

《血站技术操作规程》2012

第4部分 血液检测



学习内容

- 2012版技术规程血液检测部分概要
- 2012版技术规程血液检测部分内容介绍
 - 第4部分 血液检测
 - 附录B 血液检测方法的确认
 - 附录D 血液检测室内质控方法
 - 附录E 微板法ABO血型定型试验



规程第4部分 血液检测

- **1 可经输血传播感染的检测项目及检测方法**

检测项目及
方法

- **2 血液检测试剂**

- **3 仪器设备使用要求**

- **4 实验室信息管理系统**

资源管理的
细化要求

- **5 血液检测标本**

- **6 试验操作**

- **7 试验性能监控**

- **8 试验结果的判定**

- **9 ELISA初次试验有反应性标本的重复试验**

- **10 核酸初次试验有反应性的进一步处理**

- **11 血型检测**

- **12 血液检测最终结论的判定**

- **13 血液检测结论的报告和利用**

过程控制的
细化要求



资料性附录

- 附录**B** 血液检测方法的确认
- 附录**D** 血液检测室内质控方法
- 附录**E** 微板法**ABO**血型定型试验



新版技术规程血液检测部分 参考标准

- 《血站管理办法》 2006
- 《血站质量管理规范》 2006
- 《血站实验室质量管理规范》 2006
- WHO捐献血液中输血传播传染病的筛查建议（2009）
- WHO采供血机构GMP指南（2011）



97版 规程框架和内容的不适宜性

- 《中国输血技术操作规程—血站部分》**97版**血液检测部分
 - 化验操作要求
 - 乙型肝炎表面抗原酶联免疫法检测
 - 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测
 - 艾滋病病毒 I / II 抗体酶联免疫法检测
 - 梅毒抗体检测：USR/RPR/TRUST/TPHA
 - ALT检测：快速法、比色法、速率法
 - ABO血型鉴定（纸板法和磁板法）



97版 规程 检测方法的滞后性

- **97版**检测方法描述以手工操作为基础，没有全自动操作的质量要求；
- **HBsAg 1ng**的检测灵敏度已不适用；
- 抗-**HIV**为第二代检测方法要求，现在是第四代方法；
- 梅毒抗体检测方法为非特异性检测方法，而不是目前采用的**EIA**双抗原夹心法；
- **ABO**血型检测方法定义为玻片法，没有涵盖适用于全自动血型分析的微板法。
- 不包括**NAT**要求



97版规程与其它新版GB的不协调性

- **97版规程与新GB18467不能相互补充**
 - **GB18467 2011《献血者健康检查要求》**是针对献血者献血前的业务行为要求。
 - **8 献血前血液检测**
 - **8.1血型检测：ABO血型（正定型）。**
 - **8.2血红蛋白（Hb）测定：男 $\geq 120\text{g/L}$ ；女 $\geq 115\text{g/L}$ 。如采用硫酸铜法：男 ≥ 1.0520 ，女 ≥ 1.0510 。**
 - **8.3单采血小板献血者：除满足8.2外，还应同时满足：**
 - **a)红细胞比容（HCT）： ≥ 0.36**
 - **b)采前血小板计数（PLT）： $\geq 150 \times 10^9/\text{L}$ 且 $< 450 \times 10^9/\text{L}$**
 - **c)预测采后血小板数（PLT）： $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$ 。**
 - 以上不包含血液检测程序



97版规程与其它新版GB的不协调性

- **97版规程与新GB18469的要求不相适应**
 - **GB18469 2011** 《全血成分学质量要求》血液安全性检测要求
 - 血型检测
 - **ABO**血型定型试验结果正确。
 - **RhD**血型定型试验结果正确。
 - 人免疫缺陷病毒（**HIV-1**和**HIV-2**）标志物筛查试验结果阴性：
 - **HIVAb(1+2)**
 - **HIVAg/Ab**
 - **HIV RNA**



97版 规程与其它新版GB的不协调性

GB18469 2011 《全血成分学质量要求》血液安全性检测要求

- 乙型肝炎病毒（**HBV**）标志物筛查试验结果阴性
 - **HBsAg**
 - **HBV DNA**
- 丙型肝炎(**HCV**)病毒标志物筛查试验结果阴性
 - **HCV Ab/Ag**
 - **HCV RNA**
- 丙氨酸氨基转移酶检测合格，
 - 速率法（**无酮体酚法**）
- 梅毒螺旋体标志物筛查试验结果阴性，
 - **ELISA**（**无非特异方法**）



新版规程血液检测部分突出变化

- 血液检测部分与献血前献血者快速检测部分分开。血液检测部分仅针对采集后的全血和成分血检测过程提出管理和技术要求。
- 血液检测部分包含了检测前、中、后的过程控制要求。
 - 明确了标本采集、保存、运输、交接等环节的控制要求；
 - 明确了输血相关感染检测的方法和程序；
 - 增加**HIV**抗原检测选择；
 - 增加**HCV**抗原检测选择；
 - 增加**NAT**检测程序；
 - 增加血型自动化检测方法选择要求
 - 删除**TP**非特异性试验方法；
 - 删除**ALT**快速法
- 将资源管理，如设备、试剂、**LIS**的部分管理要求细化，纳入规程。



学习内容

- 2012版技术规程血液检测部分概要
- 2012版技术规程血液检测部分内容介绍
 - 第4部分 血液检测
 - 附录B 血液检测方法的确认
 - 附录D 血液检测室内质控方法
 - 附录E 微板法ABO血型定型试验



4.1 可经输血传播感染的检测项目及检测方法

- 4.1.1 人类免疫缺陷病毒（HIV）感染标志物及其检测方法有2种选择，可任选其中1种：
 - HIVAb(1+2)+HIVAg/Ab; HIVAb(1+2)1+HIVAb(1+2)2;
HIVAg/Ab1+HIVAg/Ab2
 - HIVAb(1+2)或HIVAg/Ab+HIV RNA
- 4.1.2 乙型肝炎病毒（HBV）感染标志物及其检测方法有2种选择，可任选其中1种：
 - HBsAg1+ HBsAg2
 - HBsAg+HBV DNA



可经输血传播感染的检测项目及检测方法

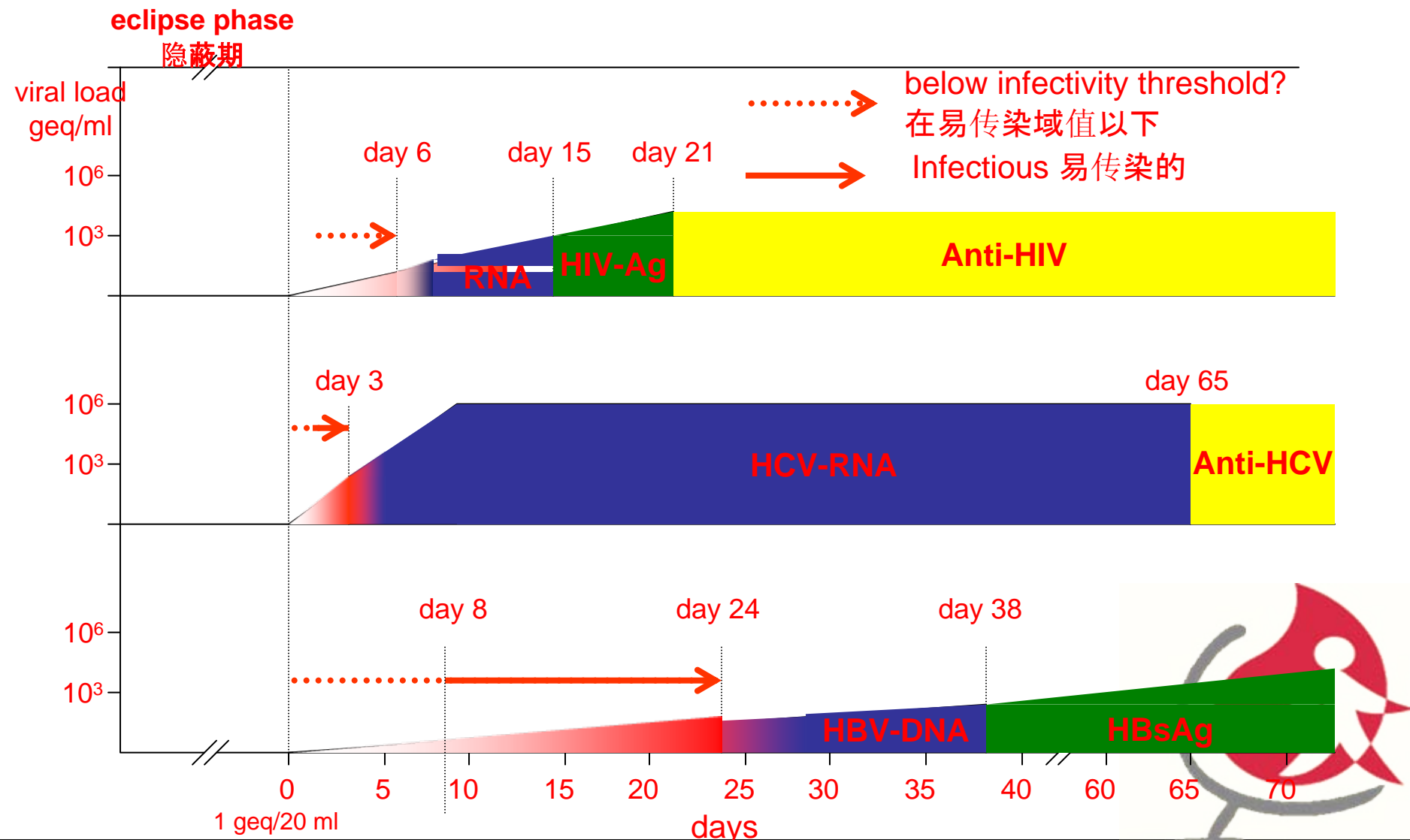
- 4.1.3 丙型肝炎病毒（HCV）感染标志物及其检测方法有2种选择，可任选其中1种：
 - HCVAbs+HCVAg/Ab; HCVAbs1+HCVAbs2;
HCVAg/Ab1+HCVAg/Ab2
 - HCVAbs或HCVAg/Ab+**HCV RNA**
- 4.1.4 ALT采用2种方法（干化学法和速率法）进行2次检测，分别在采血前和采血后进行。
 - 采血前可用速率法（见规程**1.9**条款）
- 4.1.5 梅毒螺旋体感染标志物及其检测方法：采用2个不同生产厂家的ELISA试剂检测梅毒特异性抗体。



血液筛查检测中 核酸检测（NAT）与血清学检测联用时 对ELISA检测的要求

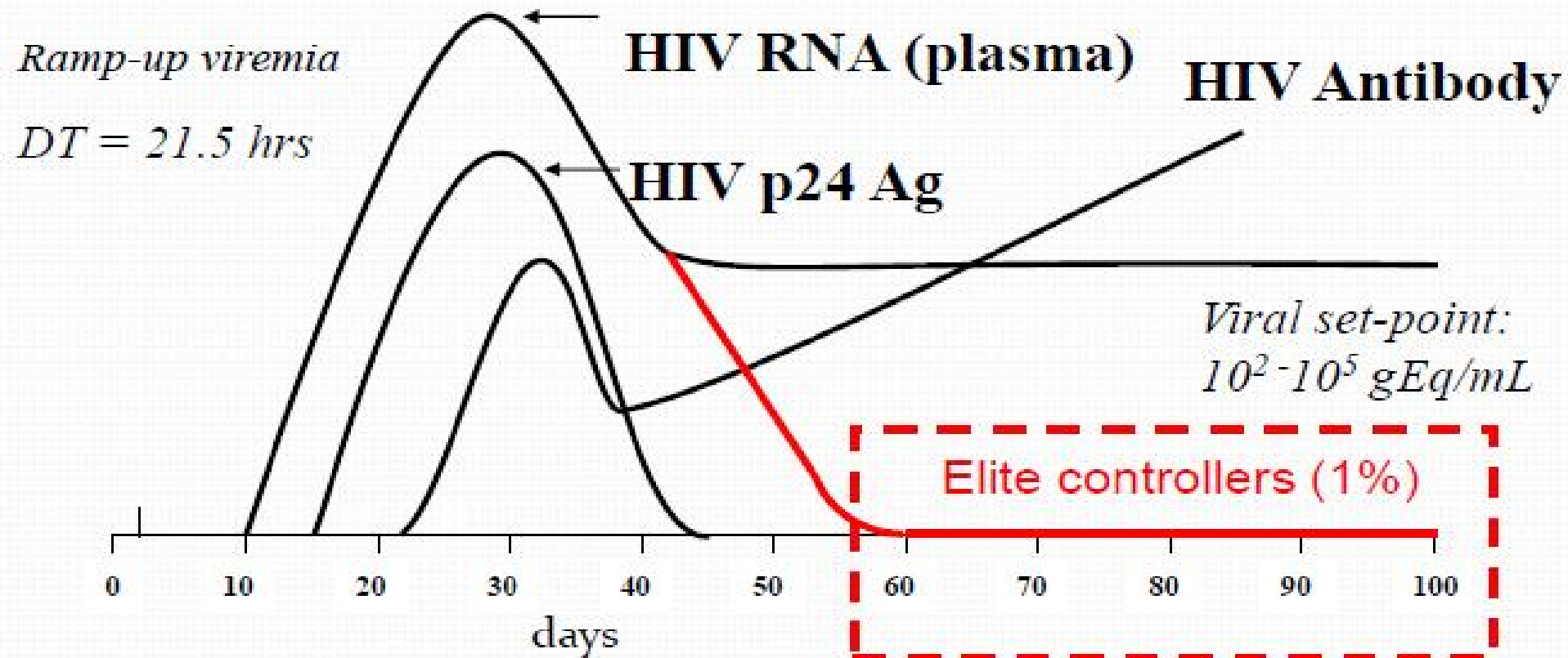


通过NAT检测得到的完整的感染窗口期



HIV 感染 进程

Peak viremia: 10^6 - 10^8 gEq/mL



献血者 HIV 筛查后 HIV 核酸检测与免疫印迹结果的相关性

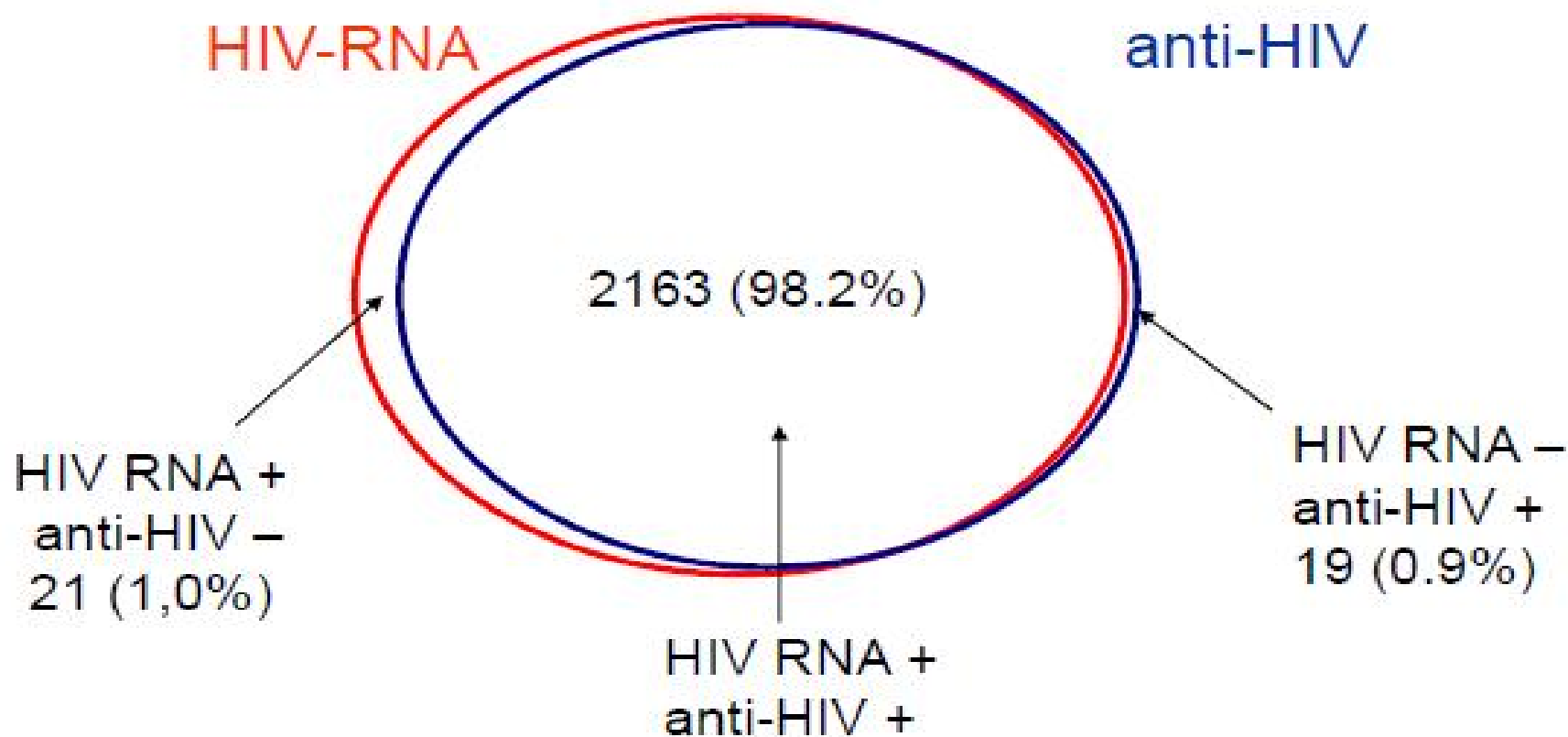
免疫印迹(WB) 结果

核酸结果	阳性	不确定	阴性	合计
dHIV Rx	1025	8	0	1033
NonRx	78	10,920	11,030	22,028
合计	1103	10,928	11,030	23,061

23061例样本中1033例 RNA 阳性 = 4.5%



南非2203例HIV确证阳性献血者结果



感染初期出现的HCV病毒标志物

Anti-HCV EIAs

1st gen 150 d

2nd gen 80 d

3rd gen 70 d

Plateau phase viremia: 10^5 - 10^8 gEq/mL

平台期病毒血症

Ramp-up phase 上升期

DT 检出时间 = 17.7 hrs

HCV RNA

- HCV Ag EIA

- HCV MP-NAT

- HCV ID-NAT

Viral set-point:

10^2 - 10^7 gEq/mL

病毒调定点

ALT

Pre-ramp-up

上升前期

blip viremia

暂时的病毒血症



献血者HCV筛查后 HCV核酸检测与RIBA检测的相关性

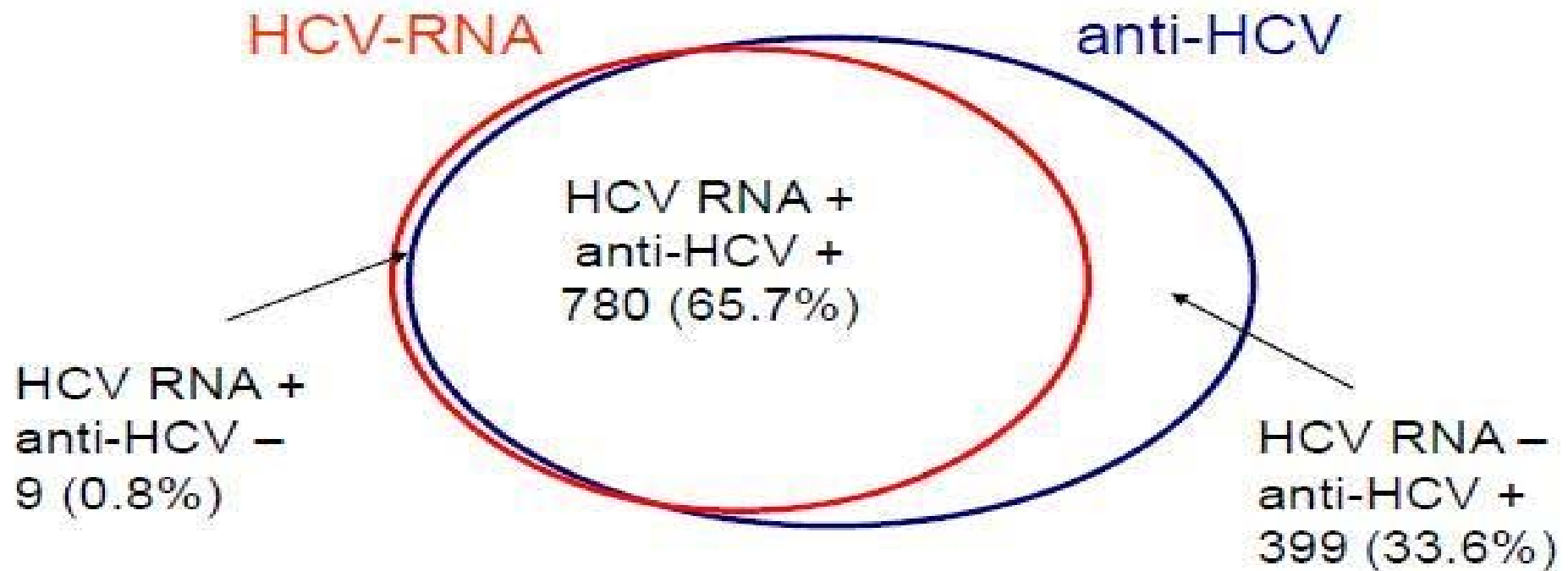
Kleinman et al. Transfusion 46, 2006

NAT 结果	RIBA 结果			
	阳性	不确定	阴性	合计
dHCV Rx	18,385	202	28	18,615
NonRx	4,820	7,856	15,750	28,426
合计	23,205	8,058	15,778	47,041

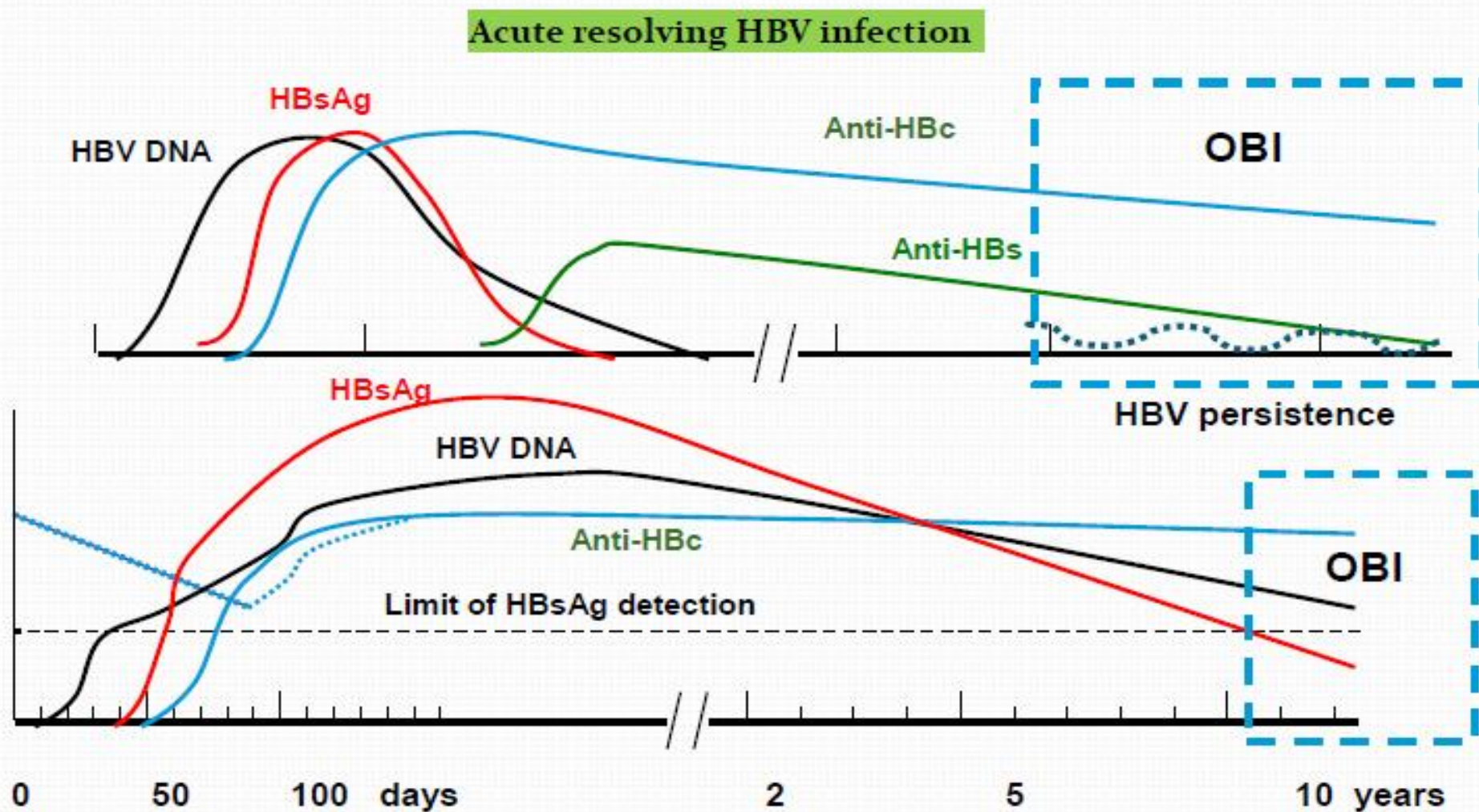
47,041测试样本中18,615例 RNA 阳性 = 39.6%



埃及1188例HCV阳性献血者结果

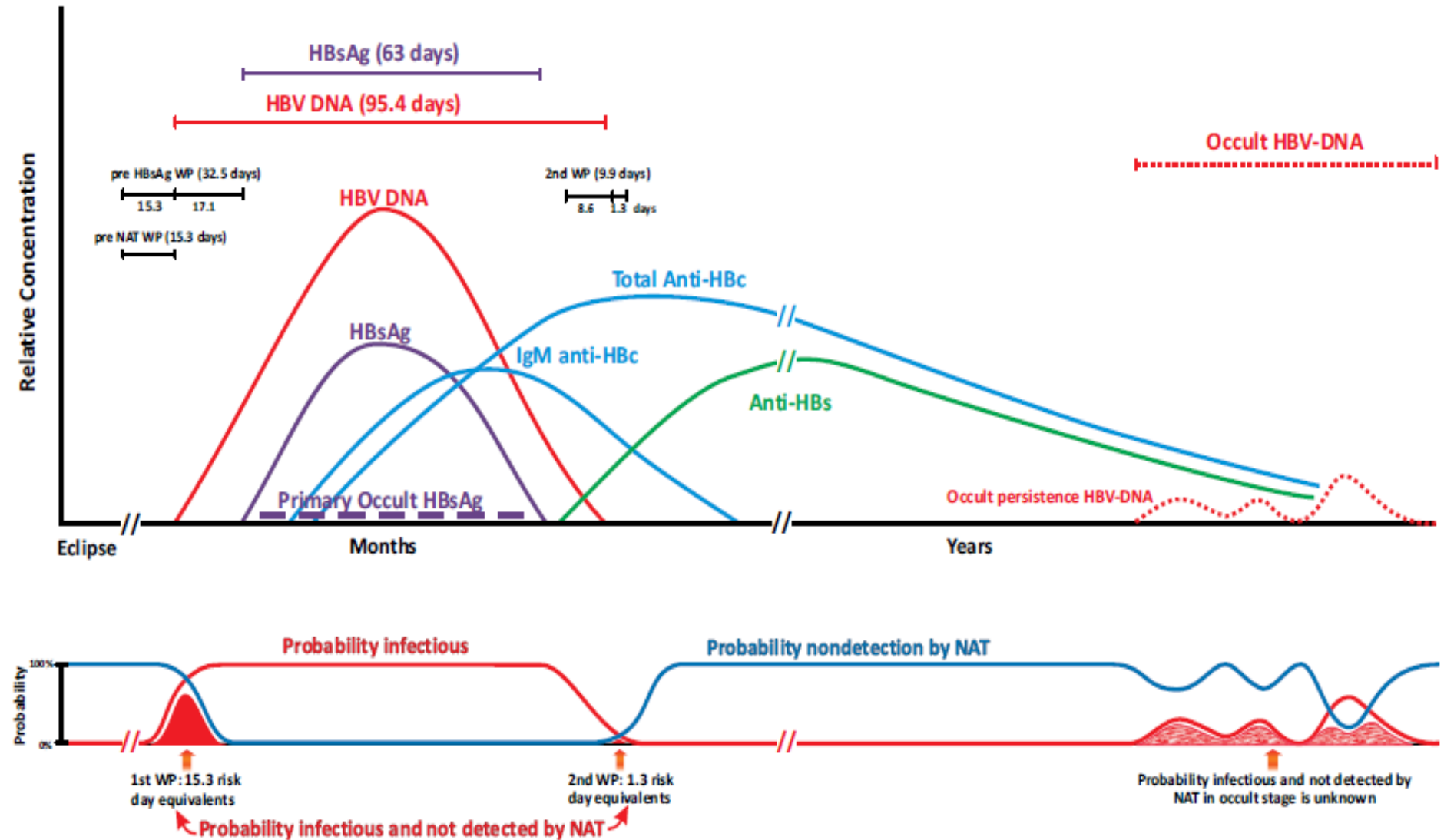


HBV 感染进程

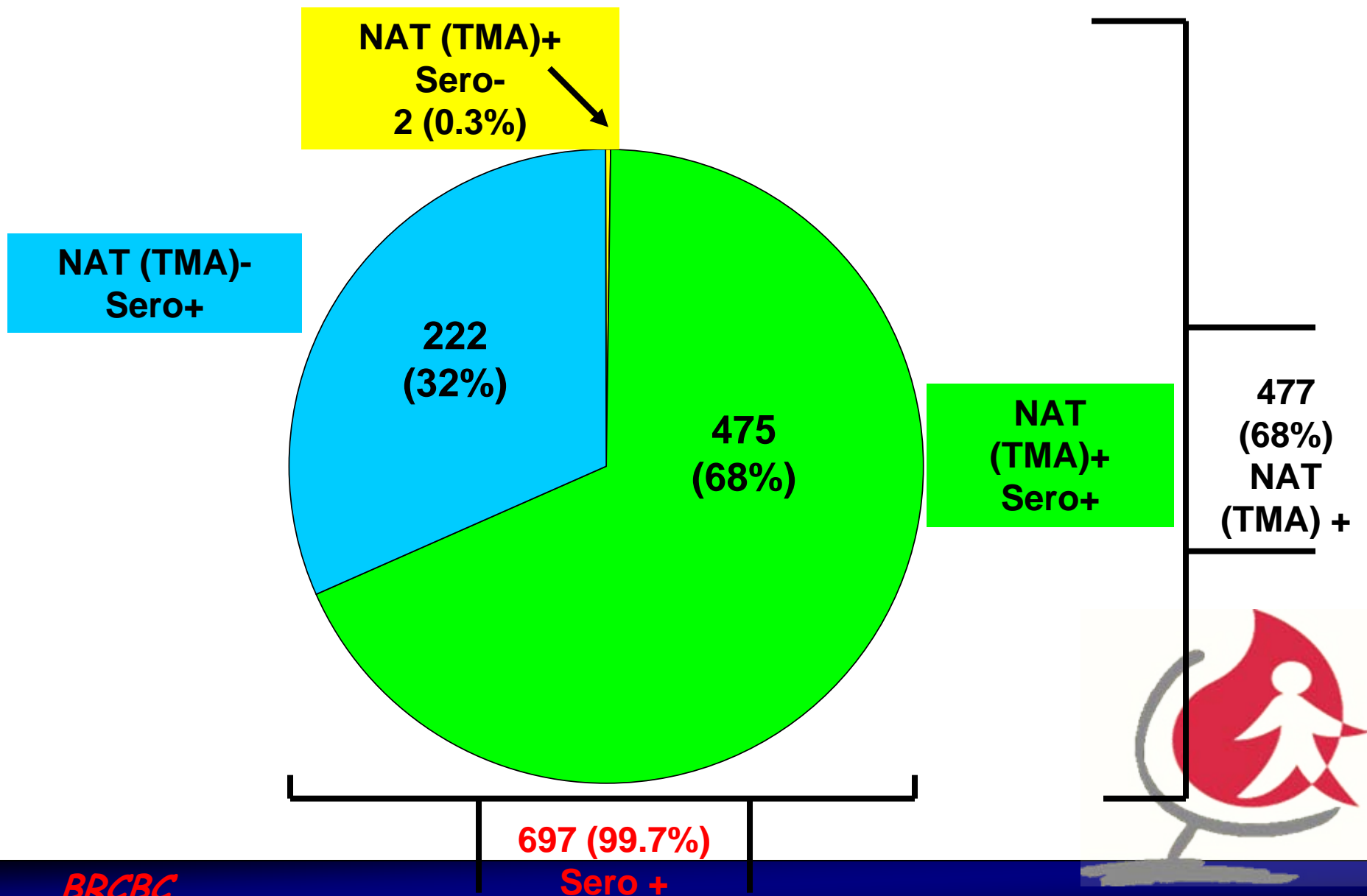


Chronic HBV infection

HBV 感染进程

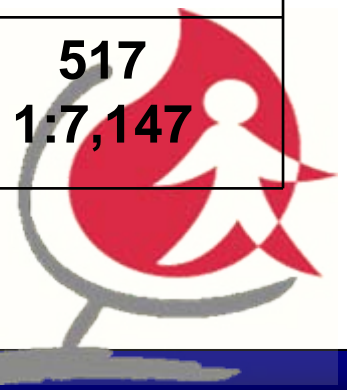


美国699例HBV确认阳性献血者结果



3,694,858 献血者筛查后 经确认核酸检测和血清学阳性样本 (美国红会 2008 “Ultrio” 研究)

确认的结果 (No./频率)	HBV	HIV	HCV
只有 NAT 阳性	9 1:410,540	2 1:1.9 million	15 1:250,000
NAT 和血清学阳性	426 1:8,673	231 1:15,995	1426 1:2,591
只有血清学阳性	178 1:20,758	29 1:127,409	517 1:7,147

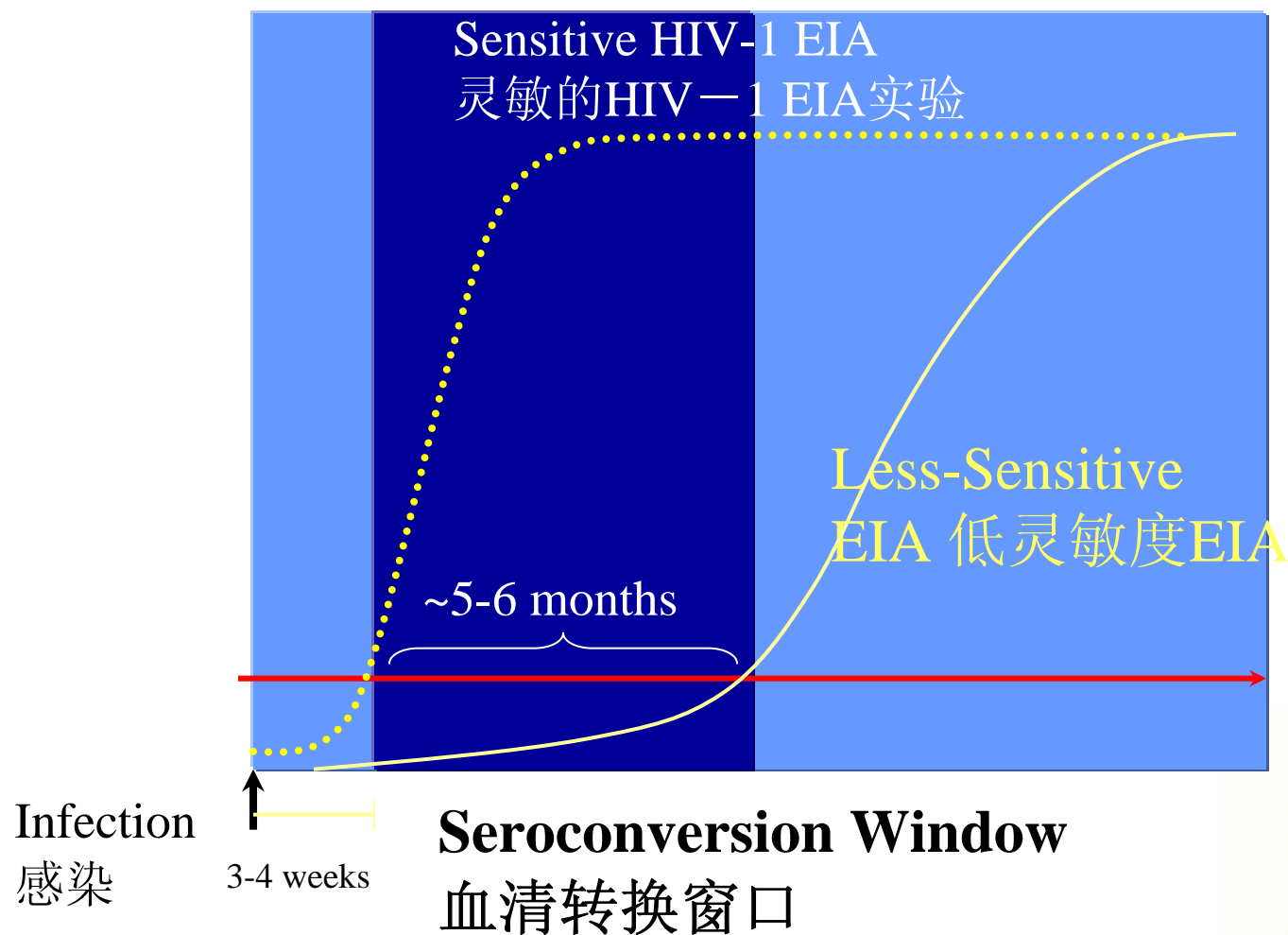


NAT检测技术特点

- 灵敏度高。用于WP标本检出。
- 标本质量控制要求高，否则产生假阴性结果。
 - 采血管：无RNAase
 - 标本保存温度
 - 标本运输温度
- 容易产生污染：尤其是手工操作
 - 来自阳性标本
 - 来自扩增产物
 - 来自试剂污染
- 对实验室设施和环境要求严格
 - 实验室温、湿度控制
 - 实验室布局和气流走向
- 试剂价格昂贵



低灵敏度EIA试验



Jannsen et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. JAMA. 1998 Jul 1;280(1):42-8.



不同EIA性能差异

								Dis+	Dis -
NAT+ and EIA+	774 (0.2HBsAg 2%)		376	EIA ++	332			297	35
				EIA +	44	A	2	0	2
						B	42	36	6

可以得到的结论

- 目前和将来同时需要核酸检测和血清学检测
 - 在病毒载量低、慢性或持续性感染或者具有传染性的献血者，血清学检测具有优势。
 - 在产生血清学反应之前，检测输血相关感染需要使用核酸检测
 - 对于HCV Ag/Ab以及HIV Ag/Ab 检测，窗口期可以降低50% 甚至更多。
- 核酸检测效能 (NAT阳性, 血清学阴性) 因指标不同而不同，但都是血清学检测的有益补充，可用于提高受血者安全以及献血者流行病学研究
- 血清学检测是血液筛查的基本方法，必须首先保证。



WHO 血液筛查建议 (2009)

- 政策建议
 - 应对所有血液做感染及其标志物的强制性筛查：
 - HIV-1和HIV-2：联合检测HIV抗原和抗体，或检测抗-HIV；
 - 乙型肝炎：检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)；
 - 丙型肝炎：联合检测HCV抗原和抗体，或检测抗-HCV；
 - 梅毒(苍白密螺旋体)：检测密螺旋体特异性抗体。
 - 在考虑将核酸检测列入筛查策略之前，应首先保证已经有效建立具有质量保证的血清学筛查技术，并对所有血液实施筛查。



WHO 血液筛查建议

- 引入NAT检测
 - 在感染发生率很低的国家，其效益增加很有限。
 - 在感染发生率高的国家，可被NAT检出的窗口期血液数量可能较多。因此采用NAT可降低输注窗口期血液的风险
- 只有在抗体或抗原检测计划已经得到有效实施，并且具有开展NAT 能够增加效益的确凿证据的情况下，才应考虑引入NAT。



4.2 血液检测试剂

- 4.2.1 试剂选择
- 4.2.2 证照要求
- 4.2.3 进货检查验收
- 4.2.4 隔离存放
- 4.2.5 质量抽检
- 4.2.6 审核批准
- 4.2.7 试剂保存和质量监控



4.2.1 试剂选择

- 应建立血液检测试剂的评价、选择和确认程序
- 血液筛查试验的敏感性和特异性应尽可能高
 - WHO: 最好 $\geq 99.5\%$
- 有条件的实验室可自行开展试剂评价（见附录B）。不具备条件的实验室可充分利用国家专业机构的评价数据。
 - 自己研究
 - 官方数据
 - 临检中心
 - 国家CDC
 - 权威机构: WHO/CAP/NRL



4.2.2 证照要求

- 药品类检测试剂
 - 1) 《药品生产许可证》或者《药品经营许可证》和营业执照复印件；
 - 2) 《药品生产质量管理规范》或者《药品经营质量管理规范》认证证书复印件；
 - 3) 药品的批准证明文件复印件；
 - 4) 供货单位药品销售委托书；
 - 5) 销售人员有效身份证明复印件；
 - 6) 血源筛查试剂的批签发文件；
 - 7) 出厂质量检验报告。



4.2.2 证照要求

- 医疗器械类检测试剂
 - 1) 《医疗器械生产企业许可证》或者《医疗器械经营企业许可证》和营业执照复印件，对生产、经营属于《医疗器械分类目录》中第一类医疗器械的企业，只需索取营业执照复印件；
 - 2) 医疗器械注册证书和《医疗器械注册登记表》复印件；
 - 3) 供货单位医疗器械销售委托书；
 - 4) 销售人员有效身份证明复印件；
 - 5) 出厂质量检验报告。



体外诊断试剂注册管理办法（试行）

2007

- 第三条 本办法所称体外诊断试剂，是指按医疗器械管理的体外诊断试剂，国家法定用于血源筛查的体外诊断试剂、采用放射性核素标记的体外诊断试剂不属于本办法的管理范围。

- 第五条 国家对体外诊断试剂实行分类注册管理。

境内第一类体外诊断试剂由设区的**市级**药品监督管理机构审查，批准后发给医疗器械注册证书。

境内第二类体外诊断试剂由**省、自治区、直辖市**药品监督管理部门审查，批准后发给医疗器械注册证书。

境内第三类体外诊断试剂由**国家**食品药品监督管理局审查，批准后发给医疗器械注册证书。

境外体外诊断试剂由国家食品药品监督管理局审查，批准后发给医疗器械注册证书。



体外诊断试剂注册管理办法（试行） 2007

- 第十二条 根据产品风险程度的高低，体外诊断试剂依次分为第三类、第二类、第一类产品。
 - （一）第三类产品：
 1. 与致病性病原体抗原、抗体以及核酸等检测相关的试剂；
 2. 与血型、组织配型相关的试剂；
 3. 与人类基因检测相关的试剂；

.....
 - （二）第二类产品：除已明确为第三类、第一类的产品，其他为第二类产品，主要包括：
 4. 用于酶类检测的试剂；
 - （三）第一类产品：
 1. 微生物培养基（不用于微生物鉴别和药敏试验）；
 2. 样本处理用产品，如溶血剂、稀释液、染色液等。



4.2.3 进货检查验收

- 1) 验明药品合格证明和其他标识;
- 2) 外观检查（运输包装箱完整无损，**运输冷链**符合要求，试剂包装盒完整无损，无液体泄漏）；
- 3) 到货数量和销售凭证(购货单位、试剂、供货商等名称，规格、批号、数量、价格)



4.2.4 隔离存放

- 隔离存放 应将通过进货检查验收后的试剂进行隔离存放，防止误用。



4.2.5 质量抽检

- 应建立并执行抽检制度，对每次购进（同批或不同批）的试剂进行质量抽检。
- 应将试剂说明书列入文件控制范围。应对试剂说明书版本和内容进行检查。其操作要求如已变更，实验室的试验操作在试剂启用时应同时变更，严格控制未按试剂说明书进行试验操作的情形发生。
- 试剂盒组成、组分性状与说明书一致，无泄漏，足量，标识正确。



4.2.5 质量抽检

- 质量抽检的样本有：
 - 1) 试剂盒对照；
 - 2) 室内质控品；
 - 3) 实验室自制或商品化的血清盘。前2种为必须，后1种为可选。
- 质量抽检结果要求：
 - 1) 试剂盒对照品检测结果符合试剂说明书要求，
 - 2) 室内质控品检测结果符合既定要求；
 - 3) 如果适用，实验室自制或商品化的血清盘符合既定要求。



4.2.6 审核批准

- 应由**授权人**对采购验收和质量抽检的过程和结果进行审核，批准其用于血液检测。
- 应建立和保存试剂采购验收、质量抽检和审核批准的记录（见附录C）。



4.2.7 试剂保存和质量监控

- 应对经批准使用的试剂进行标识和放行，宜对试剂盒粘贴“可用”标签。
- 应按试剂说明书要求的保存条件进行保存，应在有效期内使用。
- 应对试剂的库存（批号、失效期、库存量等）进行管理，防止试剂过期或者中断。
- 在试剂保存和使用过程中应注意试剂性能出现衰减，如果试剂盒对照品和室内质控品的检测值呈现连续走低趋势且无法使其回升纠正，应考虑终止使用。



4.3 仪器设备使用要求

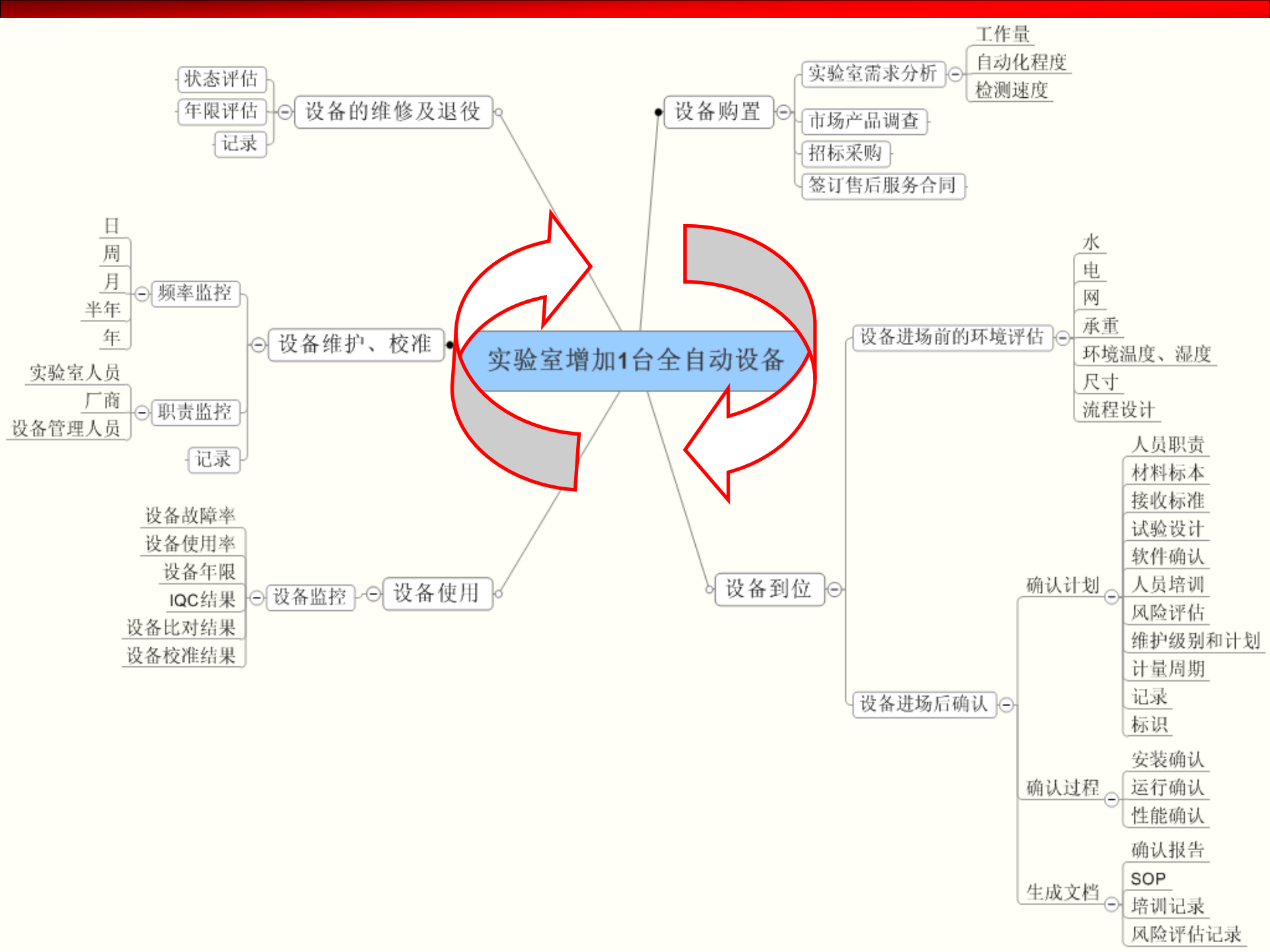
- **4.3.1** 新的或者经过大修的检测设备在正式投入正常使用之前应经过确认。新设备的确认应包括安装确认、运行确认和性能确认。经过大修的設備根据需要进行适当确认，必要时应进行计量检定或校准。
(设备确认)
- **4.3.2** 按照检测设备用户手册要求进行操作，包括使用、校准、维护等工作。(制定SOP)
- **4.3.3** 如果使用多台设备检测同一个项目，应对设备之间的性能和差异进行比较。(设备性能比对)
- **4.3.4** 应定期检查自动化检测设备试验参数的设置，应保存检查记录。
(定期参数核查)
- **4.3.5** 在试验过程中自动化检测设备出现故障需要进行手工操作时，应注意自动化设备操作和手工操作的衔接及其对结果的影响。应记录手工操作步骤和操作人员。(中断应急)



确认活动遵循的原则

- 1. 全方位原则：确认活动涵盖了设备安装、调试运行、性能确认、人员培训及设备监控等方面。
- 2. 全周期原则：自动化设备的确认是一个过程，它涵盖设备的整个生命周期，包括使用前、中、后。
- 3. 可测量原则：设备的性能需要通过可测量指标来证明是否满足要求。
- 4. 风险评估原则





4.4 实验室信息管理系统

- **4.4.1** 应使用实验室信息管理系统对整个检测过程（从标本接收、试验、结果和结论判定）进行信息化管理。（**LIS范围**）
- **4.4.2** 实验室信息管理系统的功能应包括：**1）**标本接收；**2）**试验项目选择；**3）**试验数据记录与汇总；**4）**试验数据的计算；**5）**试验结果的判定；**6）**血液筛查结论的判定；**7）**血液筛查结论传输至血液管理信息系统并为其所利用。（**LIS功能**）
- **4.4.3** 实验室信息管理系统运行参数的设置应建立权限控制。应保存设置参数的书面记录，并定期将其与实际设置参数对照，确保设置无误，应保存核实记录。（**LIS权限及应用程序控制**）



新规程中检测前过程控制要求

- 2.3 采血器材准备
- 2.13 留取标本
- 2.14 血袋及血液标本标识
- 2.17 血液标本处理和保存
- 4.5 血液检测标本



2.3 采血器材准备

- 2.3.3 标本管

- 1) 带有分离胶用于检测病毒核酸的标本管；
- 2) 用于酶联免疫吸附法（以下简称ELISA）、ALT和血型检测的标本管。



2.13 留取标本

- 2.13.1 检测结果用于判定血液能否放行的标本只能在献血时同步留取，不得在献血者健康检查时提前留取。（留取时点）
- 2.13.2 如果使用带留样袋的采血袋，将留样针插入真空采血管，留取血样。（留取方式）
- 2.13.3 如果使用不带留样袋的采血袋，将静脉穿刺针插入真空采血管，留取血样。应单手操作，避免手被针头刺伤。（留取方式）
- 2.13.4 将标本管内促凝剂或抗凝剂与血液充分混匀。



2.14 血袋及血液标本标识

- 2.14.2 宜在标本管与留样针/静脉穿刺针分离前开始标识，对采血袋和标本管的标识应当首先连续完成，不应中断。**(贴标签时点及方式)**
- 2.14.3 宜在标本管与留样针/静脉穿刺针分离前核查采血袋、血液标本、献血登记表，所标识的献血条形码应一致。宜采用计算机程序进行核查。**(核查时点及方式)**



2.17 血液标本处理和保存

- 2.17.1 核酸检测标本应及时离心。
- 2.17.2 血液标本采集后应尽快处理，在合适的温度下保存。



4.5 血液检测标本

- 4.5.1 血液标本的一般要求
 - 1) 标本与血液、献血者一一对应；
 - 2) 标本质量符合检测项目技术要求；
 - 3) 标本信息具有可追溯性。
- 4.5.2 血液标本采集与送检程序的制定
 - 相关方：实验室，标本采集和送检部门
 - 程序内容
 - 采集程序
 - 送检程序
 - 审核职责：质量管理部门
 - 批准职责：法定代表人（集中化检测过程）



4.5 血液检测标本

- 4.5.2 血液标本采集与送检程序的制定
 - 4.5.2.3 标本采集和送检程序的要点
 - 1) 标本类型及检测项目、标本量、标本管、标本运输及包装要求；
 - 2) 标本的惟一性标识（条形码）；
 - 3) 标本的质量要求；
 - 4) 标本采集、送检和接收；
 - 5) 标本信息和检测报告信息的传输与接收，检测报告时限；
 - 6) 如为集中化检测，检测的委托方和受托方的标识与联系方式。



4.5 血液检测标本

- 4.5.3 血液标本管的选择（与2.3.3对应）
 - 4.5.3.1 应根据每项试验的技术要求，采用相应类型的真空采血管留取检测标本。试管应无裂痕、无渗漏，容量应满足检测项目要求。
 - 4.5.3.2 将病毒核酸检测结果列入血液放行依据的实验室，应按照试剂说明书要求选择合适的标本管，最好采用含惰性分离胶的EDTA K2真空采血管留取核酸检测标本。
- 4.5.4 血液标本的采集与标识（与2.13，2.14对应）
 - 4.5.4.1 应对血液标本采集前的准备、标本的采集、标识、登记和保存过程实施有效控制，一次只对一袋血液和同源血液标本管贴签，确保标本与血液、献血者一一对应，贴签无误。标本质量符合检测项目技术要求。（贴标签要求）
 - 4.5.4.2 检测结果用于血液放行的血液标本，应在采集血袋血液的同时或者从血袋血液中留取。（标本留取时点要求）
 - 4.5.4.3 血液标本的采集与标识的具体操作见本规程第2章全血采集。（操作要求指向第2章采血）



4.5 血液检测标本

- 4.5.5 血液标本采集后的处理
 - 4.5.5.1 可以电子或纸面方式登记标本信息，应进行核对，防止信息录入错误。可通过网络、传真或其它形式传输标本信息。（信息采集方式）
 - 4.5.5.2 核酸检测标本采集后，根据所采用的采血管和试验的技术要求实施离心。（NAT标本的处理需要，如离心）
 - 4.5.5.3 血液标本在采血现场的临时保存温度为2~10℃。（临时保存温度2~10℃）



4.5 血液检测标本

- 4.5.6 血液标本包装与运输

- 4.5.6.1 标本应隔离密封包装，包装材料应满足防水、防破损、防外泄、保持温度、易于消毒处理。装箱时应保持标本管口向上。

（标本包装一般要求）

- 4.5.6.2 对于送交集中化检测实验室的标本的包装要求主要有：1）可使标本运输在过程中保持在 $2\sim 10^{\circ}\text{C}$ ；2）外包装有明确标识（放置朝向、易碎）和交付接收双方的联系方式。（NAT标本包装要求）

- 4.5.6.3 标本应在 $2\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下运输，应对运输过程的冷链效果进行确认并定期监测。（运输温度的要求）

- 4.5.6.4 应对标本运输过程进行记录，其要点有：1）启运时间、地点；2）运抵时间、地点；3）标本箱编号、标本类型、数量；4）运输包装有无受损、有无泄漏；5）运输时间2小时以上的应记录箱内温度；6）标本交运人、承运人；7）运输过程中发生的可能影响标本质量的意外事件及处理措施。（记录要求）



4.5 血液检测标本

- 4.5.7 血液标本的交接

- 4.5.7.1 接收时标本应核查：1) 标本来源、数量、采集时间；2) 标本采集管使用正确与否；3) 标本是否满足既定的质量要求；4) 标本与送检单信息对应性和完整性。（核查内容）
- 4.5.7.2 如发现溢漏应立即将尚存留的标本移出，对溢出标本管和原包装箱进行消毒并记录，必要时报告实验室负责人和送检单位。（事件处理）
- 4.5.7.3 应拒收标本的情形有：1) 检测申请关键信息缺失或不符；2) 标本管上无标识或标识不清、不正确；3) 标本管选用错误；4) 标本量不足或被稀释；5) 不符合试剂说明书要求的情形。（标本拒收）
- 4.5.7.4 标本交接双方应在标本交接记录签名。（职责确认）



新 规 程 中 检 测 中 过 程 控 制 要 求

- 4.6 试验操作
- 4.7 试验性能监控
- 4.8 试验结果的判定
- 4.9 ELISA初次试验有反应性标本的重复试验
- 4.10 核酸初次试验有反应性的进一步处理（见试剂说明书）
- 4.11 血型检测
- 4.12 血液检测最终结论的判定



4.6 试验操作

- 4.6.1 按照试剂生产方提供的试剂使用说明书进行操作。
（操作的基本依据）
- 4.6.2 如需对个别试验参数进行修改，应进行确认。（变更控制）
- 4.6.3 宜采用自动化检测设备操作标本和试剂加样以及试验过程。（操作方式）
- 4.6.4 自动化设备运行参数的设置应建立权限控制。应保存设置参数的书面记录，并定期将其与实际设置参数对照，确保设置无误，应保存核实记录。（设备参数控制）



4.6 试验操作

- 4.6.5 应保存自动化检测设备运行记录，并定期对运行状态进行审核。（试验追踪）
- 4.6.6 自动化检测设备运行时，如果需要人工辅助或干预，应对实施人工辅助或干预的人员、人工辅助或干预的时间和内容、与自动化检测设备运行的衔接等进行记录。（操作干预控制）
- 4.6.7 如果是采用手工操作标本和试剂加样或试验微孔板，应完整记录每一加样和操作步骤。（手工操作要求）



4.7 试验性能监控

- 4.7.1.1 在血液筛查过程中，应对试验性能持续进行监测，以发现正在发生的任何性能变化，这些变化如果没有得到及时纠正，最终可能导致试验批次的失败，或者弱阳性样本的漏检。



4.7 试验性能监控

- 4.7.1.2 选择能够及时反映试验性能或试验应用（试验或者试验操作者/操作系统）变化的1项或者多项参数进行监测，以保证试验性能。这些参数包括：
 - 1) 试验对照的检测值；
 - 2) 质控品的检测值；
 - 3) 初、复试有反应率及两者的比例（复试有反应性标本数/初次试验有反应性标本数）。
- 4.7.1.3 应当根据质控品的特性和用途加以选择和使用。
（使用目的）
 - 监控有效性
 - 监控稳定性



4.7 试验性能监控 – 质控品的使用要求

- 4.7.1.4 作为试验有效性的外部对照应具备：
 - 1) 经过国际（国家）标准溯源；（国际或国家溯源）
 - 2) 以合适的基质进行稀释；（减少干扰）
 - 3) 检测标志物含量接近检测限（S/CO值为2~5）。
（阳性外部对照检测限）
- 4.7.1.5 用于监测试验稳定性的质控品，不要求经过国际（国家）标准溯源。
- 4.7.1.6 实验室应当尽可能使用质控品。



关于标准物质溯源

- 国家计量局颁布《标准物质管理办法》
 - 一级标准物质
 - 用绝对测量法或两种以上不同原理的准确可靠的方法定值。在只有一种定值方法的情况下，用多个实验室以同种准确可靠的方法定值；
 - 准确度具有国内最高水平，均匀性在准确度范围之内；
 - 稳定性在一年以上或达到国际上同类标准物质的先进水平；
 - 包装形式符合标准物质技术规范的要求。
 - 二级标准物质
 - 用与一级标准物质进行比较测量的方法或一级标准物质的定值方法定值；
 - 准确度和均匀性未达到一级标准物质的水平，但能满足一般测量的需要；
 - 稳定性在半年以上，或能满足实际测量的需要；
 - 包装形式符合标准物质技术规范的要求。



关于标准物质溯源

- 中华人民共和国制造计量器具许可证
- 标准物质证书
- 由国务院计量行政部门批准（中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局）



4.7 试验性能监控 – 质控品的使用要求

- 4.7.1.7 质控品所含目标检测物的**浓度**应满足实验要求。在日常使用前应对质控品的种类、规格、外观、批号和效期进行检查。

– EIA

- 监控有效性的阳性外部对照（**S/CO**值为**2~5**）；溯源性？
 - 反应性/非反应性
- 监控稳定性**QCS**规格要求？是否需要？
 - **SPC**
- 阴性**QCS**是否需要？
- 选择适合不同的试验的**QCS**

– NAT（是否适用？）

- 监控有效性的阳性外部对照？规格？（分析灵敏度的**2-5**倍）
- 监控稳定性**QCS**是否需要？
- 阴性**QCS**是否需要？
- 溯源？性能稳定？



4.7 试验性能监控 – 质控品确认

- 4.7.1.7 质控品所含目标检测物的浓度应满足实验要求。在日常使用前应对质控品的种类、规格、外观、批号和效期进行检查。
 - 质控品确认的SOP
 - ALT质控品：医学决定水平；使用前预确认；记录
 - EIA质控品：S/CO2-5；使用前预确认；记录
 - NAT质控品
 - 配置：容器、耗材无RNA酶
 - 预试验
 - 稳定性：试验周期1月？2月
 - 记录



4.7 试验性能监控 – 质控品的使用要求

- 4.7.1.8 质控品应与血液检测标本在相同的检测条件下进行检测。如单一微板为一批试验，每一微板至少包括1份外部质控品。
 - 与标本检测条件相同
 - 批的概念：ALT，EIA，NAT
- 4.7.1.9 外部质控品和内部（试剂盒）对照不可相互替代。
- 4.7.1.10 外部质控品的用途（用于判定试验有效性或监控试验稳定性）一经确定，不应随意更改。

（质控策略的稳定性）



4.7.2 ELISA室内质控

– 附录D 血液检测室内质控方法

- 针对试验过程。基于试验结果和检测数据
- 血站血液检测试验的类型
 - ELISA试验：血清学抗体或抗原检测
 - ALT酶学试验
 - NAT试验： HBV/HCV/HIV DNA或RNA检测
- 推荐的室内质控方法
 - ELISA试验
 - 有效性：通常采用试剂盒阴阳性对照、弱阳性质控品实时监控实验的有效性
 - 稳定性：采用弱阳性质控品和Levey-Jennings质控图监控实验的稳定性
 - ALT试验：定量试验。通常采用Levey-Jennings质控图监控ALT实验的精密性和有效性。
 - NAT试验以及其它定性试验：可借鉴ELISA 的质控方法。



D.2 ELISA实验过程稳定性控制

- 质控规则
 - 1_{3s} : 一个质控值超过。用于提示可能存在随机误差。
 - 7_x : 7个连续的质控值落在均值一侧，用于提示可能存在系统误差。
- 质控图框架建立
 - 10~20天，至少20个数据
 - 累计框架的适用性？
 - $cv20\%$
- 控制限
 - 关注 $-3S$ 是否低于1
- 质控框架的重建
 - 更换新批质控品
 - 更换新批试剂
 - 过程变化



4.8 试验结果的判定

- 4.8.1 试验结果判定规则 应制定明确的试验有效性和标本试验结果判定规则，将其编写或设置成为计算机程序，对其编写、设置、修改和启用应进行控制，所有修改均应保存原版本，确保其具有可追溯性。
 - 试验有效性规则
 - 试验结果判定规则
 - 采用LIS判定
 - 变更控制



4.8 试验结果的判定

- 4.8.2 试验有效的判定
- 4.8.2.1 应核查每批试验所使用的试剂、设备、试验过程、有无人工干预或其他非正常工作步骤出现等关键控制点，正确无误后方可对试验有效性进行判定（确定结果判断的CCP）
- 4.8.2.2 试剂盒各种试验对照的检测值符合试剂说明书的要求，是判定试验有效的最低要求。
- 4.8.2.3 如果外部质控品的检测值是作为试验有效性的判定依据之一，其检测值应符合既定要求。（外部质控品的使用—有效性）
- 4.8.2.4 如果外部质控品的检测值是作为试验稳定性的监控，其检测值应符合既定范围。如果超出既定范围，按既定程序决定试验是否有效。（外部质控品的使用—稳定性）
- 4.8.2.5 如果采用人工判定，应详细记录每一判定依据，应双人核查。（人工判定的控制：记录）
- 4.8.2.6 如果判定一批试验无效，则该批试验所有标本的检测结果均为无效。（质控结果与标本结果的制约关系）



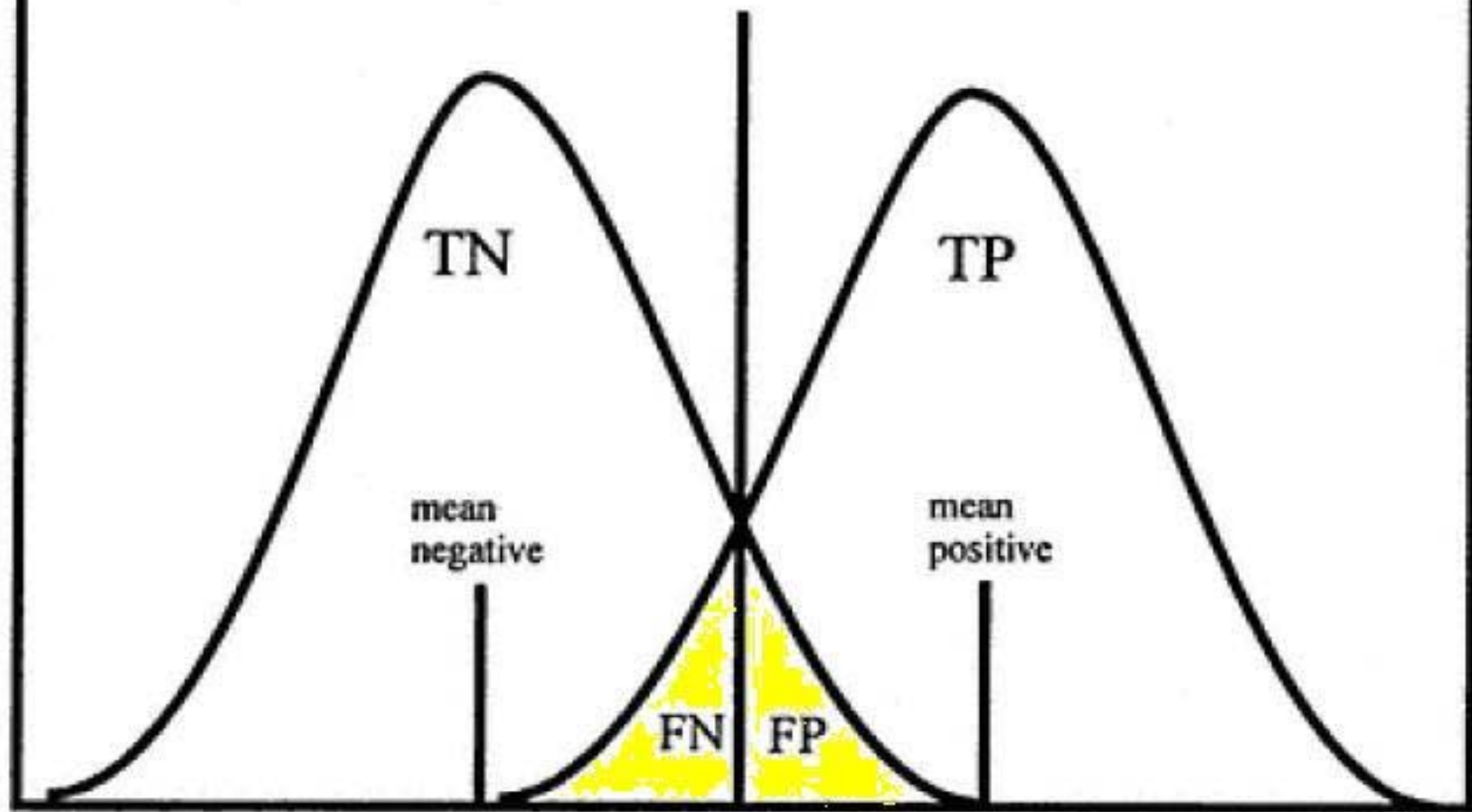
4.8 试验结果的判定

- 4.8.3 标本试验结果计算和判定 判定试验有效后，按照试剂说明书的要求计算临界值和灰区。根据标本检测值与临界值的比较结果，判定为标本检测结论为无反应性、有反应性或不确定。



关于灰区

Probability density



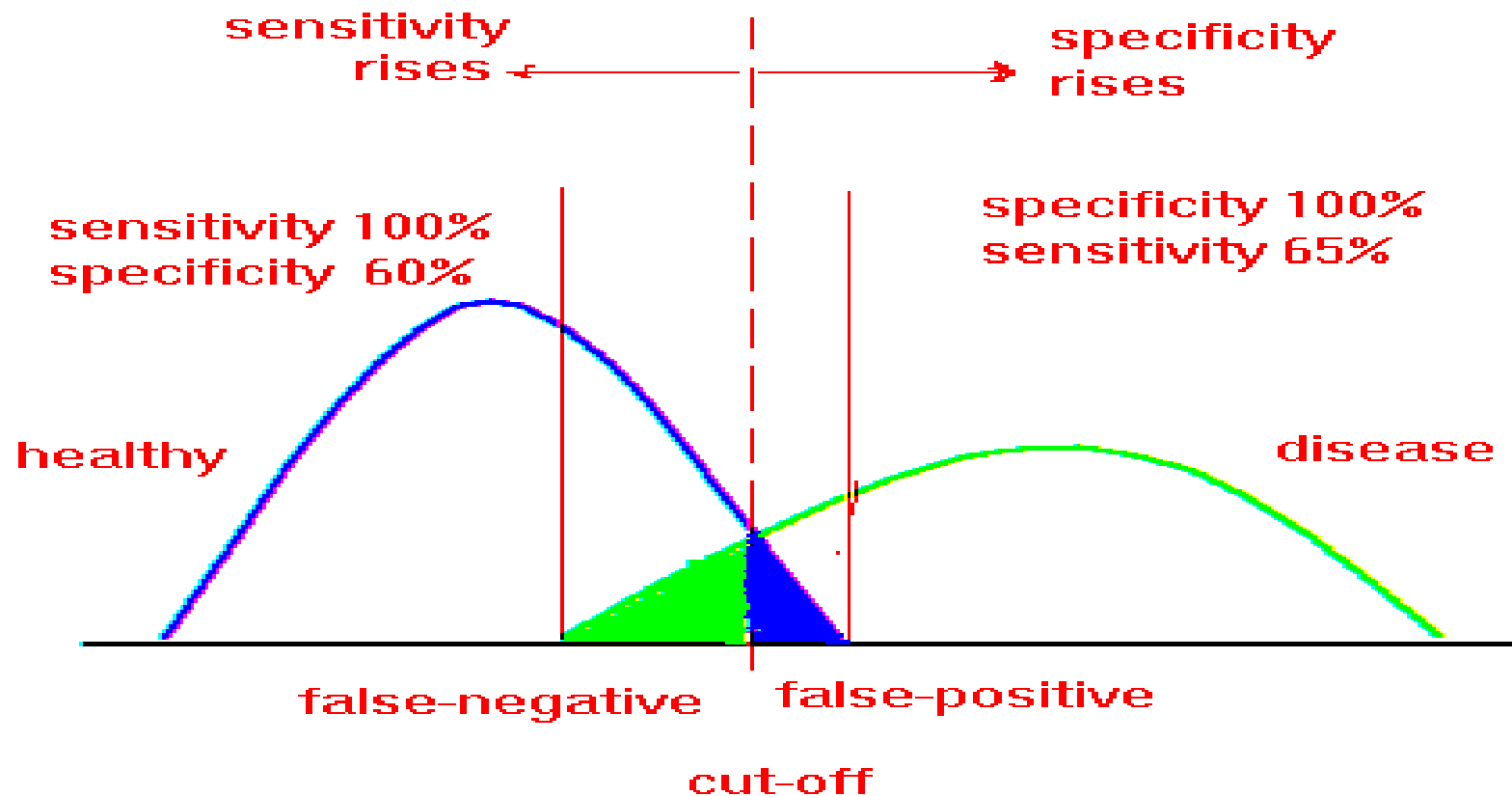
ELISA OD intervals →

关于灰区

- 从统计学角度，灰区决定了cutoff的设定范围。在这个范围内设定cutoff，影响试验灵敏性或特异性。
- 在灰区内设定Cutoff
 - 试剂盒说明书指定的计算方法
 - 用户自己的计算方法
 - 目的：提高分析灵敏度，减少假阴性
 - 方式：依据说明书计算出的cutoff下移一定百分比
- cutoff下移比例的设定
 - 依据试剂盒说明书
 - C_{50} 试验
 - ROC曲线
 - 试验变异



关于灰区



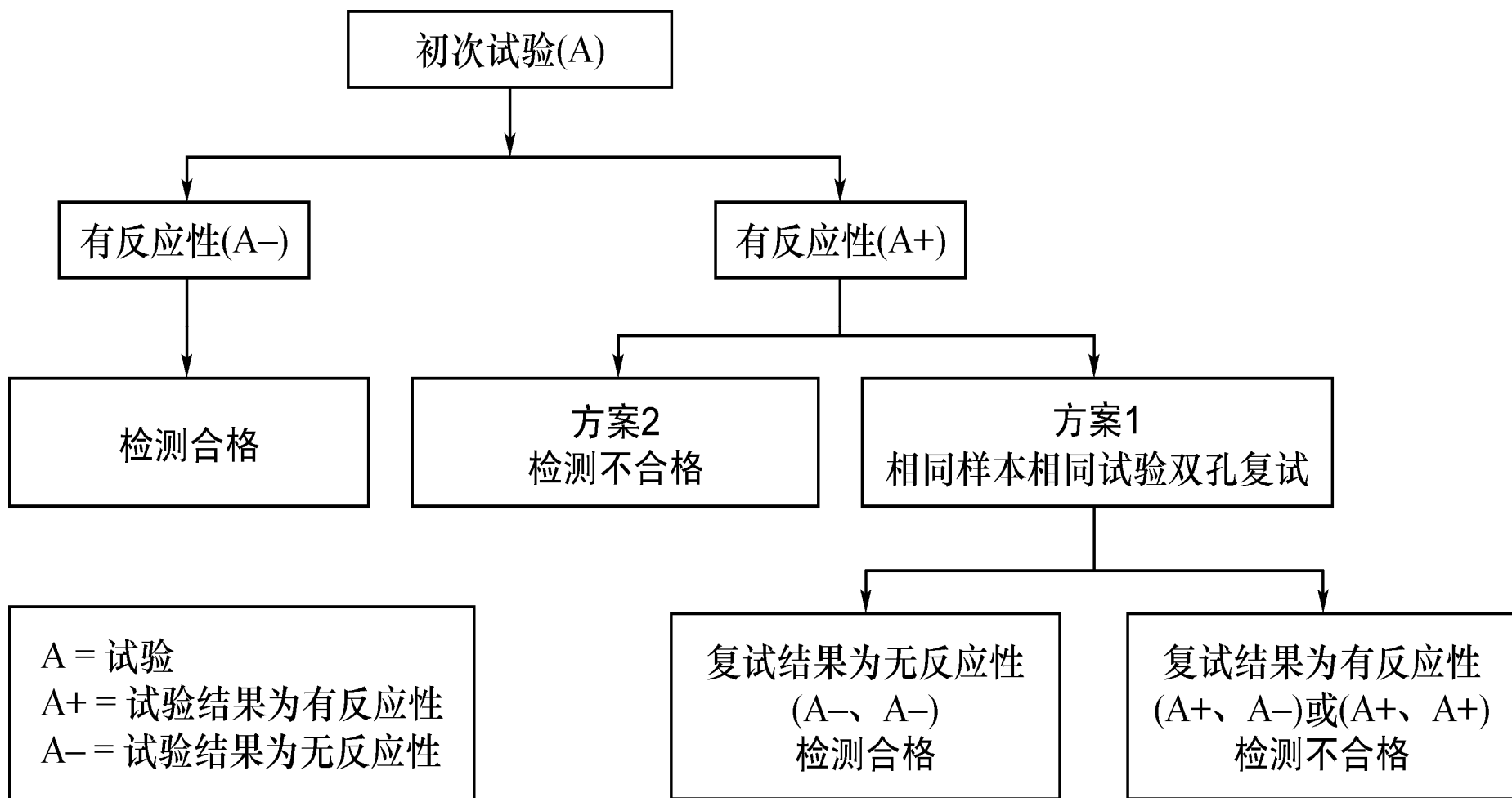
NAT与EIA结果 – HBV

						Dis+	Dis -
HBsAg (NAT+ and EIA+)	376	EIA ++	332			297	35
		EIA +	44	A	2	0	2
				B	42	36	6

NAT与EIA结果 – HCV

血站检测结果				罗氏电化学发光检测		RIBA确认结果					
阳性结果 试剂代 码	初次检 测 S/C O值	复检 S/ CO 值 1	复检S/CO 值2	检测信号 值 COI	检测结果	C100	C33c	C22p	NS5	hSOD	结果 判定
B	1.457	1.964	1.071	0.113	N	-	+	-	+	+/-	P
B	1.529	1.107	1.15	555.1	R	+	2+	4+	-	-	P
A	0.858	1.203	1.206	0.441	N	-	-	+	+	-	P
A	1.032	1.263	1.265	0.177	N	+	+	-	+/-	-	P
A	1.554	1.845	1.712	0.092	N	-	+	2+	-	-	P
B	1.386	1.007	0.914	0.169	N	+	3+	-	+/-	-	P
B	0.721	0.564	0.843	16.81	R	+	+/-	+	-	+/-	P
A	0.769	1.013	0.961	0.087	N	2+	-	-	4+	-	P
A	0.973	1.213	1.193	524.5	R	4+	4+	4+	3+	-	P

4.9 ELISA初次试验有反应性标本的 重复试验



4.9 ELISA初次试验有反应性标本的重复试验

- 方案1：
 - 以同一试验对原血样（或从血袋导管重新取样）做双孔复试，如果双孔复试结果均为无反应性，其初试有反应性可能由于假反应性或技术误差导致，检测结论为无反应性，血液可放行供临床使用；如果双孔复试结果中任何1孔为有反应性，则检测结论为有反应性，对应的血液及由其制备的所有成分应隔离并报废，将血液标本转送相关实验室做进一步确证或补充试验。
 - 重复试验对象：原血样或导管血样
 - 相同：采用带旁袋的采血袋
 - 不相同：无旁袋的采血袋
 - 检测前过程控制机制
 - 不合格标本进一步确证的建议
- 方案2：
 - 不做重复试验，初次试验结论即为检测最终结论



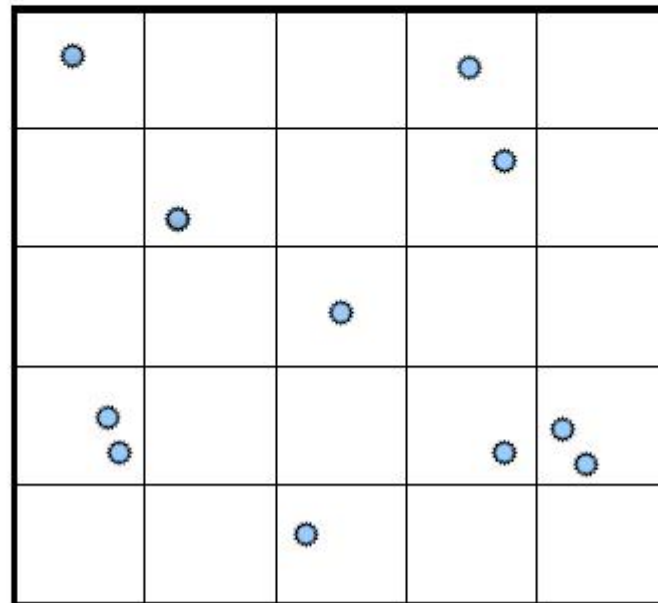
4.10 核酸初次试验 有反应性的进一步处理

- 根据试剂说明书
- 涉及后续试验
 - 拆分试验：混样反应性标本
 - 鉴别试验：单检反应性标本或拆分后反应性标本
 - 重复试验：是否采用



Poisson distribution

Probability of detection in low viral load samples



Poisson



reactive



not reactive



ISBT abstract Cable et al, Berlin 2010

- Of the **1107 Ultrio NRR donors**, **123 (11.1%)** were anti-HBc positive and the majority (109, 88.6%) were also anti-HBs positive. The **control group** for comparison consisted of **3475 consecutive donors** who were non-reactive for all routine viral screens. They were screened for anti-HBc: **205 (5.9%)** were confirmed positive; 166 (81%) were also anti-HBs positive (>10mIU/ml).
- There is a slightly but significantly higher rate of anti-HBc positive donors in the Procleix Ultrio IR/NRR group, than in the control group (Chi-square, $p < 0.0001$). There was no significant difference between the 2 groups of anti-HBc reactive donors with respect to anti-HBs prevalence ($p = 0.068$).



4.11 血型检测

- 4.11.1 血型检测项目 GB18469《全血及成分血质量要求》规定的强制检测项目有：1) ABO血型正确定型；2) RhD血型正确定型。（项目及合格标准）
- 4.11.2 血型检测方法 血型筛查常用方法有平板法和微板法、血型鉴定常用试管法和微板法。按照试剂说明书和《全国临床检验操作规程》（第3版）的规定进行具体操作和质量控制。附录E提供了建立微板法一般方法，可供实验室自行建立微板法时参考。全自动化血型鉴定系统按照使用说明书进行操作，投入使用前应经过充分确认。如有必要，可增加血型基因检测。
 - 血液检测：ABO正反定型， RhD血型
 - 关注
 - 试剂说明书是否明确平板法、微板法和试管法程序；是否适用于自动化设备
 - 血型试验方法的变更与确认



4.11 血型检测

- 4.11.3 血型检测结论
- 4.11.3.1 应当经过**2次检测结果的比对**，一致时才能做出血型检测最终结论。
- 4.11.3.2 如果2次检测结果不一致，应当进行细致审慎调查，发现导致不一致的原因，正确无误加以解决。
 - **ABO血型结果的比对**
 - 献血者快速检测结果（正定型）与实验室结果（正反定型）
 - 献血者历史血型结果与实验室结果
 - 2次实验室结果
 - **Rh（D）血型比对：重点Rh（D）阴性结果**
 - Rh（D）阴性：筛查试验结果与确证试验结果
 - Rh（D）阳性
 - **血型试验的质控：采用已正确定型的包含和不包含A/B抗原和Rh（D）抗原的血液标本**



血型试验问题的不同理解

- 如何理解2次检测结果
 - 模式1：实验室必须进行2次ABO正反定型和RhD筛查，RhD阴性和ABO血型不符均进一步鉴定。
 - 模式2：采血前实施ABO正定型。实验室只需做1次ABO正反定型和RhD筛查。RhD阴性和ABO血型不符均进一步鉴定。
- 血型检测目的：ABO血型和RhD正确定型
- 确保满足标准的基本方法：结果比较
- 如何比较：没有唯一路径
- 回顾性确认：如模式2可以满足要求，成本效益较好。



4.12 血液检测最终结论的判定

- 4.12.1 血液检测合格判定标准 HIV、HBV、HCV、梅毒感染标志物检测的最终结论均为无反应性，ABO/RhD血型正确定型，**ALT测定值符合国家相关标准**。
- 4.12.2 血液检测不合格的判定标准 不符合4.12.1条规定的情形。
- 4.12.3 应当建立和实施血液检测最终结论的计算机判定程序。如果需要人工判定，应由双人复核。

— 判定方式

- 计算机判定
- 人工判定



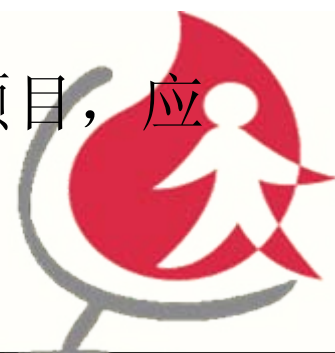
新规程中检测后过程控制要求

- 4.13 血液检测结论的报告和利用
 - 4.13.1 血液检测最终结论是血液放行与否的依据。只有检测合格的血液方可放行供临床使用，检测不合格的血液不得放行。（血液放行标准）
 - 4.13.2 血液检测最终结论应以电子数据传输，并为计算机血液放行控制程序直接利用。（报告传输方式）
 - 4.13.3 如果需要人工录入血液检测最终结论，或者需要人工放行，应由双人复核。（人工干预环节的控制）
 - 4.13.4 血液集中检测的双方应明确血液检测结论的报告和利用的方式、职责与分工。（集中检测模式报告利用的程序和职责）
 - 4.13.5 发现血液检测结论报告有误，应迅速启动血液检测报告和血液收回程序。（报告收回）



附录B 血液检测方法的确认

- 血液检测方法包括完成检测必需的仪器、试剂、校准品、实验程序组合
- 确认的范围
 - 实验室首次引入的检测方法，如实验室从未使用过的试剂、仪器等。
 - 实验室首次将某项目引入现用检测方法，如HBsAg项目由A仪器检测改为由B仪器检测。
 - 若多台仪器（相同品牌和型号）检测同一个项目，应对每一台仪器的性能进行确认比较



分析方法的确认

- 确认方法性能的技术包括
 - 使用参考标准或标准物质(参考物质) 进行比较
 - 与其他方法所得结果进行比较
 - 实验室间比对
 - 对影响结果的因素做系统性评价
 - 如需要，对所得结果不确定度进行评价



血站实验室分析方法

- 定性分析方法
 - **HBsAg**、抗-HCV，抗-HIV，抗-TP，NAT
 - 定性分析特性参数：灵敏度、特异性、准确性、重复性、预期值、似然比和耐用性等
- 定量分析方法
 - **ALT**、细胞计数
 - 定量分析特性参数：正确度、精密度、分析灵敏性、分析特异性、检测可报告范围、参考区间和耐用性
- 鉴别分析方法
 - **ABO**、Rh（D）
 - 灵敏度、特异性、重复性等



定性试验的确认方法

EP12-A

User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance;
Approved Guideline

EP12-A2

User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance;
Approved Guideline—Second Edition



定性试验确认

- 定性分析方法特性
- 确认活动的一般要求
- 重复性试验（精密性试验）
- 两灵敏性特异性的比较（准确性试验）
- 试验结果一致性比较



定量试验的确认方法

EP5-A2

Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition

EP6-A

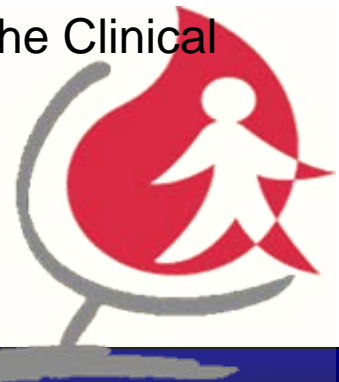
Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline

EP9-A2

Method comparison and bias estimation using patient samples
approved guideline

C28-A3

Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition



定量方法确认

- 方法确认：关键在于与经典或认可方法的对照
- 定量试验：
 - 不准确度或正确度
 - 不精密性
 - 生物参考区间
 - 可报告范围.....



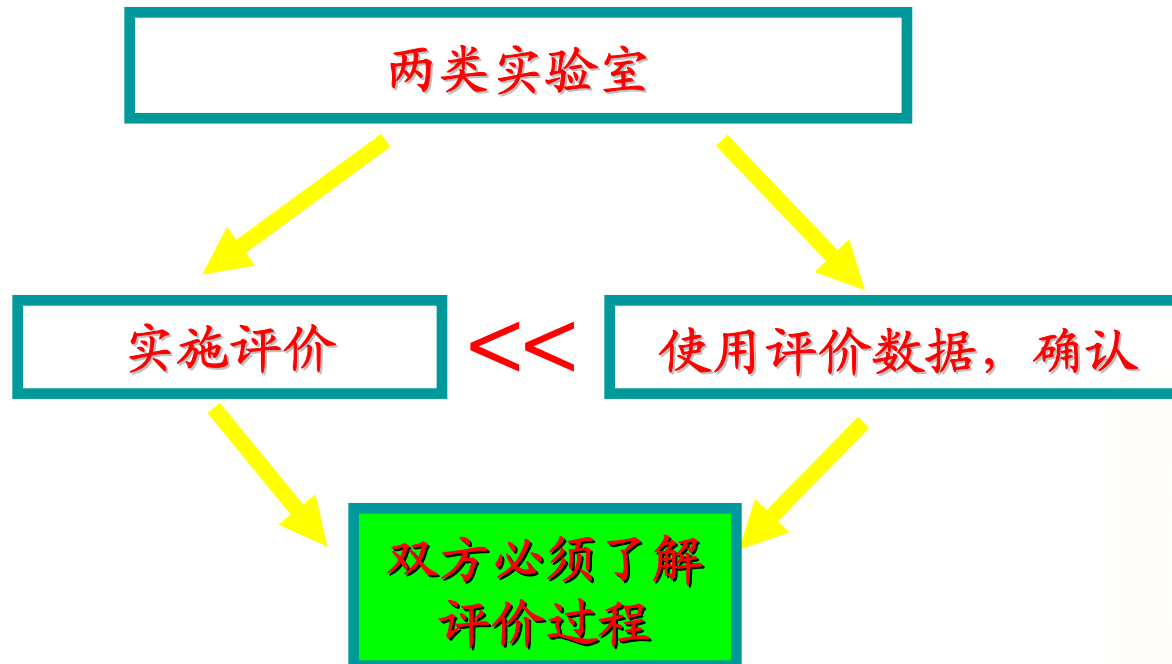
ABO 血型试验的确认

- 参照英国血液学标准委员会颁布的《血型、抗体筛查和交叉配血新技术的评价、确认和实施建议》（Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross-matching. British Committee for Standards in Haematology）
- 采用平行试验策略，用常规标本，将新方法 with 现用方法进行比较，确认新方法的常规使用状态。
- 实验时间最短1周
- 操作程序和实验结果应文件化
- 定期进行关键标本（弱抗原或弱抗体标本）重复实验，确认方法的稳定性和耐用性。



评价与确认

- 评价或确认？
 - 如果设计开发一项分析实验，必须评价
 - 如果应用一项分析实验，应进行确认



新版规程血液检测部分 关注度较高的若干问题

- 血型试验问题
- 设备确认问题
- 设备性能比对问题
- 试剂抽检问题
- 临界值与灰区设定问题
- ALT报告限值问题
- 重复检测标本来源问题
- 血液检测过程与HIV疫情上报
- 献血者归队问题



全国艾滋病检测技术规范 (2009年修订版)

- 第二章 HIV抗体检测
 - 5 以诊断为目的的检测策略
 - 6 以监测为目的的检测策略
 - 7 以血液筛查为目的的检测策略
 - 参照血液系统相关规定执行
- 第四章 HIV核酸检测
 - 未包含血液筛查



血液筛查策略与HIV检测策略的衔接

- 2遍血清学检测不矛盾
- 1血清学检测+1NAT检测？



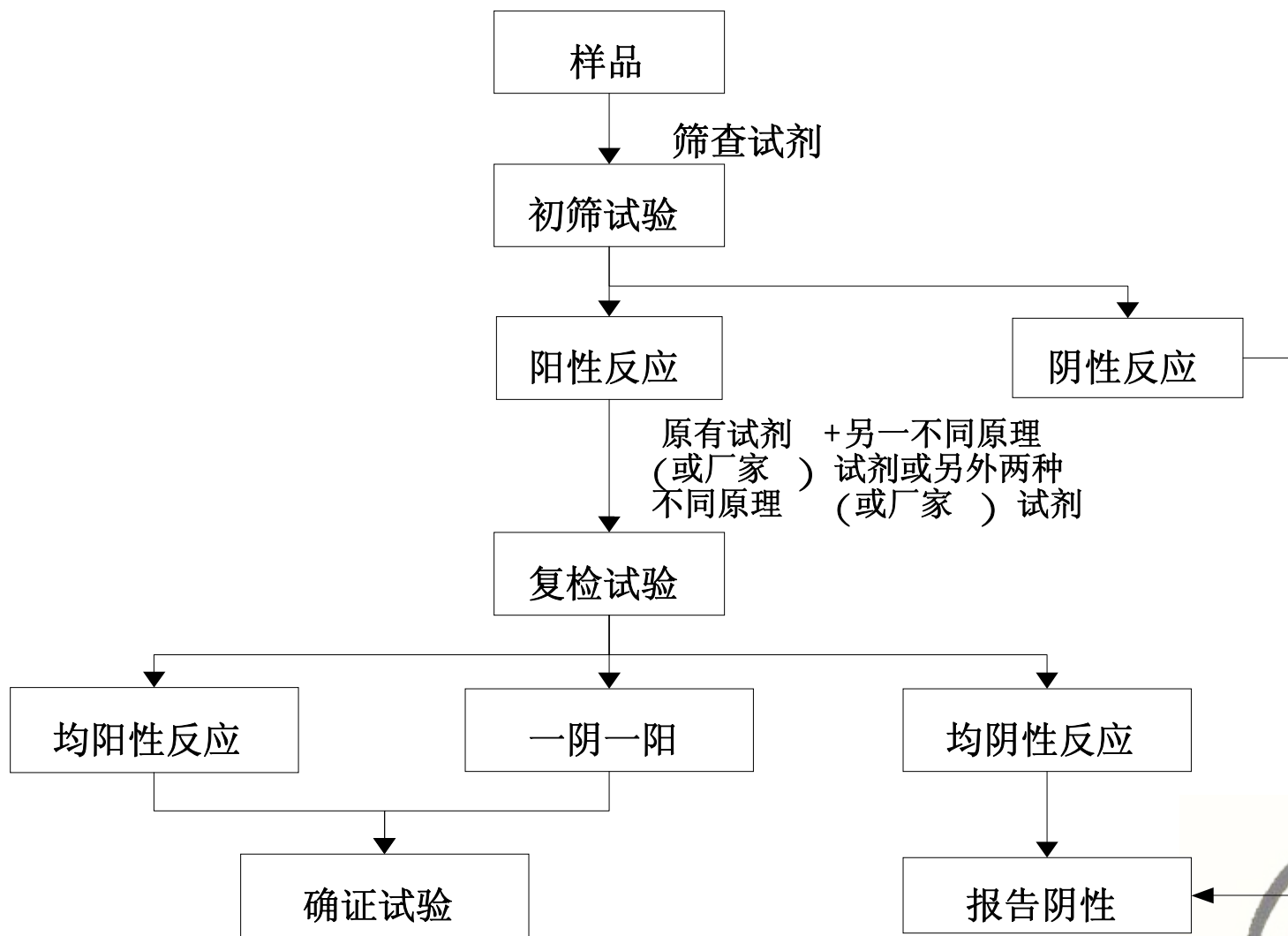


图1

以诊断为目的HIV抗体筛查检测流程



献血者归队策略？



WHO 对血液进行输血传播传染病筛查 建议（血液筛查建议）

目标

- 1) 为有效实施血液筛查，显著降低输血途径传播的血源性感染的风险提供策略引导。
- 2) 信息和技术建议：
 - (1) 有效建立与实施国家血液筛查计划，确保血液100%经过筛查；
 - (2) 明确血液筛查的TTIs 种类；
 - (3) 建立恰当的筛查策略和筛查规则；
 - (4) 建立分析方法选择和评价机制；
 - (5) 建立实施血液筛查全面质量管理体系；
 - (6) 对检测结果为阳性或反应性的献血者进行管理。

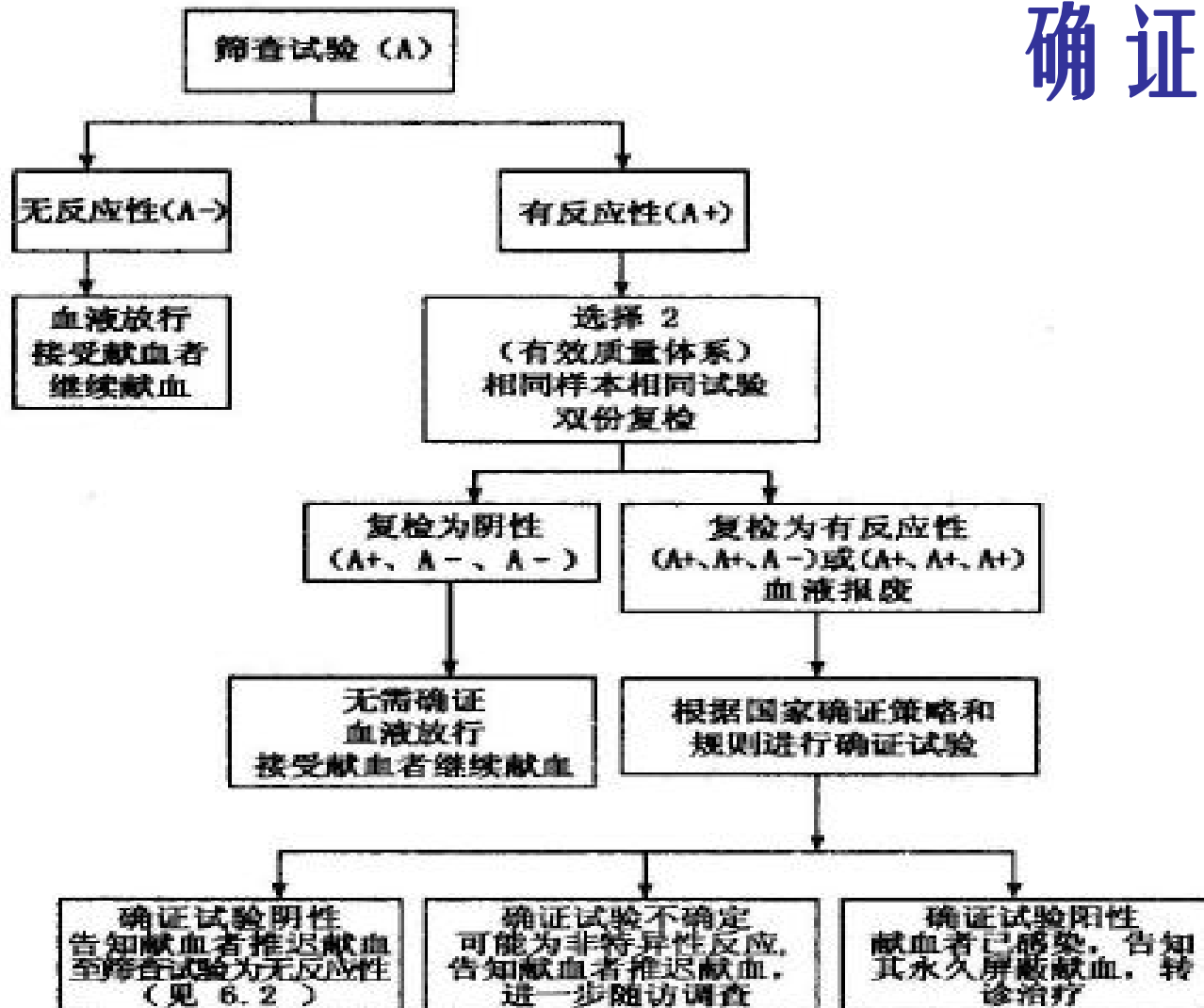


WHO 血液筛查推荐性建议

- 技术建议
 - 7) 只有规定的所有标志物检测结果均为无反应性的血液，才能批准放行供临床或生产使用；
 - 8) 应根据国家的相关规定，从待检库移出筛查试验结果为有反应性的所有血液单位，单独存放、安全处置，或者将其保存，以用于质量保证或研究；
 - 9) 应建立和实施检测结果保密机制；
 - 10) 应进一步确证血液筛查结果为有反应性的血液，做好献血者告知与咨询、转诊治疗，屏蔽其献血或请其继续献血，并对以前献血进行回访等。



确证试验策略



A 试验; A+ 试验结果为有反应性; A- 试验结果为无反应性

图 2 根据血液筛查和确证试验进行献血者管理的规则





谢谢

