

新型冠状病毒检测技术规范 第 20 部分：核酸荧光 PCR 检测质量控制

Technical specifications for SARS-CoV-2 detection

Part 20: Real-time fluorescence PCR test quality control

2022-XX-XX 发布

2022 - XX- XX 实施

江苏省市场监督管理局

发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 实验室资质 [1](#)

5 生物安全防护 [2](#)

6 质量管理体系文件 2

7 人员 2

8 环境设施 2

9 仪器设备和供应品 3

10 检测样本 3

11 性能验证 4

12 内部质量控制 4

13 外部质量控制 [4](#)

14 实验环境消毒与废弃物处理 5

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。

本文件为 DB 32/T 3762 《新型冠状病毒检测技术规范》的第20部分。DB32/T 3762目前分为以下部分：

- 第1部分：生物样本采集、运输和保存；
- 第2部分：病毒分离与鉴定；
- 第3部分：核酸荧光PCR检测程序；
- 第4部分：重组酶介导等温扩增程序；
- 第5部分：血清IgM和IgG抗体酶联免疫吸附检测程序；
- 第6部分：血清IgM和IgG抗体胶体金免疫层析检测程序；
- 第7部分：空气样本检测与评估；
- 第8部分：物体表面检测与评估；
- 第9部分：医务人员职业暴露检测与评估；
- 第10部分：微量血清中和试验；
- 第11部分：全基因组高通量测序；
- 第12部分：药物体外抗病毒效果测定；
- 第13部分：叠氮溴化丙锭-荧光PCR检测程序；
- 第14部分：N亚基因组荧光PCR检测程序；
- 第15部分：血清/血浆IgM和IgG抗体磁微粒化学发光法检测程序；
- 第16部分：核酸数字PCR法；
- 第17部分：核酸检测用假病毒阳性质控品；
- 第18部分：规模化核酸检测程序；
- 第19部分：全自动核酸快速一体化检测；
- 第20部分：核酸荧光PCR检测质量控制。

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。

本文件由江苏省卫生标准化技术委员会提出并归口。

本文件主要起草单位：江苏省疾病预防控制中心、苏州市疾病预防控制中心、南通市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：陈敏、徐金水、崔仑标、朱文静、吉文亮、李建、熊海平、徐佳南、刘兴莹。

新型冠状病毒检测技术规范

第 20 部分：核酸荧光 PCR 检测质量控制

1 范围

本文件规定了新型冠状病毒核酸荧光PCR检测实验室在实验室资质、生物安全防护、质量管理体系文件、人员、环境设施、仪器设备和供应品、检测样本、性能验证、内部质量控制、外部质量控制以及实验环境消毒与废弃物处理方面的通用要求。

本文件适用于新型冠状病毒核酸荧光PCR检测的质量控制。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

RB/T 214 检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求

CNAS-CL02 医学实验室质量和能力认可准则

全国临床检验操作规程 原中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光 PCR real-time fluorescence PCR

通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针，对 PCR产物进行标记跟踪，实时在线监控反应过程，结合相应的软件对产物进行分析，计算待测样本模板的初始浓度，用于鉴别病原微生物。

3.2

质量控制 quality control

为达到质量要求所采取的作业技术和活动。

3.3

内部质量控制 internal quality control

实验室为持续监控测量过程和测量结果以确定结果是否足够可靠达到可以发布的程度而采取的一组操作。

4 实验室资质

生物安全二级实验室（BSL-2）应向设区的市级人民政府卫生主管部门备案，临床检测机构基因扩增实验室还应取得“临床基因扩增检验实验室”资质，并在核定的范围内开展工作。

5 生物安全防护

未经培养的感染性材料的操作在采用可靠方法灭活前进行核酸提取及样本灭活等操作，应在 BSL-2 进行，同时采用生物安全三级实验室（BSL-3）的个人防护，配备 N95 及以上级别防护口罩、医用无纺布帽、护目镜或防护面屏、连体防护服、一次性手术衣、一次性 PE 手套、乳胶手套、鞋套、防水靴套等防护装备；感染性材料或活病毒在采用可靠方法灭活后进行的核酸检测操作应在 BSL-2 进行。

6 质量管理体系文件

实验室应依据 GB 19489、RB/T 214、CNAS-CL02、《全国临床检验操作规程》等文件建立质量管理体系文件。

7 人员

7.1 采样人员

从事新冠病毒核酸检测样本采集的人员应经过生物安全培训，熟悉样本种类和采集方法，熟练掌握样本采集操作流程及注意事项，做好样本信息的记录，确保样本质量符合要求、样本及相关信息可追溯。

7.2 检测人员

实验室检测人员应具备实验室工作经历以及相关专业技术技能，接受过新冠病毒核酸 PCR 检测技能和生物安全培训。检测机构应按照所开展检测项目及样本量配备实验室检测人员，以保证及时、高效完成检测和结果报告。

8 环境设施

8.1 实验室总体布局和各部位的安排应减少潜在的对样本的污染和对人员的危害。

8.2 开展新冠病毒核酸检测的实验室一般设置以下区域：试剂储存和准备区、样本制备区、扩增分析区，各区的主要功能包括：

- a) 试剂储存和准备区：贮存试剂的制备、试剂的分装和扩增反应混合液的制备，以及离心管、吸头等消耗品的贮存和准备。
- b) 样本制备区：转运箱的开启、样本的灭活，核酸提取及其加入至扩增反应管（孔）等。
- c) 扩增分析区：核酸扩增和产物分析。

8.3 根据所使用仪器的功能，区域可适当合并。如采用样本处理、核酸提取及扩增检测为一体的自动化分析仪，样本制备区和扩增分析区可合并。

8.4 各区域在物理空间上应完全相互独立，不得有空气的直接相通，各区域应有明确的标记，不同区域内的设备、物品不得混用。

8.5 人员开展工作应严格遵守从“试剂储存和准备区→标本制备区→扩增分析区”的单一流程制度，不得逆向进入前一工作区。

8.6 试剂储存和准备区宜采用常压或正压，样本制备和扩增分析区采用常压或负压且两区压力持平。有正压控制的工作区，从缓冲间到核心工作间压力递增；有负压控制的工作区，从缓冲间到核心工作间压力递减；各房间之间压差宜不低于 10 Pa，可通过安装排风扇、负压排风装置或其他可行的方式实现。

8.7 当检测方法对环境条件有要求或环境条件影响检测结果时，应监测、控制和记录环境条件，并设置允许范围。

9 仪器设备和供应品

9.1 应选择国家药品监督管理部门批准的试剂，扩增仪选用扩增检测试剂盒推荐的型号，使用核酸提取仪时宜使用仪器配套的提取试剂。

9.2 宜选用带滤芯的一次性加样器吸头。

9.3 对可能影响检测质量的供应品（包括实验用水）应在使用前进行符合性验收。

9.4 应对检测结果的准确性或有效性有影响的设备，包括用于测量环境条件等辅助测量设备有计划地实施检定或校准。设备在投入使用前，应采用核查、检定或校准等方式，以确认其是否满足检测的要求。

9.5 对于没有检定、校准规程，但需出具检测数据的仪器设备，实验室应根据随机说明书和有关技术资料确定可接受标准、维护和验证的程序及频次。

9.6 设备出现故障或者异常时，实验室应采取相应措施，如停止使用、隔离或加贴停用标签、标记，直至修复并通过检定、校准或核查表明能正常工作为止。应核查这些缺陷或偏离对以前检测结果的影响。

9.7 实验室配制的试剂应贴好标签，并在标签上注明试剂名称、容量、溶剂类型、配制及使用日期和/或保质期。若试剂有特殊使用说明、有毒有害提示或使用限制也应在标签上注明。

10 检测样本

10.1 样本种类

包括口咽拭子、鼻咽拭子、深咳痰液、肺泡灌洗液、支气管灌洗液、呼吸道吸取物、便标本/肛拭子、血液、血清、尿液、物体表面、污水等。

10.2 样本包装

所有样本应放在大小适合的带螺旋盖、内有垫圈的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期或等效标识。密闭后的样本放入大小合适的塑料袋内密封，每袋装一份样本。

10.3 样本送检

样本采集后室温放置不超过 4 h，应在 4 h 内送到实验室。如果需要长途运输样本，应采用干冰等制冷方式进行保存，严格按照相关规定包装运输。

10.4 样本接收

应在生物安全柜内打开内包装，样本运送人员和接收人员对样本进行双签收。

10.5 样本保存

样本应尽快进行检测，能在 24 h 内检测的样本可置于 4℃ 保存；24 h 内无法检测的样本则应置于 -70℃ 或以下保存（如无 -70℃ 保存条件，则于 -20℃ 冰箱暂存）。应设立专库或专柜单独保存样本，避免反复冻融。

11 性能验证

11.1 在用于样本检测前，实验室检测人员应对由提取试剂、提取仪、扩增试剂、扩增仪等组成检测系统进行必要的性能验证，性能指标包括但不限于精密度（至少要有重复性）和最低检测限，以确认能否复现商品试剂盒说明书载明的性能参数，能否达到预期的检测目的。宜选用高灵敏的试剂（检测限 ≤ 500 拷贝/mL）。

11.2 每当试剂盒的试剂组分或试验过程改变，或使用新批号或新货运号的试剂盒之前，应重新进行性能验证。

12 内部质量控制

12.1 标准操作规程制定

实验室应制定并严格执行标准操作规程，包括试剂准备、样本前处理、核酸提取、核酸扩增、结果分析及报告、可疑样本复检流程。

12.2 内部质量控制方式

12.2.1 每批检测至少有 1 份弱阳性质控品（第三方质控品，通常为检出限的 1.5 倍～3 倍）、3 份阴性质控品（生理盐水）。质控品随机放在待测样本中，参与从提取到扩增的全过程。

12.2.2 应选择合适的内源性对照如“管家”基因或外源性对照如假病毒作为内对照以评价实验过程的完整性。

12.2.3 物品和环境样本的采集检测，还需在采样前及采样过程中至少设一个现场空白样本及一个运输空白样本，以进行过程中的质量控制。

12.2.4 应定期采用保存液、生理盐水或 DEPC（焦碳酸二乙酯）水开盖放置过夜或拭子擦拭等方式对样品处理区域（含生物安全柜）、提取设备、加样器、冰箱把手、门把手等部位进行环境污染监测。

12.3 实验结果有效性的判定

当出现下述情况中的任何一种或多种，当次实验结果无效，查找原因，重做实验。

- a) 阴性质控品出现扩增；
- b) 阳性质控品无扩增；
- c) 内对照不满足试剂盒说明书规定的要求。

13 外部质量控制

实验室应常态化参加能力验证计划、测量审核、实验室间比对或质量控制考核，对检测量大以及承担重点人群筛查等任务的实验室，需适当增加频率。

14 实验环境消毒与废弃物处理

14.1 工作结束后，应立即对工作区进行清洁。工作区的实验台表面宜使用含氯消毒剂（1000 mg/L）或 75% 酒精喷洒或擦拭消毒，使用可移动紫外灯（254 nm 波长）距实验台面 60 cm~90 cm 内照射过夜。

14.2 试剂储存和准备区、扩增分析区的废弃物宜直接打包带出，无需高压处理；样本制备区的原始样本应经压力蒸汽灭菌方法处理，并作为医疗废弃物外送有资质的机构处置。

14.3 所有的危险性废弃物应依照统一规格化的容器和标示方式，完整、合规地标示废弃物内容。
