

分子诊断检验程序性能验证指南解读

CNAS- GL 39

中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院）

沈佐君



CNAS-GL039

分子诊断检验程序性能验证指南

Guidance on the Performance Verification for
Molecular Diagnostic Procedures

中国合格评定国家认可委员会



CNAS-GL037

临床化学定量检验程序性能验证指南 Guidance on the Verification of Quantitative Measurement Procedures used in the Clinical Chemistry

中国合格评定国家认可委员会

本文件编制人员如下：

- | | |
|-----|------------------------|
| 沈佐君 | 中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院） |
| 陈 杰 | 北京协和医院（病理） |
| 李金明 | 卫生部临床检验中心 |
| 郑培炆 | 福建医科大学附属第一医院 |
| 周晓燕 | 复旦大学附属肿瘤医院（病理） |
| 汝 昆 | 中国医学科学院血液病研究所（病理） |
| 李增山 | 中国人民解放军空军西京医院（病理） |
| 应建明 | 中国医学科学院肿瘤医院（病理） |
| 王文泽 | 北京协和医院（病理） |
| 周亚莉 | 中国合格评定国家认可中心（CNAS） |

1 范围

本指南适用于申请认可或已获认可的医学实验室对分子诊断相关检测程序进行性能验证实验活动时使用，也可供医学实验室评审员在现场评审过程中参考使用。本指南适用的分子诊断技术包括：**PCR、Sanger测序、二代基因测序(NGS)、原位杂交等**，其他分子诊断使用的检验程序/方法可参考使用。

本文件适用于医学实验室采用的**经确认**的检验程序。

注：鉴于实际临床工作中进行分子诊断的样本类型（如进行原位杂交的样本有血液、羊水穿刺、肿瘤组织等）以及预期用途差别较大，而不同样本类型对性能验证的要求和难易程度差别较大，建议结合实际情况酌情选择与之相符合的性能验证方案。

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。

WS/T 420-2013 《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》

WS/T 492-2016 《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》

WS/T 505-2017 《定性测定性能评价指南》

YY/T 1261-2015 《HER2基因检测试剂盒（荧光原位杂交法）》

YY/T 1459-2016 《人类基因原位杂交检测试剂盒》

3 术语和定义

对于本指南，GB/T 29791.1-2013/ISO 18113-1：2009）中的定义适用。下列术语和定义适用于本指南。

3.1 可报告范围 reportable range

体外诊断医疗器械性能特征已被验证的测量区间。
[GB/T29791.1-2013/ISO 18113-1：2009 3.46 注1]

4. 总则

4.1 性能验证的时机

4.1.1 检验程序常规应用前。

4.1.2 任何严重影响检测系统分析性能的情况发生后，应在检测系统重新启用前对受影响的性能进行部分性能验证。影响检测系统分析性能的情况可包括但不限于仪器主要部件故障，仪器搬迁，设施、环境的严重失控等。

4.1.3 常规使用期间，实验室可基于分析系统的稳定性，利用日常工作产生的检验和质控数据，**定期对检验程序的分析性能进行评审**，应能满足检验结果预期用途的要求。新检测系统也包含现用检测系统的任一要素（仪器、试剂、校准品等）变更，如试剂升级、仪器更新、校准品溯源性改变等应按照新系统来进行验证。

4.2 性能验证的参数

分子诊断检验程序的性能参数主要包括PCR定性和定量检测、Sanger测序、二代基因测序（NGS）和原位杂交等。**PCR定量检测**选择验证的性能指标宜包括测量正确度、测量精密度（含测量重复性和测量中间精密度）、测量不确定度、分析特异性（含抗干扰能力）、分析灵敏度、检出限和定量限、线性区间（可报告区间）等。**PCR定性检测**选择验证的性能指标宜包括方法符合率、检出限、抗干扰能力、交叉反应等。**Sanger测序和NGS**选择验证的性能指标宜包括方法符合率和检出限等。**原位杂交技术**应依据样本类型和预期用途，选用适宜的性能指标进行验证，如基于完整细胞的原位杂交宜选用分析敏感性和特异性，基于组织的宜选用方法符合率。

如果检验程序适用样本类型包括血清与血浆，实验室在临床检测时同时使用血清与血浆，应进行血清与血浆结果**一致性的验证**。在肿瘤靶向基因检测时，如果检验程序适用样本类型包括除肿瘤组织/细胞以外的样本（如血浆），应进行与肿瘤组织结果**一致性的验证**。如果检验程序**高度依赖人工操作或判断**，应进行不同操作人员间的验证，验证程序可参照本指南相关内容制定。

实验室应根据检测项目的**预期用途**以及生产**制造商声明**，选择对检测结果质量有重要影响的参数进行验证。不同技术平台、样本类型以及预期用途不同时，所需验证的性能指标宜有所侧重。

4.3 性能验证的判断标准

实验室应根据临床需求选择经确认的符合**预期用途**的检验程序。

实验室性能验证结果的判断标准是厂商或研发者在试剂盒或检测系统**说明书**中声明的性能指标。

CNAS-CL02 “医学实验室质量和能力认可准则” (ISO 15189: 2012)

5.5.1 检验程序的选择、验证和确认

5.5.1.1 总则

实验室应选择**预期用途**经过确认的检验程序。

每一检验程序的规定要求（性能特征）应与该检验的预期用途相关。

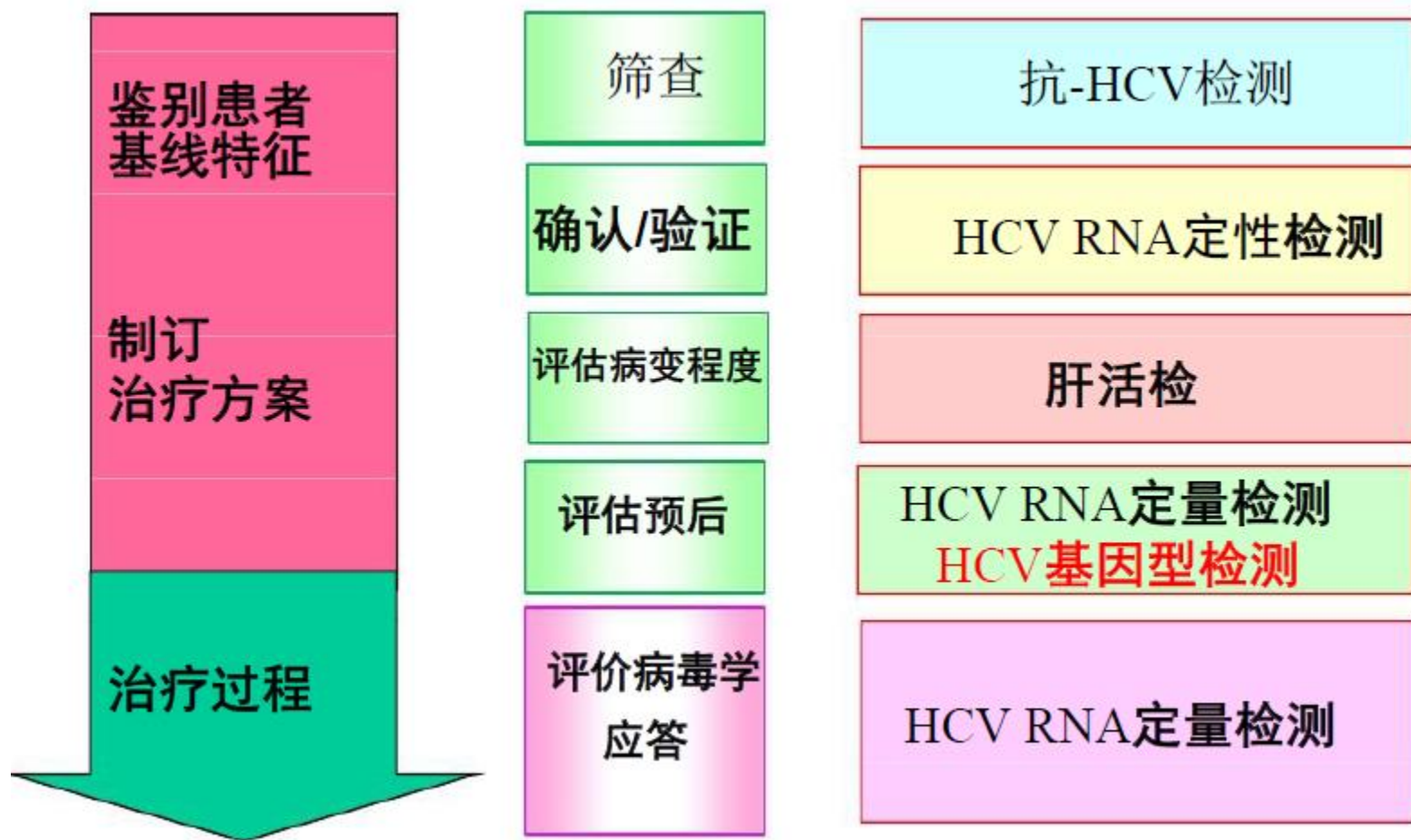
首选程序可以是体外诊断医疗器械使用说明中规定的程序，或公认的/权威的教科书、经同行审议过的文章或杂志发表的，或国际公认标准或指南中的，或国家、地区法规中的程序。

何谓预期用途？

——检验结果在临床上的应用目的

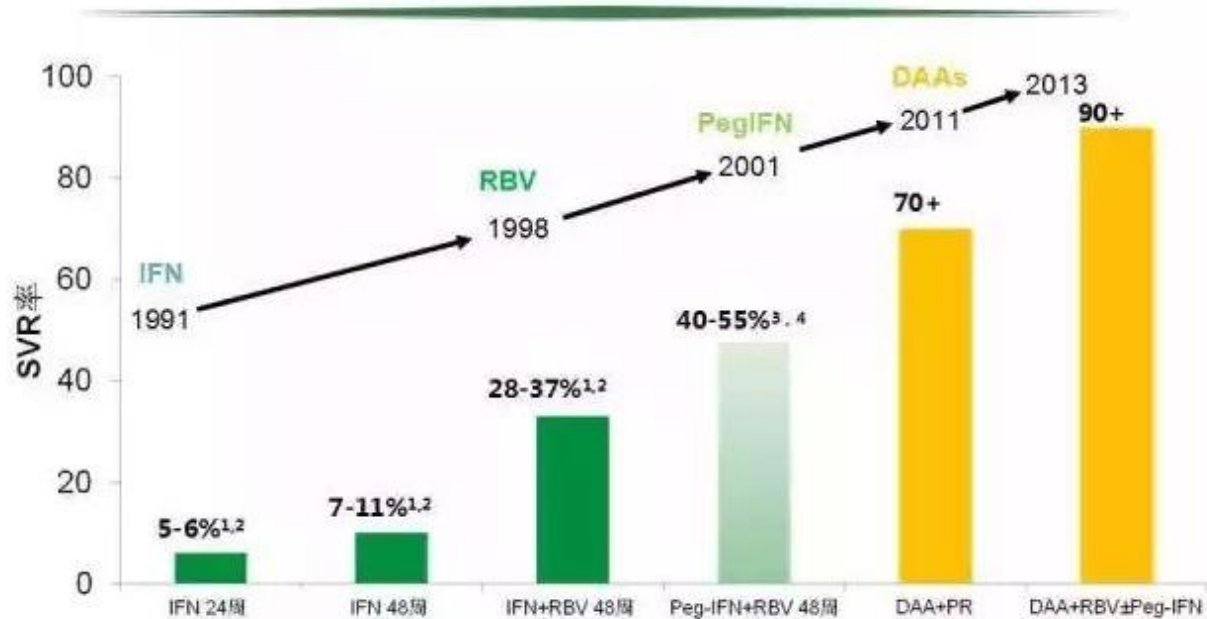
1. 疾病的筛查（提示）
2. 鉴别诊断（确认或验证）
3. 疗效观察
4. 预后判断
5. 用药指导

丙肝检验项目的临床应用



丙肝药物不断发展，SRV率增高，治愈率越高

CHC治疗里程碑



- 常规推荐的治疗方案：PR方案（聚乙二醇干扰素α联合利巴韦林）
- 采用以干扰素为基础的方案进行治疗后的病毒应答率较低（44%~83%）⁵
- 2017.4.28，CFDA批准第一个DAA产品：盐酸达拉他韦片和阿舒瑞韦软胶囊联合治疗方案，用于治疗成人基因1b型CHC。

1. McHutchison et al. NEJM 1998;339:1485-92. 2. Ponard et al. Lancet. 1998 Oct 31;352(9138):1426-32
3. Sulikowski/McHutchison EASL 2008. 4. Poordad F et al. NEJM 2011. McHutchison JG NEJM 2009

5, Rao H, et al.. J. Gastroenterol. Hepatol. 2014; 29: 545-553

精准检测是DAA时代抗HCV治疗的基石

方法	HCV诊断	治疗前评估	治疗期监测	治疗后随访
抗-HCV	√ 初诊	√		√
HCV RNA 定量检测	√ 确诊	√	√ 1	√ 2
HCV 基因分型		√		
肝脏疾病的相关指标		√	√ 3	

1, 在开始治疗以及第4、12、24周采用监测血清HCV RNA水平, 有助于监测疗效, 并指导疗程决策。

2, 治疗24周结束后, 采用监测血清HCV RNA水平, 预防病毒学复发和突破。

HCV RNA定量检测的临床意义

—抗病毒治疗重要指征

病毒学反应		定义
RVR		治疗4周时, HCV RNA 转阴 (低于检测低限)
EVR	cEVR (完全EVR)	治疗4周时, HCV RNA 阳性 但12周时转阴 (低于检测低限)
	pEVR (部分EVR)	治疗12周时, HCV RNA 阳性 但相对于治疗前基线下降 $\geq 2 \log_{10}$
非EVR		治疗12周时, HCV RNA 下降 $< 2 \log_{10}$ 值
SVR		治疗结束后24周, 未检测到HCV RNA (低于检测低限)

RVR (快速病毒学应答)、EVR (早期病毒学应答)、SVR(持续性病毒学应答)

4, CFDA技术要求, 建议最低检测限不高于30IU/ml

国家食品药品监督管理总局

通告

2015年 第3号

关于发布乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查等4项指导原则的通告

乙型肝炎病毒DNA定量/HCV RNA定量检测试剂注册申报资料技术指导原则

CFDA 国家食品药品监督管理总局
China Food and Drug Administration

国家食品药品监督管理总局关于发布丙型肝炎病毒核糖核酸测定试剂等4个医疗器械技术审查指导原则的通告（2015年第93号）

2015年11月26日

为加强医疗器械产品注册工作的监督和指导,进一步提高注册审查质量,国家食品药品监督管理总局组织制定了丙型肝炎病毒核糖核酸测定试剂、过敏原特异性IgE抗体检测试剂、人乳头瘤病毒(HPV)核酸检测及基因分型试剂、全自动化学发光免疫分析仪等4个医疗器械技术审查指导原则(见附件),现予发布。

- 不建议采用煮沸法进行核酸提取
- HBV DNA最低检测限应 ≤ 30 IU/ml
- HCV RNA最低检测限应 ≤ 50 IU/ml
- 内标全程监控核酸提取和扩增

常见检验方法灵敏度及其临床用途

方法	灵敏度	用途	
免疫扩散	500 ng/ml	初步定性	
凝集反应	10 ~ 100 ng/ml	初筛	
金标试纸	5 ~ 10 ng/ml	初筛	
放射免疫分析法	0.1 ~ 1 ng/ml	筛查	
酶联免疫吸附测定	0.1 ~ 1 ng/ml	筛查	
化学发光分析	0.01 ~ 0.05 ng/m	细筛+疗效观察	
基因检测技术	qPCR	500 ~ 1000 IU/ml	细筛+疗效观察
	磁珠PCR	5 ~ 30 IU/ml	用药指导
	dPCR	<1 IU/ml	绝对定量
	ARMS	1 % (突变)	个体化治疗
	基因测序	20 ~ 30 % (突变)	个体化治疗

基于临床血浆样本的DNA浓度，选择人类EGFR外显子20 *T790M* 突变3000拷贝野生型DNA为背景，对阳性突变拷贝数分别为1、2、3、4、5、9拷贝的6种标准品进行检测。

由表可看出，在3000拷贝野生型DNA核酸浓度下，对含有2个拷贝以上的标准品均可以稳定检出。

标准品	T790M		
	阳性点	判读结果	检出率
9拷贝	11	阳性	3/3
	5	阳性	
	6	阳性	
5拷贝	10	阳性	3/3
	6	阳性	
	4	阳性	
4拷贝	10	阳性	3/3
	3	阳性	
	5	阳性	
3拷贝	2	阳性	3/3
	4	阳性	
	2	阳性	
2拷贝	2	阳性	3/3
	6	阳性	
	3	阳性	
1拷贝	2	阳性	1/3
	1	阴性	
	1	阴性	

“性能验证”（“verification”）定义

- 术语：**validation**（确认），**verification**（验证）
- “**verification**”：broadly as “confirmation through the provision of objective evidence, that specified requirements have been fulfilled”.
（**广义为通过提供客观证据证明特定的要求得到满足**）
- CLIA uses the term “**verification**”：specifically to relate to confirmation that the laboratory using a test can **replicate** the manufacturer’s performance **claims** when the test is used according to the package insert. （**CLIA使用的性能验证术语：特指使用某种检测方法的实验室按照所提供的试剂盒或检测系统说明书使用时，能复现生产厂家所宣称的检测性能。**）

5 实验前准备

样本最好来自患者真实样本，尽量与厂家建立性能指标时所用材料一致。当一份样本需进行多次试验时，对样本进行分装保存，避免反复冻融。

5.1 实验操作人员应熟悉方法原理与操作，包括样本处理、校准、维护程序、质量控制，确保**检测系统工作状态**正常。

5.2 实验室**设施及环境**符合分析系统工作要求。

5.3 仪器经过**校准**，各项性能指标合格。

5.4 试剂和校准品满足要求。

5.5 负责实施性能验证的人员应了解验证方案，制定验证计划，并组织实施。

5.6 涉及病理**形态学**的样本（如组织、细胞学样本等），需经符合资质的病理医师于显微镜下确认符合相应要求后才可进行后续检测。需要时,可行肿瘤细胞富集。

5.7 若涉及**核酸提取**，应使用试剂盒配套或推荐的核酸提取试剂，并确保其提取效率满足要求。核酸提取效率的评价宜包括：**核酸浓度、纯度及完整性**。

6 性能验证要求

在常规应用前，应由实验室对未加修改而使用的已确认的检验程序进行独立验证。已确认的检验程序是经国家卫生管理部门批准的体外诊断医疗器械使用说明书中规定的程序，或国际公认标准或指南中规定的程序，或国家、地区法规中规定的程序。

注：如果程序中含有与检验程序不适用的仪器、样本类型、检验方法（包括核酸提取方法）或分析软件的，则不属于已确认的检验程序。

6.1 定性项目的性能验证

6.1.1 方法符合率

6.1.1.1 验证要求

通过与参比方法进行比较。参比方法包括但不限于：金标准方法、行业公认方法、经验证性能符合要求满足临床预期用途的方法（如：通过ISO15189认可实验室使用的相同检测方法）。

6.1.1.2 验证方案

a) 样本：选取阴性样本至少5例、阳性样本（宜包含弱阳性/低扩增的样本），一般不少于10例样本。

注1：罕见或少见病种的项目，可酌情减少样本例数。

注2：若弱阳性/低扩增样本不好获取，可用适当稀释阳性样本获得类似的效果。

注3：对于杂交检测技术，若弱阳性/低扩增样本不好获取，可用不同比例的特定细胞系混合获得类似的效果。阴性样本中应包含与检测对象核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状的样本。

b) 验证方法：按照患者样本检测程序，采用参比方法和候选方法平行检测。将所有检测结果按下表汇总填表，计算符合率。

表：方法符合率验证

		参比方法		总数
		阳性	阴性	
候选方法	阳性	a	b	a+b
	阴性	c	d	c+d
总数		a+c	b+d	a+b+c+d

$$\text{阳性符合率} = a / (a+c) \times 100\%$$

$$\text{阴性符合率} = d / (b+d) \times 100\%$$

$$\text{总符合率} = (a+d) / (a+b+c+d) \times 100\%$$

6.1.1.3 判断标准

参见 4.3。

6.1.2 检出限

6.1.2.1 验证要求

所用检验程序在厂家试剂使用说明书等有声明检出限时，检测项目在有标准物质时，或以定量形式表达定性结果时，应进行检出限的验证。

6.1.2.2 验证方案

a) 样本：定值标准物质（如：国际参考品、国家参考品、厂家参考品）。对于报告具体基因型的方法，其选用的标准物质需包括所有的突变类型。对于检测对象同时含有不同比例的不同基因型时，应设置多个梯度，主要从扩增反应终体系总核酸浓度和突变序列所占比例两个方面进行评价。

b) 验证方法：使用定值标准物质的样本梯度稀释至厂家声明的检出限浓度，可重复测定5次或在不同批内对该浓度样本进行20次重复测定（如测定5天，每天测定4份样本）。稀释液可根据情况选用厂家提供的稀释液或阴性血清，该阴性血清除被验证的目标物必须阴性外，所含干扰物质浓度必须在厂家声明的范围之内。

6.1.2.3 判断标准

如果是5次重复检测，必须100%检出靶核酸；如果是20次检测，必须检出至少18次靶核酸。

示例1：NGS和Sanger测序 对于基因变异类型（如：SNV，indel，CNV，SV）的检测，均应分别进行检测限的验证，以确定不同变异类型各自的检测限。建议使用已知突变丰度的包含所有待检测变异类型的经过福尔马林固定石蜡包埋的细胞系混合物或临床样本，将其稀释至厂家声明的检出限浓度，以及高于和低于该浓度一个梯度浓度，按照厂家声明的测序深度对该系列浓度样本进行测定（样本总数不得少于5个，每个样本检测浓度不得少于3个），如果 $\geq 95\%$ 检出限浓度以上的样本检测到可靠变异，则检出限验证通过。

示例2：杂交 使用经合格病理医师评估的接近最低检测限的按照一定比例混合的细胞系沉降制片/或组织切片，在不同批内对样本进行测定（如连续测定5天，每天测定4份样本），如果90%以上样本符合细胞系特性或与中心参考实验室结果相同（必要时可原片复核或进行数字切片转化），则测定下限验证通过。需说明的是，此方法不适用原位杂交，原位杂交验证见6.1.5。

6.1.3 交叉反应

6.1.3.1 验证要求

应验证与检测对象可能存在交叉反应的核酸物质对检测的影响。对于病原体核酸检测来说，主要指与检测对象核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状的病原体核酸，宜在病原体感染的医学决定水平进行验证。对于报告具体基因型的方法，应在待测核酸浓度水平验证其它基因型对待测核酸测定的影响。

6.1.3.2 验证方案

对于病原体核酸检测，取一定浓度与待测核酸可能存在交叉反应的病原体加入样本保存液或经确认为阴性的样本中，与常规样本一样处理，至少重复检测3次；对于基因型检测，取一定浓度经其它方法（如测序等）确认为其它基因型的样本，与常规样本一样处理，至少重复检测3次。

6.1.3.3 判断标准

结果应为阴性。

6.1.4 抗干扰能力

6.1.4.1 验证要求

分子诊断常见的干扰物质主要包括血红蛋白、甘油三酯、胆红素、免疫球蛋白G、类风湿因子和药物等。实验室可根据临床需求、厂家声明和样本特点（实际可能存在的干扰物质及达到的浓度）选择需要验证的干扰物质及浓度。需要时，也应评估抗凝剂和样本保存液等对结果的影响。

6.1.4.2 验证方案

实验室根据实际情况选择验证方案。

方案1：实验组为在弱阳性样本中加入干扰物质溶液（对照组加入等量的溶剂），使得干扰物质的终浓度与厂家声明的浓度相同，与常规样本一样处理，至少重复测定3次以上。

方案2：选取含待验证的高浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的临床样本作为实验组，选取含低浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的临床样本作为对照组。分别在实验组和对照组中加入弱阳性样本（量小于10%），与常规样本一样处理，每组至少重复检测3次。

6.1.4.3 判断标准

方案1：弱阳性样本检测仍为弱阳性结果，则验证通过。

方案2：如果对照组和实验组结果均为弱阳性，说明在验证浓度下，干扰物质对测定无显著影响。如果对照组结果为弱阳性，实验组结果为阴性，说明在验证浓度下，干扰物质对测定有显著影响。

6.1.5 原位杂交技术分析敏感性和特异性

6.1.5.1 验证要求

至少200个与探针特定对应的基因组目标序列应被用来进行分析敏感性和特异性验证。

6.1.5.2 验证方案

样本至少来自5个不同个体，至少50个（用于验证远离着丝粒的探针）或100个（用于验证近着丝粒探针）含有与探针相对应的基因组目标序列的肿瘤细胞进行原位杂交检测。

6.1.5.3 判断标准

敏感性和特异性均不低于90%。

6.2 定量项目性能验证

分子诊断定量检测项目的性能验证
请参见CNAS-GL037 《临床化学定量检验程序性能验证指南》。

感染性疾病核酸**定量**检测方法的性能验证

目前进行感染性疾病定量分子诊断常见的病原体包括乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等。

定量检测项目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。

1、精密度 (1)

验证要求

应同时验证重复性和中间精密度。用于精密度验证的样本应具有很好的稳定性和均一性。样本浓度至少含两个浓度水平，应尽可能与厂家精密度评价时所用样本浓度一致，宜确定医学决定水平处的精密度。

验证方案

方案1：样本每个浓度测定的最低要求是每批测3次，测定5天。获得的数据按照《WS/T 420-2013 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》或《WS/T 492-2016 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》或EP15-A2的要求进行分析，使用浓度对数值计算重复性和中间精密度，并与厂家声明比较。

1、精密度 (2)

方案2:

重复性：每个浓度样本批内重复测定20次，使用浓度对数值计算不同浓度时的测量精密度；

中间精密度：每个浓度样本连续测定20天，每天测定1次，使用浓度对数值计算不同浓度时的测量精密度。

方案3：来源：YYT 1182-2010 核酸扩增检测用试剂(盒)

重复性：每个浓度样本批内重复测定10次，使用浓度对数值计算不同浓度时的测量精密度；

中间精密度：每个浓度样本连续测定10天，每天测定1次，使用浓度对数值计算不同浓度时的测量精密度。

可接受标准

如果实验室测定的重复性和中间精密度小于厂家声明，则通过精密度验证。

2、正确度 (1)

对测量正确度的评价，首选方法是分析定值参考物质，其次选择使用正确度验证PT数据、方法比对等。

2.1 分析定值参考物质

2.1.1 验证要求

推荐的参考物质为具有互换性的有证参考物质及具有溯源性及互换性的正确度验证物质。参考物质至少选择2个浓度水平，至少其中一个水平为医学决定水平。

2.1.2 验证方案

方案1:根据厂家说明制备参考物质，在3d-5d内每批进行2次测定，按照《WS/T 492-2016 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》方法计算均值、标准差和置信区间，并与参考物质的数值进行比较。

方案2:根据厂家说明制备参考物质，在3d-5d内每批进行2次测定，计算均值，并与参考物质的数值进行比较。

2、正确度 (2)

2.1.3 可接受标准

方案1：如果参考物质实测数值落在置信区间内，则正确度验证通过。

方案2：（1）如果实测均值对数值落在参考物质数值对数 ± 0.4 范围内，则正确度验证通过。（2）如果实测均值对数值落在参考物质允许浓度范围内，则正确度验证通过。

2.2 方法比对

在无法获得参考物质时，可使用患者样本与其他检验方法/试剂盒进行比对验证正确度。

2.2.1 验证要求

使用患者样本进行正确度验证时使用的比较方法首选参考方法，参考方法不易获得时，可选择已得到临床验证的常规方法。如果是更新试剂盒，则应与现在使用的试剂盒进行比较。

2、正确度 (3)

2.2.2 验证方案

方案1：在3d - 4d内使用试验方法和比对方法测定至少20份患者样本，样本浓度水平应覆盖检测方法的报告范围。按照《WS/T 492-2016 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》的方法进行配对t检验，确定两种方法间的平均差值以及差值的标准差，计算置信区间和（或）验证限，将测量的差值与厂家声明进行比较。

2、正确度 (4)

2.2.2 验证方案

方案2: 在3d - 4d内使用试验方法和比对方法测定至少20份患者样本，样本浓度水平应覆盖检测方法的报告范围。按照配对t检验计算t值，与临界值 t_{α} ($\alpha = 0.05$) 比较。

2.2.3 可接受标准

方案1: 如果实验计算的差值在厂家声明差值的验证限内，说明试验方法与对照方法的差异与厂家声明一致。

方案2: 如果t值小于临界值 t_{α} ，试验方法和比对方法无显著差异。

3、线性区间（1）

3.1 验证要求

所用标本应尽可能与所测标本相似，不含有说明书上指出的干扰，患者标本是进行线性试验理想的标本。可通过高、低浓度的标本来配制进行线性试验所需的不同浓度标本，高、低浓度值应在厂家声明的线性范围上下限附近。若不易获得高浓度标本，可通过向患者标本中添加测定物（加入量小于总体积10%）获得；若不易获得低浓度标本，可通过已验证不含被测物的患者标本稀释患者标本获得。

3、线性区间 (2)

3.2 验证方案

使用高、低浓度的标本配制进行线性试验所需的不同浓度标本，应至少配制5种不同浓度（含高、低浓度样本）。各浓度（取对数值）间间距宜基本相等。应在一批内完成各浓度标本检测，每份标本至少测定2次。以稀释度为横轴，每个稀释度的测量值均值为纵轴做线性回归图。肉眼观察有无离群值，计算线性回归方程式 $y=ax+b$ 和相关系数 r ，计算各浓度的理论值与实测值对数值的差值。

3、线性区间（3）

3.3 可接受标准

如果 r 不低于厂家声明（厂家无声明时， r 值应 ≥ 0.98 ），且各浓度的理论值与实测值对数值的差值 $\leq \pm 0.4$ ，则通过线性范围验证。如果 r 值低于厂家声明（厂家无声明时， r 值 < 0.98 ）或某浓度的理论值与实测值对数值的差值 $> \pm 0.4$ 时，判定为未通过线性范围（区间）验证。

4、可报告区间（1）

4.1 验证要求

只有经验证的线性范围上限不能满足临床需求时，才进行可报告范围验证。可报告范围验证的基础是已完成线性范围验证。

4.2 验证方案

选择在线性范围内高值标本，用试剂盒配套或指定的稀释液分别做10、100和1000倍等倍比稀释，稀释后的理论值不应低于定量检测下限，每份标本至少测定2次取平均值，计算各稀释度的理论值与实测值对数值的差值。

4、可报告区间 (2)

4.3 可接受标准

如果某稀释度的理论值与实测值对数的差值 $\leq \pm 0.4$ ，表明在此稀释度下结果可靠。可报告范围上限为线性范围的上限值乘以能保证结果可靠的最大稀释倍数，下限为线性范围下限。

案例：可报告范围验证

实验方案：将高于浓度的样本（ $4.61\text{E}+08$ ）进行10倍梯度稀释至线性范围内，对高于浓度的样本和稀释后的样本进行同批次检测，每个浓度检测三次，计算稀释后各浓度点的CV值。

结果判断：以CV值 $\leq 5\%$ 的最大稀释倍数乘以原始样品的浓度为可报告范围。

案例：可报告范围验证

实验方案：将高于浓度的样本（ $4.61E+08$ ）进行10倍梯度稀释至线性范围内，对高于浓度的样本和稀释后的样本进行同批次检测，每个浓度检测三次，计算稀释后各浓度点的CV值。

结果判断：以CV值 $\leq 5\%$ 的最大稀释倍数乘以原始样品的浓度为可报告范围。

可报告范围验证结果：可报告范围可达 $4.61E+14$ 。

5、抗干扰能力（1）

5.1 验证要求

应验证与检测对象可能存在交叉反应的病原体对检测的影响，这类病原体主要是与检测对象核酸序列具有同源性、易引起相同或相似的临床症状的病原体。

应验证说明书中涉及的干扰物质对测定的影响。这些干扰物质主要包括血红蛋白、甘油三酯、胆红素、免疫球蛋白G、类风湿因子、抗核抗体和药物等。

需要时，也应评估抗凝剂和标本保存液等对结果的影响。宜在病原体感染的医学决定水平进行验证。

5、抗干扰能力（2）

宜在病原体感染的医学决定水平进行验证。乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸检测必须验证的干扰物质有血红蛋白、甘油三酯、胆红素、免疫球蛋白G（来源：《乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则》要求必须验证的干扰物质）；丙型肝炎病毒脱氧核糖核酸检测必须验证的干扰物质有血红蛋白、甘油三酯和胆红素（来源：《丙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则》要求必须验证的干扰物质）。

5、抗干扰能力（3）

5.2 验证方案

5.2.1 可能存在交叉反应的病原体对检测的影响的验证方案
参考病原体定性部分。

5.2.2 干扰物质对测定的影响的验证方案：用相应溶剂溶解干扰物质，配制浓度尽可能为厂家声明浓度的10倍以上。在含一定浓度待测物质的样本中加入干扰物质溶液，使得干扰物质的终浓度与厂家声明的浓度相同，在另一份样本中加入等量的溶剂作为对照。这两份样本分别重复测定2次以上，取平均值，计算其测定值对数的差值。

5、抗干扰能力（4）

5.3 可接受标准

5.3.1 可能存在交叉反应的病原体对检测的影响的可接受标准：全部结果均为阴性。

5.3.2 干扰物质对测定的影响的可接受标准：如果这两份标本测定值对数的差值 $\leq \pm 0.4$ ，说明在厂家声明的浓度下，干扰物质对测定无显著影响。

6.3 特定性能验证

对于商品化的诊断试剂，一般情况下不需要验证核酸提取效率。在样本来源有限、样本组成复杂、目的基因在样本中含量低或怀疑提取试剂有质量问题时需要进行核酸提取效率验证。如果怀疑PCR扩增系统有问题，则应进行扩增效率验证。对于NGS，为保证结果的可靠性，避免因测序深度过低导致的结果假阴性或测序深度太高引起的假阳性，应进行测序深度参考区间、上机测序的性能和数据分析系统的性能验证。

6.3.1 核酸提取效率

6.3.1.1 验证要求

核酸提取效率包括核酸纯度，核酸提取产率和完整性。

6.3.1.2 验证方案

按照试剂盒要求，提取含有不同浓度待测核酸的样本，核酸浓度宜覆盖厂家声明的可提取的核酸浓度。

a) 核酸纯度：将核酸提取液用分光光度计测定A260/280比值。

b) 核酸提取产率：将含有待测物质的样本平均分成2份，其中一份（A）加入一定体积（小于总体积10%）已知浓度的待测核酸，另一份（B）加入同体积核酸溶解液，按照试剂盒要求提取核酸，分别测定A和B提取的核酸量，按以下公式计算核酸提取得率，重复三次测定，计算平均值。

$$\text{核酸提取产率} = \frac{A - B}{\text{加入的待测核酸量}} \times 100\%$$

c) 核酸完整性：按照试剂盒要求，提取含有不同浓度待测核酸的样本，核酸浓度宜覆盖厂家声明的可提取的核酸浓度，取一定量的核酸提取液进行琼脂糖凝胶电泳，与待测核酸标准物比较。

6.3.1.3 判断标准

a) 核酸纯度：待测物质为 DNA 时，A260/280 比值在 1.7-1.9；待测物质为 RNA 时，A260/280 比值在 1.8-2.0。

b) 核酸提取产率：核酸提取得率应不低于厂家声明或实验室制定的标准。

c) 核酸完整性：在期待核酸分子量相应的位置可观察到清晰或弥散的条带，无明显降解。

6.3.2 扩增效率验证

6.3.2.1 验证要求

扩增效率包括样本和标准品的扩增效率两部分，只有二者扩增效率良好且一致时，定量结果才准确。如果怀疑PCR扩增系统有问题应进行扩增效率验证。

6.3.2.2 验证方案

将接近线性范围上限浓度的样本10倍稀释4-6个浓度，最低浓度应在线性范围内或将标准品按照厂家要求处理，然后进行扩增。将浓度对数值作为横轴，对应的Ct值作为纵轴，绘制曲线，计算斜率（K），按以下公式计算扩增效率

$$(E) : E=10^{-1/K}-1$$

6.3.2.3 判断标准

样本和标准品的扩增效率均 $\geq 90\%$ 且 $\leq 110\%$ 。

6.3.3 上机测序的性能验证

6.3.3.1 验证要求

验证所用测序仪是否正常运行和使用，测序仪的各项性能参数是否符合要求，保证测序结果的可靠性。

6.3.3.2 验证方案

建议使用质控品或用参考品DNA制备的文库样本进行上机，记录设备运行结束后的参数，根据性能参数标准评价设备性能是否符合使用要求。

6.3.3.3 判断标准

仪器的各项性能参数在厂家声明的正常范围内则验证通过。

6.3.4 数据分析系统的性能验证

6.3.4.1 验证要求

对所有的检测变异类型进行验证，验证应包括数据分析时所用到的所有硬件和软件系统，涵盖数据分析的所有步骤。

6.3.4.2 验证方案

建议使用已知突变丰度的质控品进行测序分析，应包含所有的检测变异类型，如变异类型包含SNV，分析样本至少应含有同一位点的多个不同点突变的质控品；如变异类型包含indel，则应含有在同一序列上有相近两个indel。

6.3.4.3 判断标准

检测结果符合率均 $\geq 95\%$ 即为验证通过。

参考文献

1. CNAS-CL02: 2012 《医学实验室质量和能力认可准则》
2. CNAS-CL02-A009: 2018 《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》
3. WS/T 505: 2017 《定性测定性能评价指南》
4. YY/T 1182-2010 核酸扩增检测用试剂(盒)
5. CLSI EP12-A2:User Protocols for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition.
6. 中华人民共和国卫生部. 《肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)》. 2015-7-3
7. 中华病理学杂志, 《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识》, 2017年3月第46卷第3期
8. CLSI MM06-A2: Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline- Second Edition.
9. CLSI MM03-A3:Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases-Third Edition.

谢 谢!

zuojunshen@ustc.edu.com