



**CNAS技术报告**

# 医学实验室 核酸检测质量和安全指南

中国合格评定国家认可委员会

## 目录

前言 .....	2
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 总则 .....	3
4 基于扩增的核酸检测程序 .....	4
4.1 手工核酸提取纯化及检测方法 .....	4
4.1.1 工作流程.....	4
4.1.2 设施设备与环境.....	4
4.1.3 质量控制关键点.....	6
4.1.4 安全管理.....	8
4.2 全自动核酸提取纯化及检测方法 .....	10
4.2.1 工作流程.....	10
4.2.2 设施设备与环境.....	10
4.2.3 质量控制关键点.....	11
4.2.4 安全管理.....	12
4.3 全自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统 .....	12
4.3.1 工作流程.....	12
4.3.2 设施设备与环境.....	12
4.3.3 质量控制关键点.....	13
4.3.4 安全管理.....	13
5 基于高通量测序的核酸检测程序 .....	14
5.1 工作流程 .....	14
5.2 设施设备与环境 .....	15
5.3 质量控制关键点 .....	16
5.4 安全管理 .....	19
附录 A（资料性附录）实验室功能区核酸检测采样方案 .....	20

## 前言

本文件由中国合格评定国家认可委员会（CNAS）制定，为 CNAS-CL02《医学实验室质量和能力认可准则》中有关分子诊断相关检验的质量和安​​全提供指南，供医学实验室和评审员参考使用。

本文件为首次发布。

本文件主要起草单位：中国合格评定国家认可中心、泰达国际心血管病医院、深圳华大医学检验实验室、广州达安基因股份有限公司、迪安诊断技术集团股份有限公司、罗氏诊断产品（上海）有限公司、北京中科基因技术股份有限公司、北京金域医学检验实验室有限公司、中国科学院微生物研究所。

本文件主要起草人：吕京、付岳、李沐洋、冯涛、周晓垂、岑妙兰、蒋析文、黄桃生、杨梅、姜育燊、原霖、郑燕华、朱以萍、周亚莉、李军燕、贾克刚、傅应裕、杨晨。

# 医学实验室 核酸检测质量和安全指南

## 1 范围

本指南适用于医学实验室从事核酸检测时参考使用。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本指南的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅该版本适用于本指南。凡是未注明日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改部分）适用于本指南。

《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB 19781 《医学实验室 安全要求》

GB 4793.9 《测量、控制和实验室用电气设备的安全要求》

GB/T 22576.1 《医学实验室 质量和能力的要求 第 1 部分：通用要求》

YY 0569 《II 级生物安全柜》

WS 233 《病原微生物实验室生物安全通用准则》

WS 589 《病原微生物实验室生物安全标识》

WS/T 640 《临床微生物学检验标本的采集和转运》

WS/T 648 《空气消毒机通用卫生要求》

ISO 15190 《医学实验室 安全要求》

ISO 22367 《医学实验室-风险管理在医学实验室的应用》

ISO/TS 20658 《医学实验室-样品采集、运送、接收和处理指南》

CNAS-CL02-A001：2021 《医学实验室质量和能力认可准则的应用要求》

CNAS-GL039：2019 《分子诊断检验程序性能验证指南》

## 3 总则

开展核酸检测的医学实验室，应当满足检测质量和能力要求，同时应满足安全要求。核酸检测质量和能力应基于检测目的和检测程序确定，实验室安全要求应满足相关的标准和法规要求。

样品采集、运送、接收和处理应符合 WS/T 640 《临床微生物学检验标本的采集和转运》和 ISO/TS 20658 《医学实验室-样品采集、运送、接收和处理指南》

等标准要求。

核酸检测和解释应依据相关的标准要求。

安全警示标识满足 WS 589《病原微生物实验室生物安全标识》要求。

实验室安全应遵守 ISO 15190《医学实验室 安全要求》、WS 233《病原微生物实验室生物安全通用准则》、GB 19489《实验室 生物安全通用要求》等标准，以及相关法律法规和主管部门的要求。

#### 4 基于扩增的核酸检测程序

##### 4.1 手工核酸提取纯化及检测方法

###### 4.1.1 工作流程

核酸检测过程分为检验前、检验中和检验后（具体内容见表 1），包括样本采集、转运和接收、核酸提取、PCR 扩增、报告解读及医疗垃圾处理等过程。

表 1 检验过程

检测过程	内容
检验前过程	检测项目的申请，知情同意的签署，样本的采集、运输、接收和保存、耗材的验收等
检验中过程	检测过程中的核酸提取质量控制、核酸扩增、室内质量控制，室间质量评价，检验过程的标准操作程序及实验记录等
检验后过程	包括报告的解释及发放，数据的处理及保存，检验后样本和材料的保存、处理及销毁等

4.1.1.1 送检申请、样本采集、样本运输、样本接收等检验前过程应符合 GB/T 22576.1-2018 中 5.4 要求；

4.1.1.2 核酸提取、PCR 扩增等检验中过程应符合 GB/T 22576.1 中 5.5、5.6 要求；

4.1.1.3 报告的解释及发放，数据的处理及保存等检验后过程应符合 GB/T 22576.1 中 5.7、5.8、5.9 要求。

###### 4.1.2 设施设备与环境

###### 4.1.2.1 设施设备

###### a) 检测设备

工作区域检测仪器设备配置标准、设施与环境参数的设置应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》。

#### b) 安全设施设备

适用时,实验室应考虑配备的安全设备主要包括生物安全柜、样本灭活设备、高压灭菌器、紫外线消毒灯和空气消毒机等。

##### 1) 生物安全柜

实验室应根据操作样本的生物安全风险等级选择合适的生物安全柜。生物安全柜的选择和安装要求应符合 YY 0569《II级生物安全柜》的要求。

生物安全柜的安装位置应避开门口、人员走动区域、空调风口、排风口等易受气流干扰区域,安装、维护等应遵循制造商说明书并由具备资格的专业技术人员进行。

##### 2) 样本灭活设备

需要时,应在进行核酸检测前对样本进行灭活处理。常用的样本热灭活设备有水浴锅、鼓风干燥箱、灭活仪等。实验室应定期对样本灭活设备温度参数进行校准。已使用化学剂可靠灭活的样本无需进行热灭活处理。

##### 3) 高压灭菌器

每次灭菌时均应对灭菌效果进行监测。应对高压灭菌器进行定期检查和维修,确保灭菌压力、温度、时间等参数正常,以及压力管道、压力表、安全阀等装置满足安全要求。

##### 4) 紫外线消毒灯

应保持紫外线灯表面清洁,避免灯管表面有灰尘、油污等影响辐照效果,并定期监测紫外线灯的辐照强度。空气消毒可使用悬吊式紫外线灯。物体表面消毒可使用移动紫外消毒装置。

##### 5) 空气消毒机

使用空气消毒机时应考虑实验室布局、温度、湿度对灭菌效果的影响,按照制造商建议的环境条件和工作程序进行使用。消毒结束后应使空间消毒剂浓度降低到安全水平,应符合 WS/T 648《空气消毒机通用卫生要求》的要求。

#### 4.1.2.2 环境要求

实验室(包括移动或方舱型实验室)应符合相应防护级别的生物安全实验室

的设计和建造要求，应满足检测质量的要求并保证人员以及周围环境的安全。

a) 保障检测质量的要求

1) 温湿度、洁净度等环境参数的控制范围应根据使用仪器、试剂的厂家说明书要求进行设置，并监测和记录相关的环境参数；

2) 在寒冷或高温地区，保证室内温度符合检测要求。

b) 保障人员和环境安全的要求

适用时，实验室应满足 GB 19489《实验室生物安全通用要求》、WS 233《病原微生物实验室生物安全通用准则》以及 ISO 15190《医学实验室 安全要求》的要求。

#### 4.1.2.3 设施设备和环境检查

实验室应根据风险评估结果制定设施设备和环境检查计划，应重点关注以下内容：

a) 设专门运维人员，按照设施设备的使用说明进行保养与维护，并制定巡检计划，检查并记录；

b) 设施设备的日常使用应明确使用风险、资质和防护要求；

c) 适用时，监测通风空调系统故障报警信号，保证风机正常运行；监测送、排风系统的各级空气过滤器的压差报警，及时更换堵塞的空气过滤器，保证送排风的风量、气流方向和换气次数，以及保证温湿度范围符合要求；

d) 应定期采集实验室环境样本检测环境污染情况，如采集桌面、移液器、仪器、气溶胶（样本保存液放置采样位置超过 8 小时）样本等，按照实验流程进行核酸检测。如检测结果为阳性（重复采样）应结合近期实验结果阳性率进行综合分析，如存在污染风险应按照实验室去污染流程进行清洁后重新采样评估。

### 4.1.3 质量控制关键点

#### 4.1.3.1 性能验证

检测系统宜参考 CNAS-GL039: 2019《分子诊断检验程序性能验证指南》进行性能验证。

a) 定量检测方法：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。

b) 定性检测方法：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。

#### 4.1.3.2 检验前质量控制

样品采集、运送、接收和处理应符合 WS/T 640《临床微生物学检验标本的采集和转运》、ISO/TS 20658《医学实验室-样品采集、运送、接收和处理指南》等相关临床标准，高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输时，应当严格按照《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》管理。容器或包装材料应当达到国际民航组织《危险物品航空安全运输技术细则》规定的包装标准要求。此外，样本的运输条件还应符合核酸提取试剂盒及检测试剂盒说明书要求，特殊样本如 2019 冠状病毒相关样本，其运输过程还应符合国家相关指南要求。

采样管中的抗凝剂、细胞保存液、灭活试剂等应符合核酸提取试剂盒及检测试剂盒说明书要求，不应含有已知干扰检测的组分。

#### 4.1.3.3 检测中质量控制

核酸提取应使用检测试剂盒配套或推荐的核酸提取试剂，并确保提取效率满足要求。核酸提取效率评价可包括：核酸浓度、纯度及完整性。

每一批次检测样本，可设置 1 个弱阳性质控和/或不同水平阳性质控和 3 个阴性质控，所有质控物应与临床样本同步处理，参与提取过程。阴性质控可包括检测环境污染的样本，如打开管盖放置在检测区域的生理盐水样本等。质控物的组分应不包含干扰检测的成分。

应特别注意阳性质控物的污染问题，应对大批量、全自动核酸检测过程中阳性质控物对设备和环境等的污染风险进行评估，并采取适宜的措施，包括合理设置阳性质控物。

#### 4.1.3.4 检测后质量控制

阴性质控样本检测结果应均为阴性。对于定性项目，阳性质控样本检测结果应为阳性，可记录 Ct 值等检测数值。对于定量项目，阳性质控样本检测结果的定量值，应符合实验室及说明书要求的质控标准。对于阴阳性质控样本检测结果不符合的，应进行分析并采取纠正预防措施。

含有内标的检测系统，内标检测情况应符合检测试剂盒说明书要求。对于内



标检测情况不符合要求的样本，可进行个别样本复查。

#### 4.1.4 安全管理

实验室的管理应符合 GB 19781《医学实验室 安全要求》、GB 19489《实验室 生物安全通用要求》、ISO 22367《医学实验室-风险管理在医学实验室的应用》等标准，以及相应法规的要求。

针对核酸检测相关的操作，应基于风险管理的原则制定对实验操作过程中的人、物、操作、环境管理和生物安全及安保的管理要求和措施。

##### 4.1.4.1 实验人员

核酸检测从业人员应具有相应的安全意识和技术能力，熟悉国家法律、法规、部门规章和标准，有相关的工作经历。主要包括以下环节：

a) 人员选择。要对选择人员的背景、健康监护、培训和能力等要素进行综合评估，其中对工作人员的能力和安全意识的评估至关重要；

b) 人员培训。做好实验人员的岗前培训、在岗持续培训以及定期或不定期的外部培训；培训的内容包括实验室管理体系培训、安全知识和技能培训、实验室设施设备和个体防护装备的安全使用、应急措施和现场救治、心理健康和风险认知能力的培训等，通过培训提高个人的防护意识，保持健康的心态，养成良好的操作习惯；

c) 人员考核。根据核酸检测实验的特点，制定书面和技能操作考核要求，包括对培训效果和心理健康进行评估，评估合格后才能从事实验工作。

应禁止非授权人员进入实验室，对病原等危险因子应有安防措施。

##### 4.1.4.2 样品和实验材料

在核酸检测的操作过程中，各个环节可能操作的样本和使用的工具、材料存在的生物安全风险也不完全一致，如操作步骤（离心、研磨、振荡、匀浆、超声破碎、冷冻干燥）等、器具（如：玻璃器皿、剪刀、针头、移液器等）的使用等等，需要实验室进行实验活动全流程的梳理并识别出风险点，并采取适宜措施。

###### a) 普通样本

要明确本次接收的样本类型以及是否为含有明确病原体的样品，样本中生物因子的种类（已知的、未知的生物材料）、样本的来源、致病性、传染性、可疑

的传播途径、在环境中的稳定性、感染剂量等。

交接过程中要注意观察包装外观是否有破损，在转移样本，以及前处理环节要注意气溶胶对实验人员的影响；如果不能立即进行检测，则按照要求保管以防误用、被盗。

#### b) 菌毒种

首先要明确菌毒种的来源，以及相关的背景信息、明确保存条件并做好记录；在检查包装完好后，按照要求进行保存并做好清晰标识。

#### c) 实验材料

根据实验室的危险试剂清单梳理核酸检测实验过程中可能使用的试剂，并制定人员被试剂污染的应急措施。

### 4.1.4.3 操作

核酸检测实验活动可能从以下 3 个途径造成实验人员暴露：

#### a) 吸入感染性气溶胶；

- 1) 实验操作中开启存有冻干菌毒株的安瓿瓶；
- 2) 用移液器抽吸菌毒液或细菌病毒的培养液；
- 3) 注射器针头或移液器枪头在使用中脱落，喷出感染性液体；
- 4) 在进行转移采集的体液、血液等液体样品时；
- 5) 实验操作前未按照要求更换工作服。

#### b) 经口食入；

在实验活动区域内饮食，被污染的食品经口进入体内。

#### c) 皮肤、粘膜感染；

因溢洒或喷溅而将病毒培养液或细菌培养液与破损的皮肤、粘膜接触。

### 4.1.4.4 环境管理

生物安全实验室有普通型和加强型（见 WS 233《病原微生物实验室生物安全通用准则》）区分，应在日常巡检、例行检查、定期维保中予以关注。

清场消毒和废弃物处理是环境条件保障的关键控制环节。对可能造成污染的样本进行检测后，操作过程中使用的物品、仪器及产生的废弃物，根据消毒对象和可能的微生物种类应选择经过验证有效的消毒程序和灭菌方法，做好各类物品的消毒或灭菌，并对实验室空气、操作台面和地面进行清场消毒。处理后的废弃

物由专人分类收集、包装、表面消毒、运输到指定地点，按规定程序销毁，严禁随意处理实验室废弃物。

#### 4.1.4.5 生物安保

医学实验室应重点关注对阳性样本的生物安保。一般应考虑（但不限于）以下内容：

- a) 风险材料的存储，包括菌毒株、检测的阳性材料、存储的病死动物尸体或组织等；
- b) 风险材料的丢失；
- c) 风险材料被误用、盗用；
- d) 风险材料在实验室内被未经授权的使用；
- e) 风险材料被人为故意泄露或意外泄露；

## 4.2 全自动核酸提取纯化及检测方法

### 4.2.1 工作流程

本节所述全自动核酸提取纯化及检测方法，是指通过全自动核酸提取纯化设备进行核酸提取后，再通过 PCR 等方法进行检测，不需要或仅需要少量的人工操作的设备，可包括添加样本、核酸转移等功能。本部分重点撰写了全自动核酸提取纯化设备的专用要求，对于核酸检测实验室的通用要求，如样本的采集、转运、接收、生物安全、废弃物处理等，应符合 4.1 部分相应内容。

### 4.2.2 设施设备与环境

#### 4.2.2.1 设施设备

工作区域仪器设备配置参照《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》。本节所述检测设备为与提取步骤相互独立的检测设备，包括 PCR 仪、荧光定量 PCR 仪及其他相关核酸检测分析设备。

#### 4.2.2.2 环境要求

##### a) 保障检测质量的要求

1) 放置区域：全自动核酸提取纯化设备应放置在核酸扩增检验实验室的样本制备区，PCR 仪等检测设备应放置于扩增区等相关区域内，相互独立。实验

室应符合生物安全二级（BSL-2）实验室标准；

2) 通风系统：放置全自动核酸提取纯化设备的样本制备区和放置 PCR 仪等检测设备的区域建议负压，设有空气过滤装置，并相互独立；

3) 设备工作条件：环境温湿度应符合设备要求；实验室承重及实验台承重应符合设备说明书要求；空间应确保维修、紧急关闭电源需要的空间；电源应符合 GB 4793.9《测量、控制和实验室用电气设备的安全要求》。全自动核酸提取纯化设备及核心检测设备应连接不间断电源（UPS）上，并良好接地。电源应留有功率冗余。

b) 保障人员和环境安全的要求

见 4.1 部分相应内容。

### 4.2.3 质量控制关键点

#### 4.2.3.1 校准及移动

全自动核酸提取纯化设备安装后应进行校准，校准内容包括但不限于：设备温控单元（如包括）的温度、设备移动单元（如包括）等的位移精度、设备移液单元（如包括）的移液准确度、设备震荡单元（如包括）的工作情况等。设备安装后，应避免移动，否则应重新进行校准。实验室应建立文件化要求规定校准内容及校准的时间间隔，文件要求应符合设备供应商说明及相关标准规定等。

#### 4.2.3.2 性能验证：

除参考 CNAS-GL039：2019《分子诊断检验程序性能验证指南》，进行性能验证外，还应考虑，

a) 防污染验证：推荐进行防污染验证。可采用棋盘法，即阴性和阳性质控品或样本交叉摆放，样本数量 $\geq 5$ 个，按试剂盒说明书在全自动核酸提取纯化制备提取纯化核酸后进行检测。阴性样本应不出现阳性结果。

b) 信息传输验证：具有信息传输功能的全自动核酸提取纯化设备在使用信息传输功能前，应进行信息传输验证。

c) 提取方法学比对：对于同一检测项目同时采用不同方法进行核酸提取纯化操作的，如同时人工和全自动核酸提取纯化设备、同时使用不同类型的全自动核酸提取纯化设备等，还应进行人工与全自动核酸提取纯化设备间的比对、不同

提取纯化方法之间的比对等。可仅对核酸提取纯化步骤进行比对，也可通过全过程结果比对，间接进行核酸提取纯化方法学之间的比对。

#### 4.2.3.3 检测前质量控制

样本的采集应参考相关临床标准进行。

#### 4.2.3.4 检测中质量控制

同 4.1.3.3，此外，全自动核酸提取纯化设备在使用过程中出现仪器卡顿、错位、移液装置吸头脱落等意外中断情况时，设备上的待测样本应全部重新进行包括添加样本在内的核酸提取纯化操作。

#### 4.2.3.5 检测后质量控制

见 4.1.3.4 部分相应内容。

### 4.2.4 安全管理

参见 4.1 相应部分内容。

此外，全自动核酸提取纯化设备应具有紫外消毒功能或额外配置移动式紫外消毒灯进行近距离直射消毒。应具有屏蔽盖并可以在工作过程中关闭，以防止样本喷溅造成污染风险。

人员对全自动核酸提取纯化设备进行操作过程中，应按照实验室安全要求，至少采用二级防护要求进行防护（涉及新型冠状病毒等高致病性病原微生物样本时，应采用生物安全三级实验室个人防护）。

## 4.3 全自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统

### 4.3.1 工作流程

全自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统的整体检测流程并没有改变，依旧由试剂配制、样本核酸纯化、反应体系构建、PCR 扩增、数据分析等一系列流程构成，仅仅是通过设备的结构设计使各个功能组件组合到了一起、通过自动化控制程序控制各个功能组件的运转、通过网关收集/分析数据并可通过网关将数据上传到 LIS 系统，以实现全程无人工参与的全流程自动化。

### 4.3.2 设施设备与环境

#### 4.3.2.1 设施设备

一体的检测设备可包含不同分工模块，例如：

- a) 样本供应模块：样本的输入与输出；
- b) 转移模块：样本识别；将样本和质控品转移到处理板；
- c) 处理模块：样本纯化，包括裂解、清洗、洗脱；PCR 反应体系构建，即在扩增板中完成试剂、样本的混合，并封膜；
- d) 分析模块：扩增反应及检测；
- e) 库存管理单元：存储试剂、质控品、裂解液、洗脱液、磁珠、洗液等；存储耗材，包括深孔板、扩增板、吸液枪头等；存储废物，包括废液、使用过的吸液枪头、深孔板及扩增板等。

#### 4.3.2.2 环境要求

全自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统常采用全封闭结构设计，仍需要安装在生物安全二级或以上级别实验室使用，并严格执行实验室操作流程。参见 4.1 相应部分内容。

#### 4.3.3 质量控制关键点

全自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统本身应具有严格及完整的质量监控体系，从样本上机后的样本识别、样本质量监测、每一个操作步骤及机械元件的状态到数据计算、结果有效性检查等全过程均在系统自身的质量监控体系的监督之下，用以保障发出的报告的准确性。

除需满足本文 4.2.3（质量控制关键点）内容外，还应考虑：

- a) 标准操作：操作员严格按照厂家操作 SOP 进行实验操作；
- b) 试剂、耗材管理：必须按照厂家要求进行试剂、耗材的存储和有效期的管理。

#### 4.3.4 安全管理

参见 4.1 相应部分内容。

全自动核酸检测一体设备应设置化学消毒或紫外消毒模块。

## 5 基于高通量测序的核酸检测程序

### 5.1 工作流程

高通量测序核酸检测流程如下：

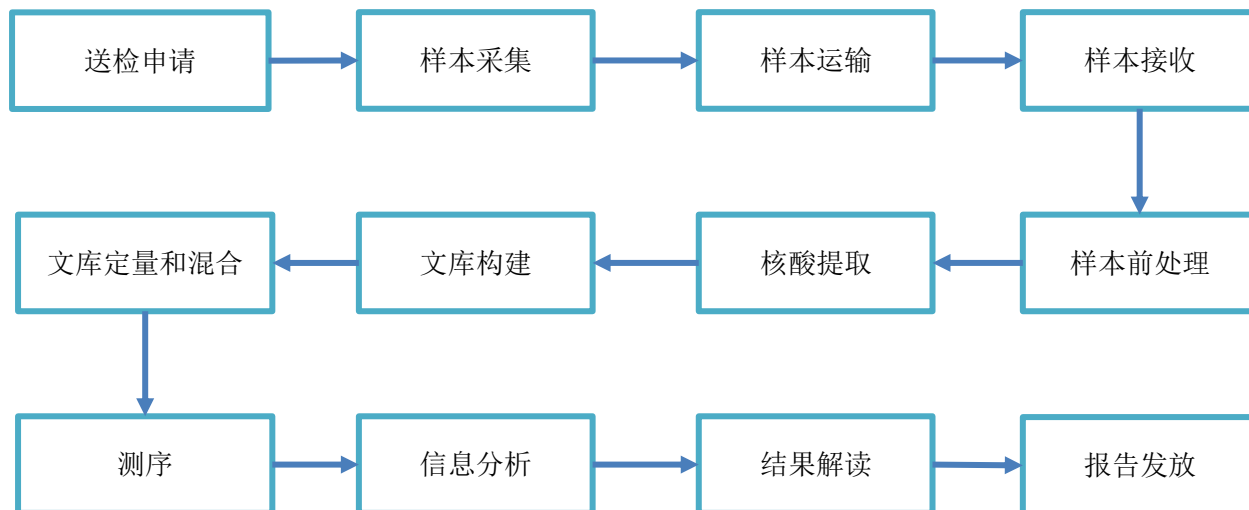


图 1 高通量测序核酸检测流程图

其中检验前、检验中、检验后过程要求应符合 GB/T 22576.1 中 5.4~5.9 要求，高通量测序的核酸检测工作流程中还需注意以下几点：

a) 文库构建：提取后的核酸经过片段化、反转录（如适用）、末端修复、5'端磷酸化、加接头和标签序列、扩增等步骤，构建可用于测序的 DNA 片段，在每个环节根据检测项目的特性进行纯化去除杂质；

b) 文库定量和混合：使用文库浓度检测设备，对所得文库进行 DNA 浓度或片段大小测定，通常文库的混合方案采用等物质的量方式将带有不同标签序列的文库进行混合；

c) 信息分析：使用既定的信息分析流程及相关数据库，对测序数据进行处理及分析的过程。生物信息分析的数据文件格式一般为 FASTA 格式、FASTQ 格式、SAM 格式、BED 格式、VCF 格式等；

d) 结果解读（如适用）：实验室根据不同的检测项目使用特定的数据库，对检测的目的基因、特定突变位点、病原分型鉴定、病原变异和与疾病的关系等进行解析和判定，便于临床医生和受检者理解；

e) 报告发放：由具备相关专业技术职称的授权人员对报告内容进行核对和签发，并以约定的形式发送给送检客户或受检者，如适用，应提供遗传咨询或报

告解读的途径以供受检者咨询。

## 5.2 设施设备与环境

### 5.2.1 设施设备

#### a) 检测设备

工作区域仪器设备配置参照《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》。在高通量测序核酸检测工作中，实验室应根据检测项目需求、仪器性能、仪器参数要求等选择相匹配的仪器型号以满足检测的要求。检测过程使用的主要检测设备如下：

1) 样本前处理：针对不同样本类型选择不同的前处理设备，如离心机、组织细胞匀浆仪、温浴仪等；

2) 核酸提取和文库构建：移液器、离心机、振荡器、磁力架、温浴仪、PCR 仪，核酸片段化设备如打断仪、杂交捕获设备如杂交仪等。实验室可使用自动化核酸提取仪、自动化移液工作站等自动化设备替代手工操作；

3) 核酸浓度检测设备如电泳仪、荧光定量仪、微量分光光度计和荧光分光光度计等；

4) 文库定量和混合：文库浓度检测设备通常有生物分析仪、qPCR 仪、荧光定量仪、等，文库混合设备主要为移液器、离心机，也可使用自动化移液工作站替代手工操作；

5) 测序：基因测序仪、测序仪配套或辅助设备；

b) 高通量测序实验室主要的安全设备包括生物安全柜、样本灭活设备、压力蒸汽灭菌器、紫外线消毒灯和空间灭菌器等。

### 5.2.2 环境要求

高通量测序实验室按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》应满足“各区独立、注意风向、因地制宜、方便工作”原则。高通量测序实验室至少包括试剂准备区、样本与文库制备区、文库扩增与检测区和测序区，在此基础上根据检测项目和检测流程适当增加功能区域，如使用捕获测序法的实验室应增设杂交捕获区，同时开展组织样本核酸提取和游离 DNA 样本核酸提取的实验室应增设多个标本制备区。此外，高通量测序核酸检测实验室可根据运算和存储服务



器大小设置单独的机房区域，用于存放服务器。

a) 保障检测质量的环境要求

1) 高通量测序实验室应监测环境温湿度，不得放置任何可能导致震动的设备，测序区应采取减震措施减少测序仪周围环境中震动的发生；

2) 高通量测序实验室应制定室内质控规则，根据不同检测项目设置不同频次的空白质控（超纯水）。如果空白质控不合格应调查不合格原因并采取纠正和预防措施。实验室还应定期采集实验室环境样本进行环境评价，即采集桌面、移液器、仪器、气溶胶等样本，按照实验流程进行核酸检测。如环境样本核酸检测不合格应按照实验室清洁流程进行清洁后重新采样评估；

3) 高通量测序实验室对网络系统有较高要求，网络类型要求局域网，网络带宽一般不低于 1 G bit/s。实验室应根据检测项目数据量需求配置服务器资源，需考虑 CPU、内存和磁盘存储的要求。

b) 保障人员和环境安全的要求

1) 高通量测序实验室各区空调相互独立，不可连通。对于有负压要求的实验室应设置机械通风系统，且独立于所在建筑的通风系统。对于非负压实验室如果没有通风系统，可采用自然通风，即各区域必须有外通的窗户，可在窗户上安装由室内向室外排出空气的排风扇；

2) 实验室应配置洗眼器和紧急喷淋，用于紧急情况的应急处理；

3) 测序仪芯片或载片仓内的激光器产生的激光存在潜在人体危害，仪器运行时应确保芯片仓门已关闭；

4) 测序仪产生的废液使用废液桶收集，废液中的化学成分对眼睛、皮肤和粘膜有刺激，在废液处理操作过程中，操作者需遵守实验室安全操作规程，并穿戴好个人防护装备。废液应按照医疗废物处置交由具有资质的医疗垃圾处理单位处理；

5) 测序区和服务器机房使用的消防灭火系统，应避免水、泡沫、干粉等类型消防装备对测序仪等精密贵重仪器造成损害。

## 5.3 质量控制关键点

### 5.3.1 性能验证

实验室使用经药品监督管理局批准的试剂盒在用于临床检测前,应对检测系统进行性能验证。性能验证内容参考 CNAS-GL039: 2019《分子诊断检验程序性能验证指南》。

### 5.3.2 检验前质量控制

#### 5.3.2.1 临床咨询

临床医师应结合受检者的临床症状、检测目的等方面提供有针对性的基因检测策略,并说明检测策略的检测预期用途、检测范围、优势、局限性及检测周期等。

#### 5.3.2.2 检测项目申请单及知情同意的填写

临床医师在完成充分的临床咨询后,由受检者自愿决定是否进行检测,并填写检测项目申请单,临床医师指导受检者充分了解并签署知情同意书。

#### 5.3.2.3 样本采集

##### a) 采样类型和采样量的要求

高通量测序核酸检测项目的采样类型和样本采集量,应由 DNA 起始量的要求、建库的方法,测序所需要的最低文库量,最低检测限等多个因素决定。检测项目投入临床使用前,应明确规定检测项目采集的样本类型、样本量,有明确的接收及拒收样本的标准。高致病性病原微生物样本,应根据相关法规要求,结合流调信息和病例传播链关系,确定优先采集的病例。

##### b) 样本采集、运输、接收与保存要求

样本采集前应明确所需采集的样本类型,承装容器,承装的容器使用的防腐剂或抗凝剂应避免影响核酸检测,并对运输及保存温度、保存时间、细胞的保存稳定性等性能指标进行验证。同时见 4.1.3.2 的相关内容。

### 5.3.3 检验中质量控制

#### 5.3.3.1 核酸提取

不同类型的样本,对核酸提取的质量和不一样,一般通过检测核酸浓度、核酸纯度及核酸的片段分布来评价核酸提取的质量。

#### 5.3.3.2 文库构建

一般通过文库浓度及文库片段分布范围来评估文库的质量。不同的测序平台,不同的检测项目,在文库构建使用的接头及标签序列不同,文库的浓度及片段分

布也会不同。

#### 5.3.3.3 文库定量和混合

高通量测序核酸检测项目可通过加入与文库基质相同或相似的质控样品评估文库浓度检测过程的稳定性。使用荧光定量的方法时，实验室应按照既定规则制作标准曲线及其判断标准，保证定量准确性。必要时，实验室可通过质控规则（如 Westgard 质控规则）来监控文库定量准确性。

文库混合一般采用等物质的量的方式对不同标签序列的文库进行混合，实验室应制定混合后文库浓度的合格标准。

#### 5.3.3.4 测序

高通量测序应根据测序平台及检测项目确定上机策略，并建立测序质量指标及标准，通常包括测序类型、测序读长、测序深度、Q20、Q30、total reads、total bases 等指标。

#### 5.3.3.5 信息分析

实验室应建立生物信息分析流程的质量控制标准，包括 reads 质量、GC 含量、比对率、reads 比对质量、最低测序深度、最小突变频率、链偏倚等。生信分析流程应有唯一的版本标识，一旦分析流程发生变更，应重新进行性能确认。

#### 5.3.3.6 结果解读

实验室应依据国际权威的参考指南，建立结果解读的标准和报告的原则。解读前应对质控数据进行核查，结合受检者的临床信息、临床症状、临床诊断等信息，判定报告的病原体、基因突变等结果。对于低置信变异、高致病性病原微生物检出等应进行变异或检出序列验证。结果解读相关的数据库应定期更新，确保数据及时有效。实验室应定期对同一疾病系统或类型的案例进行回顾性分析，当阳性率发生显著波动时，需及时排查原因并采取纠正预防措施。

#### 5.3.3.7 设备管理

高通量测序核酸检测实验室设备的通用管理要求应符合 CNAS-CL02-A001:2021《医学实验室质量和能力认可准则的应用要求》5.3.1 设备。基因测序仪安装调试后，由生产商进行安装确认、运行确认、性能确认，实验室根据检测项目情况对新启用的测序仪进行性能验证。此外，基因测序仪在移动、关键部件更换后均应重新进行性能验证。测序仪日常使用应对测序仪软件模

块（用户 UI 启动检查）、电脑模块（硬盘空间）、电源模块（电源虚接）、流体模块（密封圈、负压、注射器、芯片过液等）、冰箱温度、试剂针等进行检查，在使用前和使用后进行仪器清洗。每年定期对测序仪进行预防性维护保养，包括仪器深度清洁、温控系统、流体和真空系统、自动化系统、光学组件、激光组件等的检查和性能测试。

#### 5.3.3.8 人员管理

从事高通量测序核酸检测人员须按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行管理，经省级以上卫生行政部门指定机构技术培训考核合格后，方能从事临床基因扩增检验工作。

#### 5.3.3.9 室内质量控制与室间质评

高通量测序核酸检测应设置监控全流程的室内质控品。每个检测批次均应设置阳性质控品、阴性质控品、空白质控品，以监控检测过程质量。

高通量测序核酸检测实验室开展的检测项目，每年应参加省级以上临床检验中心组织的能力验证或室间质评计划。

#### 5.3.4 检验后质量控制

检验后环节主要包括报告的解释及发放，数据及报告的保存及样本的保存。

报告在发放前应由具备相关专业技术职称的授权人员核对无误后方可签发。实验室使用信息系统进行报告发放的，应定期验证信息系统传输一致性。系统权限应进行分级控制。

实验室应建立高通量测序数据保存类型和保存期限相关要求，一般保存 FASTQ 文件、BAM 文件和 VCF 文件，并保留双备份。数据保存应符合 CNAS-CL02-A001:2021《医学实验室质量和能力认可准则的应用要求》4.13 记录控制。高通量测序数据涉及受检者隐私，未经授权不得公开。

应根据相关法律、法规、部门规章、技术指南的要求，以及样本类型、待测成分、样本量、复检流程等，制定样本保存期限，并按照样本可稳定存储的条件进行保存。超过保存期限的样本，按照医疗废物进行处理。

## 5.4 安全管理

参见 4.1 相应部分内容。

## 附录 A（资料性附录）实验室功能区核酸检测采样方案

### A.1 采样方法

物体表面取样时用蘸取灭菌的生理盐水/PBS 缓冲液的植绒拭子在采样区域内画交叉线（如图 A.1），尽量让植绒拭子每个面都接触到采样目标，一个采样点使用一个植绒拭子，采样完后把手持部分折断丢弃，植绒拭子部分装入含有对应待监测病原保存液的采样管，确保拭子浸泡在液面下，塞紧离心管盖子并记录采样信息。

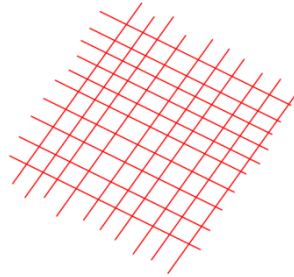


图 A.1 采样区域内交叉线采样法

### A.2 采样区域及编号

根据不同采样区域和采样点及要求进行采样，每个采样点单独一个植绒拭子，按照表 A.1 中要求放置到含有采样液的采样管中并标注采样编号，如采样编号为管 1 中应放置的是把手、传递窗、台面单独采样的 3 个植绒拭子。

表 A.1 不同采样区域和采样点

采样区域	采样编号	采样点及要求
样品处理室	管 1	把手、传递窗、台面
	管 2	组织研磨仪、离心机、生物安全柜
	管 3	留样冰箱、临时存放样品冰箱
	管 4	气溶胶【外部环境】、气溶胶【生物安全柜内】
	管 5	移液器
血清检测室	管 6	地面、把手、台面、移液器
	管 7	恒温培养箱、振荡器、洗板机、酶标仪内部、生物安全柜
体系配置室	管 8	把手、仪器、台面、离心机
	管 9	气溶胶【外部环境】、气溶胶【生物安全柜内】
	管 10	移液器、超净工作台/生物安全柜
核酸提取室	管 11	把手、台面、离心机、核酸提取仪
	管 12	气溶胶【外部环境】、气溶胶【生物安全柜内】
	管 13	移液器、生物安全柜
核酸扩增室	管 14	把手、台面、荧光 PCR 仪
	管 15	气溶胶
危废处理室	管 16	地面、把手、台面

【地面】实验区域内人员流动踩踏频率高的地面位置，如实验区域或办公区域凳子下脚自然放置的地面位置、实验过程中实验员停滞站立的地面位置、进出开关门停滞站立的地面位置，画交叉线涂擦采 1 个样品。

【把手】门把手、冰箱冰柜把手、传递窗以及其他设施设备把手，涂擦采 1 个样品。

【台面】操作台面、桌面、仪器承重面如冰柜面，画交叉线涂擦采 1 个样品。

【仪器】各区域内仪器设备的按键开关或者内部存在污染风险的地方采 1 个样品。

【气溶胶】分为生物安全柜内部及柜外环境，取 1.5ml 离心管加入 1ml 生理盐水开盖放置过夜，至少 12 小时。

【移液器】各区域内常用移液器的外表面及内部采 1 个样品。

### A.3 采样注意事项

- 1.应使用灭菌耗材或者是一次性无菌无酶的耗材；
2. 采样人员应严格按照操作规程采样，避免因采样造成核酸交叉污染；
3. 样品若不能及时检测，应放置于冷冻室保存，并做好详细标记。