行抗凝处理，EDTA和枸橼酸盐为首选抗凝剂，不使用肝素抗凝（核酸提取采用吸附法而不受肝素干扰时除外）；
- (c) 用于RNA（如HCV RNA）扩增检测的血样品宜进行抗凝处理，并尽快分离血浆，以避免RNA的降解；如未作抗凝处理，则宜尽快分离血清。
- (d) 分泌物、拭子、肿瘤组织等样品留取的注意事项等。

## 5.4 检验前过程

5.4.6 e) 基于组织/细胞学形态基础的分子检测项目应由具有病理诊断资质的医师确认样品是否满足检测要求。

5.4.7 样品应尽快处置并以适当方式储存，以尽可能减少核酸降解。超长期储存后的标本，使用前应再次评估标本的完整性。

检测样品若为组织，应采用10%中性缓冲的福尔马林固定，固定液的量和固定时间应符合检测要求。

# 5.5 检验过程

**5.5.1.2** 定量检测方法和程序的分析性能验证内容至少应包括精密度、正确度、线性、测量和/或可报告范围、抗干扰能力等。定性检测项目验证内容至少应包括测定下限、特异性、准确度（方法学比较或与金标准比较）、抗干扰能力等。验证结果应经过授权人审核。应使用验证过的核酸抽提和纯化方法，必要时进行核酸定量。



# 5.5 检验过程

对产前检验，在完成分子诊断前应保留备份培养物并跟踪监测实验的准确性；在检验胎儿标本前，应检验父母一方或双方的突变状态，宜由同一实验室检验；如有足够的标本，应从两份不同标本中提取DNA进行双份检验。实验室应了解检验方法受母体细胞污染的影响，应有程序评估并减少这种影响。

应有明确和统一的原位杂交（ISH）阳性信号的标准，并建立本实验室的阳性阈值。组织病理ISH，应结合组织形态进行结果判读，并采用国际通用的评分标准。

# 5.6 检验结果质量的保证(6-1)

## 5.6.2.1 总则

应制定室内质量控制程序，定量测定可参照GB/T 20468 - 2006《临床实验室定量测定室内质量控制指南》。质量控制程序中应有针对核酸检测防污染的具体措施。

**应保留DNA质量评价记录。**需要时，应对RNA的质量进行评价，并选择合适的“管家”mRNA作为内对照以评价所提取RNA的完整性，并保留RNA质量评价记录及假阴性率监测记录。

对用于基因突变检测的石蜡包埋样品，应有病理医师从组织形态学对**肿瘤细胞的存在与否及其数量**进行评价，并决定是否需要对肿瘤细胞进行富集。

当分子诊断结果与临床和其他实验结果不符时，应记录并分析原因，适当时采取纠正措施。

# 5.6 检验结果质量的保证(6-2)

## 5.6.2.2 质控物

**定性检测项目**，每次实验应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控物。如为基因突变、基因多态性或基因型检测，则应包括最能反映检测情况的突变或基因型样品，每批检测的质控至少应有一种基因突变或基因型。

**定量检测项目**，每次实验应设置阴性、弱阳性和阳性质控物。

# 5.6 检验结果质量的保证(6-3)

## 5.6.2.3 质控数据

质控规则应确保试验的稳定性和检验结果的可靠性。

定量检测项目：控图应包括质控结果、质控物名称、浓度、批号和有效期、质控图的中心线和控制界线、分析仪器名称和唯一标识、方法学名称、检验项目名称、试剂和校准物批号、每个数据点的日期和时间、干扰行为的记录、质控人员及审核人员的签字、失控时的分析处理程序和纠正措施等。

定性检测项目：阴阳性符合预期。

## 5.6 检验结果质量的保证(6-4)

**5.6.3.1** 应按照CNAS-RL02 《能力验证规则》的要求参加相应的能力验证/室间质评。应保留参加能力验证/室间质评的结果和证书。实验室负责人或指定人员应监控室间质评活动的结果，并在结果报告上签字。

# 5.6 检验结果质量的保证(6-5)

5.6.3.2 通过与其他实验室（如已获认可的实验室、使用相同检测方法的实验室、使用配套系统的实验室）比对的方式确定检验结果的可接受性时，应满足如下要求：

- (a) 规定比对实验室的选择原则；
- (b) 样品数量：至少5份，包括正常和异常水平或不同常见基因突变或基因型；
- (c) 频率：至少每年2次；
- (d) 判定标准：应有 $\geq 80\%$ 的结果符合要求。

# 5.6 检验结果质量的保证(6-6)

**5.6.4** 实验室使用两套及以上检测系统检测同一项目时，应有比对数据表明其检测结果的一致性，比对频次每年至少1次，样品数量不少于20，浓度水平应覆盖测量区间；应定期（至少每年1次，每次至少5份临床样品）进行检验人员的结果比对、考核并记录。比对结果应符合附录A的要求。

使用不同生物参考区间的检测系统间不宜进行比对。

比对记录应由实验室负责人审核并签字，并应保留至少2年。

## 实验室质量控制方案

实验室应有室内质控方案和室间质评计划

1. 室内质量控制标准操作程序；

阳性对照、阴性对照、试剂空白对照、  
阳性（临界值）对照

2. 实验室应参加EQA。

失控结果的分析，纠正措施及其效果评价等。



## 质控物的质量保证

无商品化质控物时，可采用自制的质控物。

质控物的评价：均一性、瓶间差、稳定性等。

**理想质控物：**

**基质与待测样本一致；**

**所含待测物浓度接近试验的决定性水平；**

**稳定；**

**靶值或预期结果已定；**

**无已知的生物传染危险性；**

**单批可大量获得；**

**价廉。**



国家认可

# 不符合项案例

定量PCR试验HCV-RNA使用GBW09151标准物质验证准确性，定值 $1.09 \pm 0.27 \times 10^5$  IU/ml，实测 $0.79 \times 10^5$  IU/ml，偏差27.5%，超出定值范围，未进行处理（5.6.3）。

直接计算：偏差 =  $[(1.09 - 0.79) \times 10^5 / 1.09 \times 10^5] \times 100\% = 27.5\%$ （不符合项）；

但是，取对数计算： $\log 1.09 \times 10^5 = 5.0374$ ； $\log 0.79 \times 10^5 = 4.8976$ ；

偏差 =  $[(5.0374 - 4.8976) / 5.0374] \times 100\% = 2.78\%$ 。

即：直接用IU/ml计算为27.5%（数值较大），取对数后为2.78%（数值较小）。

假定一个样品靶值为 $1 \times 10^4$ ，

如果检测结果为 $1 \times 10^3$ ，则  $(1 \times 10^3 - 1 \times 10^4) / 1 \times 10^4 = -0.9 = -90\%$ ；

如果检测结果为 $1 \times 10^5$ ，则  $(1 \times 10^5 - 1 \times 10^4) / 1 \times 10^4 = 9 = 900\%$ 。

取对数计算： $\log 1 \times 10^3 = 3$ ， $\log 1 \times 10^4 = 4$ ， $\log 1 \times 10^5 = 5$ ，则  $(4 - 3) / 4 = 0.25 = 25\%$ （非90%）， $(4 - 5) / 4 = -0.25 = -25\%$ （非900%）。

以上数据说明，如果直接按IU/ml或copies/ml绘制质控图或计算CV%会导致失真，原因是我们通过体外扩增来推算样本中核酸的模板量，但扩增的产物是2的N次方，放大了。这是强调为什么要取对数计算的原因。

## 5.7 检验后过程

**5.7.2** 原始样品、核酸提取物和/或核酸扩增产物应规定保存期，便于复查。为便于追溯，凝胶图像和斑点杂交条带和/或通过扫描、拍照等方式保留的结果应作为技术记录保存，保存期限参照相关行业要求。

## 5.8 结果报告

**5.8.3** 除了通用要求外，适用时，分子诊断报告内容还应包括方法的局限性、进一步检测的建议、相关咨询人员姓名及联系方式。

参考HOKLAS\_SC-30 molecular genetic: 5.8.1 应在规定时限内报告每一项分子诊断学检验结果。基于组织/细胞形态学的分子病理检查结果应由病理医师负责结果判读和签发报告。应实施双签名。

对于产前及产后诊断先天性疾病，检验结果应由有资质的病理学家或由有临床背景的经适当培训且有实验室经验的人员报告。

对于临床微生物学和传染病学，以下检验结果应当由有资质的经过适当的培训且有实验室经验的临床微生物学专家报告：

- a. 艾滋病毒：核酸扩增检验，病毒载量，抗病毒耐药类型；
- b. HCV：核酸扩增检测，病毒载量；
- c. 乙肝病毒：病毒载量、抗病毒耐药类型；
- d. SARS冠状病毒：核酸扩增试验；
- e. 除季节性流感（H1N1和H3N2）以外的甲型流感病毒：核酸扩增试验；
- f. 所有来自中枢神经系统标本的核酸扩增检测。

应该注意的是，仅用定性的分子检测结果用于艾滋病毒、乙肝病毒和丙肝病毒感染的临床诊疗是不够的。实验室应提醒医生，在开始任何决定性的治疗方案前需要考虑选做其他参数如血清学调查结果和临床特征。

**5.9 结果发布**

**5.10 实验室信息管理**

## 附录A (规范性附录)

### 分子诊断项目分析性能标准

- A.1 应不低于国家标准、行业标准、地方法规要求。
- A.2 自建检测系统不精密度要求：以能力验证/室间质评评价界限（靶值 $\pm 0.4$ 对数值）作为允许总误差（TEa），重复性精密度 $< 3/5TEa$ ；中间精密度 $< 4/5TEa$ 。
- A.3 设备故障修复后，分析系统比对：5份样品，覆盖测量区间，至少4份样品测量结果偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。
- A.4 实验室内分析系统定期比对：样品数 $n \geq 20$ ，浓度应覆盖测量区间，计算回归方程，系统误差应 $< \pm 7.5\%$ 。
- A.5 留样再测判断标准：按照项目稳定性要求选取最长期限样品，5个样品，覆盖测量区间，至少4个样品测量结果偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。
- A.6 试剂批间差异、耗材的抑制物的验收判断标准：选取5个旧批号检测过的样品，覆盖测量区间（包括阴性、临界值、低值、中值和高值），至少4个样品测量结果偏倚 $< \pm 7.5\%$ ，其中阴性和临界值样品必须符合预期。
- A.7 没有标准和室间质评要求时，实验室间结果比对合格标准可依据制造商声明的性能标准而制定。



## 附录B (规范性附录)

### 分子诊断领域申请认可项目要求

**B.1** 以下分子检验项目，每一组项目为完整能力项目，如果实验室开展以下项目组合，则申请该组中任一项目时，应同时申请其它项目（第3系列除外，但须至少申请其中的3项）。同一项目使用不同仪器 /方法报告结果时，全部仪器 /方法均应申请认可。

1. 肝炎系列：HBV、HCV（实验室仅开展1项者除外）；
2. 优生优育（TORCH）系列：TXO、RV、CMV、HSV；
3. 泌尿生殖道性传播疾病病原体系列：CT、NG、UU、HPV、HSV、TP。

**B.2**分子病理检测项目，至少应申请以下任意两个系列，每个系列至少申请一项。同一项目使用不同仪器 /方法报告结果时，全部仪器 /方法均应申请认可。

1. 突变检测：EGFR、KRAS、BRAF、C-KIT、PDGFRA 等；
2. 扩增系列：Her-2等；
3. 易位：EWS、Bcl-2、C-MYC、Bcl-6、ALK等；
4. 基因重排：IGH、IGK、IGL、TCR等。

**谢 谢!**

**zuojunshen@ustc.edu.cn**