



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

前言

本文件由中国合格评定国家认可委员会（CNAS）制定，是对 CNAS-CL02: 2012《医学实验室质量和能力认可准则》和 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》中有关分子诊断相关检验程序进行性能验证实验所做的具体解释和指导，供医学实验室和评审员参考使用。

本文件为首次发布。

分子诊断检验程序性能验证指南

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。

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≥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（快递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》。

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.