



中华人民共和国国家标准

GB/T 39367—20XX/ISO 17822:2020

代替GB/T 39367.1-2020

体外诊断检测系统 基于核酸扩增的病原微生物检测和鉴定程序 实验室质量指南

In vitro diagnostic test systems — Nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens — Laboratory quality practice guide

(ISO 17822:2020,IDT)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目录

前言.....	3
体外诊断检验系统 基于核酸扩增的病原微生物检测和鉴定程序 实验室质量指南.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 微生物病原体实验室通用要求.....	11
5 病原体核酸扩增检测试剂盒的设计和建立.....	13
6 检测系统的验证或确认.....	17
7 LDT 的设计和建立.....	18
8 实验室实施和使用.....	27
9 结果的报告和解释.....	27
10 质量保证程序.....	28
附录 A （资料性） 样品制备的分析前因素.....	30
附录 B （资料性） 试验的验证和确认.....	37
参考文献.....	38

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》及GB/T 1.2—2020《标准化工作导则 第2部分：以ISO/IEC标准化文件为基础的标准化文件起草规则》标准的规定起草。

本文件代替GB/T 39367.1—2020《体外诊断检验系统 病原微生物检测和鉴定用核酸定性体外检验程序 第1部分：通用要求、术语和定义》。本文件与GB/T 39367.1—2020相比，主要变化如下：

- 原计划的系列标准合并为单个标准
- 增加了医学实验室质量操作指南相关内容

本文件等同采用ISO17822:2020《体外诊断检验系统 基于核酸扩增的病原微生物检测和鉴定程序 实验室质量实践指南》。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本文件起草单位：XXX

本文件主要起草人：XXX

本文件及其代替文件的历次版本发布情况为：

- 2020年首次发布为GB/T 39367.1—2020；
- 本次为第一次修订。

体外诊断检验系统 基于核酸扩增的病原微生物检测和鉴定程序 实验室质量指南

1 范围

本文件描述了基于核酸扩增的微生物病原体检测、鉴定和定量方法，规定了在临床实验室使用过程中相关的质量保证要求。

本文件适用于为医疗、研究或健康相关目的，进行核酸扩增检测(Nucleic acid amplification test, NAAT)方法研发、和/或开展NAAT检测项目的实验室。本文件不适用于制造商体外诊断(In vitro diagnostic, IVD)医疗器械的研发。但是，本文件包含实验室实施和使用过程中，对医疗器械和/或相应过程的性能验证和性能确认。

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。

ISO 15189 医学实验室 质量和能力的要求

ISO 15190 医学实验室 安全要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

准确度 accuracy

测试结果或测量结果与真值间的一致程度。

注1：在实际中，真值用接受参照值代替。

注2：术语“准确度”当用于一组测试或测量结果时，由随机误差分量和系统误差分量即偏倚分量组成。

注3：准确度是正确度和精密度的组合。

[来源：GB/T 3358.2—2009, 3.3.1]

3.2

扩增产物 amplification product

扩增子 amplicon

通过 DNA 扩增技术产生的特定 DNA (3.17) 片段, 如聚合酶链反应 (PCR) (3.34)。

[来源：ISO 13495:2013, 3.3.1]

3.3

分析特异性 analytical specificity

特异性 specificity

测量系统的能力, 用指定的测量程序, 对一个或多个被测量 (3.28) 给出的测量结果互不依赖也不依赖于接受测量的系统中的任何其他量。

注1: 缺乏分析特异性称为分析干扰。

注2: 测量程序的特异性不宜与临床特异性相混淆。

注3: VIM: JCGM 200: 2012^[32]使用术语选择性而不用特异性。

注4: 对于定性和半定量检查程序, 分析特异性取决于获得阴性结果与参考方法获得的阴性结果一致的能力。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.4]

3.4

生物风险 biorisk

可能导致危害的特定不良事件 (在本文件中: 意外感染或未经授权的访问、丢失、盗窃、误用、转移或故意释放) 发生的概率或机会。

[来源: 世卫组织生物风险管理, 实验室生物安保指南, 2006 年 9 月]

3.5

生物安全 biosafety

描述为防止意外暴露于病原体和毒素或其意外释放而实施的遏制原则、技术和实践。

[来源: 世卫组织生物风险管理实验室生物安保指南, 2006 年 9 月]

3.6

生物安保 biosecurity

一套预防措施和行动，以减少有意或无意传播传染性疾病的风险。

注1：生物安保包括防止故意从实验室移走（盗窃）生物材料。

注2：这些预防措施是实验室为防止危险病原体和毒素被恶意使用而实施的体系和实践的组合作，以防止这些生物因子的传播。

3.7

校准 calibration

在规定条件下的一组操作，第一步是确定由测量标准提供的具有相关测量不确定度的量值与相应示值之间的关系，第二步是用此关系根据示值确定测量结果。

[来源：VIM：JCGM 200：2012，2.39]

3.8

有证参考物质 certified reference material；CRM

RM（3.41）以一种或多种指定特性的计量有效程序表征，并附有 RM（3.41）证书，提供规定属性的值、相关不确定度和计量学追溯性声明。

注1：价值的概念包括名义属性或定性属性，如身份或序列。这些属性的不确定性可以表示为概率或置信水平。

注2：RMs（3.41）生产和认证的计量有效程序见GB/T 15000.7^[2]。

注3：ISO/IEC指南99:2007^[12]具有类似定义。

[来源：ISO 指南 30，2.1.2]

3.9

临床性能 clinical performance

<检验医学>体外诊断检验程序产生的特定临床条件或生理状态相关的结果与目标人群和预期使用者一致的能力。

注1：尽管有时被称为诊断性能或临床有效性，但临床性能是全球协调工作组（the Global Harmonization Task Force，GHTF）及其继任者国际医疗器械监管论坛（the International Medical Devices Regulators Forum，IMDRF）认可的协调术语。

注2：临床性能的评估通常依赖于其他类型临床检查的结果来定义“真阳性或真阴性”结果。

[来源：GHTF/SG5/N 6:2012，4.4.2，有修改]

3.10

临床灵敏度 clinical sensitivity

诊断灵敏度 diagnostic sensitivity

<检验医学>体外诊断检验程序可以识别与特定疾病或状态相关的目标标志物存在的能力。

注1：在目标标志物已知存在的样品（3.44）中也定义为阳性百分数。

注2：诊断灵敏度以百分数表达(数值分数乘以100)。以 $100 \times \text{真阳性值数(TP)} / (\text{真阳性值数(TP)} + \text{假阴性值数(FN)})$ 的和来计算,或 $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$ 。此计算基于从每个对象中只取一个样品（3.44）的研究设计。

注3：目标状态由独立于被考察检验程序的标准定义。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.15]

3.11

临床特异性 clinical specificity

诊断特异性 diagnostic specificity

<检验医学>体外诊断检验程序可以识别特定疾病或状态相关的目标标志物不存在的能力。

注1：在目标标志物已知不存在的样品（3.44）中也定义为阴性百分数。

注2：临床特异性以百分数表达(数值分数乘以100)。以 $100 \times \text{真阴性值数(TN)} / (\text{真阴性值数(TN)} + \text{假阳性值数(FP)})$ 的和来计算,或 $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$ 。此计算基于从每个对象中只取出一个样品（3.44）的研究设计。

注3：目标状况由独立于被考察检验程序的标准定义。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.16]

3.12

互补 DNA complementary DNA; cDNA

在逆转录酶存在下合成的与给定的 RNA（3.42）互补的单链 DNA（3.17），作为合成 DNA（3.17）拷贝的模板（3.47）。

3.13

污染 contamination

非预期材料或物质的引入。

3.14

临界值（阳性判断值） cut-off value

用于鉴别样品（3.44），作为判断特定疾病、状态或被测量（3.28）存在或不存在的界限的量值。

注1：定义哪些测量结果报告为阳性，哪些报告为阴性。

注2：接近临界值的测量结果可被认为不确定。

注3：临界值的选择决定检验的临床特异性（3.11）和临床灵敏度（3.10）。

3.15

变性 denaturation

导致核酸双螺旋分离的物理和/或化学处理。

注：DNA（3.17）变性导致双链DNA（3.17）解离为单链DNA（3.17）。

[来源：ISO 21572:2013, 3.1.6, 有修改]

3.16

脱氧核糖核苷三磷酸 deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP

含有脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)和/或脱氧尿苷三磷酸(dUTP)的溶液。

[来源:ISO 22174:2005,3.3.7]

3.17

脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid, DNA

以双链(dsDNA)或单链(ssDNA)形式存在的脱氧核糖核苷酸聚合物。

[来源:ISO 22174:2005,3.1.2]

3.18

PCR 用 DNA 聚合酶 DNA polymerase for PCR

反复催化 DNA（3.17）合成的耐热酶

[来源：ISO 22174:2005, 3.4.17]

3.19

DNA 测序 DNA sequencing

确定 DNA（3.17）分子中核苷酸碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶）的顺序。

注：序列一般从 5' 端开始描述。

3.20

杂交 hybridization

在适当反应条件下互补核酸（3.32）序列特异性结合的过程。

[来源:ISO 22174:2005,3.6.3]

3.21

抑制 inhibition

降低扩增或干扰检测过程，可能导致假阴性结果或质量下降。

3.22

干扰物质 interfering substances

临床标本/样品（3.44）中可改变检查结果的内源性或外源性物质。

[来源：GB/T 43279.1—2023, 3.15, 有修改]

3.23

内部检验 In house assay

实验室自建检测 laboratory developed test, LDT

在一个实验室内设计、制造和使用的一种体外诊断试验。

注：内部检验/LDT在投入使用前需要确认其预期用途。

3.24

线性 linearity

分析方法在一定范围内给出与实验室样品（3.44）中待测目标核酸序列（3.46）数量成比例的仪器响应或结果的能力。

注1：在qPCR的情况下，定量循环（也称为循环阈值或交叉点）与目标核酸序列（3.46）的数量成反比。

注2：术语线性经常与方法的线性范围相联系，是指方法给出与目标核酸序列（3.46）浓度成正比例的响应或结果的能力。

[来源：ISO 16577:2016, 3.92, 有修改]

3.25

检出限 limit of detection, LOD

由给定测量程序得到的测得量值，对于此值，在给定声称物质中存在某成分的误判概率为 α 时，声称不存在该成分的误判概率为 β 。

注1：术语分析灵敏度有时用于表示检出限，但现在不鼓励这种用法。更多信息参见GB/T 29791.1—2013, A.2.7与A.2.8。

注2：在基于核酸的鉴定检验中，检出限为在方法规定的实验条件下稳定地检测出特定量基质内目标微生物的最低的浓度或含量。

注3：在定性分子方法和定量分子方法中，能够稳定检测到的被测量的最低浓度（通常是在常规临床实验室条件下>95%测试的样品（3.44）中和特定类型的样品（3.44）中）。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.14, 有修改]

3. 26

定量限 limit of quantification, LOQ

在方法规定的实验条件下能够稳定地以合理的统计确定性进行测量的,在特定体积中的目标核酸序列(3.46)的最低浓度或质量。

注:通常以信号或测量(真)值表示,该值将产生具有规定变异系数(CV)的估计值。

[来源:ISO 16577:2016, 3.91, 有修改]

3. 27

反应混合液 mastermix

除目标DNA(3.17)和对照外,PCR(3.34)所需的试剂的混合物。

[来源:ISO 22174:2005, 3.4.18]

3. 28

被测量 measurand

拟测量的量。

示例1:由PCR(3.34)测量的目标基因的数量受PCR(3.34)分析的扩增子(3.2)大小和模板(3.47)(~<扩增子大小)片段大小的影响。

示例2:将某个样品(3.44)中的DNA(3.17)变性(3.15)为单链DNA(ssDNA)会影响dPCR的定量,因为两条链相互分开。

注1:被测量的规范要求了解量的种类,包括任何相关成分和所涉及的化学实体。

注2:在VIM第二版和IEC 60050-300:2001中,被测量被定义为“需测量的特定量”。

注3:测量,包括测量系统和测量实施的条件,可能会改变现象、物体或物质,使得被测量的量与定义的被测量不同。在这种情况下,必需进行充分的修正。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007, 2.23, 有修改]

3. 29

阴性(PCR)质控 negative (PCR) control

在没有目标模板(3.47)的情况下进行的反应。

[来源:ISO 22174:2005, 3.5.6]

3. 30

阴性(过程)质控 negative (process) control

所采集标本的无目标病原体的样品(3.44),该样品贯穿分析过程的所有阶段。

注：基于核酸的检验过程通常包括样品（3.44）制备、富集、核酸（3.32）提取和靶扩增。

[来源：ISO 22174:2005, 3.5.2, 有修改]

3.31

无模板对照 no template control, NTC

包含除核酸（3.32）模板（3.47）外所有试剂的对照反应。

注：该对照用于证明无核酸（3.32）污染。例如，无模板对照是在反应中加入相应体积的无核酸水来代替模板（3.47）DNA（3.17）进行反应。有时也使用“PCR（3.34）试剂对照”一词。

[来源：GB/T 42077—2022, 3.20]

3.32

核酸 nucleic acid

作为遗传信息或信息表达媒介的大分子。

注：核酸有DNA（3.17）和RNA（3.42）两种类型。

[来源：ISO 22174:2005, 3.1.1]

3.33

核酸提取 nucleic acid extraction

从生物物质材料中分离出核酸（3.32）。

注：通常用于对核酸（3.32）进行扩增和分析。

3.34

聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR

体外扩增 DNA（3.17）的酶促反应程序。

[来源：ISO 22174:2005, 3.4.1]

3.35

多项式回归 polynomial regression

使用不同阶次多项式的最小二乘回归。

$Y=a+b_1X$ （一阶多项式或线性拟合）

$Y=a+b_1X+b_2X_2$ （二阶多项式），及

$Y=a+b_1X+b_2X_2+b_3X_3$ （三阶多项式）

3.36

PCR 质量级 DNA PCR-quality DNA

具有足够长度、纯度和数量的，用于进行 PCR (3.34) 反应的 DNA (3.17) 模板 (3.47)。

[来源：ISO 24276:2006, 3.2.3]

3.37

监管机构批准的试剂盒 regulatory body approved assay

由制造商设计和开发并由监管机构批准用于诊断目的的体外诊断产品。

3.38

逆转录 reverse transcription, RT

在一系列合适的条件下，利用与一条或多条寡核苷酸引物结合逆转录酶的酶活性从 RNA (3.42) 模板 (3.47) 合成 DNA (3.17) 的过程。

[来源：ISO 16577:2016, 3.180]

3.39

修改的 IVD 试剂盒 modified IVD labeled assays

修改的 IVD 诊断产品 modified IVD labeled tests

由制造商设计和开发并经监管机构批准的，或满足用于诊断目的适用相关要求的体外诊断产品，但在实验室使用时这些体外诊断产品已发生更改。

注：根据对原始试剂盒所做的更改的水平，对该试剂盒需要再次确认。

3.40

实时荧光 PCR real time PCR

在同一反应容器中结合 PCR (3.34) 和荧光探针检测扩增产物的方法。

3.41

参考物质 reference material, RM

一种或多种指定特性足够均匀和稳定，在测量过程中已被证明适合其预期用途的物质。

注1：RM是一个通用术语。

注2：特性可能是定量或定性的，例如物质或物种的特性。

注3：用途可以包括测量系统的校准 (3.7)、测量程序的评估、为其他物质赋值以及质量控制。

注4: ISO/IEC指南99: 2007^[12]具有类似的定义(5.13), 但将术语“测量”限制为适用于定量值。然而, ISO/IEC指南99:2007, 5.13 (VIM; JCGM 200: 2012^[32])的注3特别包括定性特性, 称为“名义特性”。

[来源: ISO 指南 30]

3. 42

核糖核酸 RNA, ribonucleic acid

以双链或单链的形式存在的核糖核苷酸聚合物。

[来源: ISO 22174:2005, 3.1.3]

3. 43

稳健性 robustness

尽管条件略有变化, 但分析仍能以最佳方式进行的能力。

注: 通常指尽管 PCR (3. 34) 反应条件 (例如 DNA (3. 17) 浓度) 发生略微变化, 但仍有扩增发生。

3. 44

样品 sample

取自某个总体或某个批次的小部分或少量, 理想情况下是整体的代表性选择。

[来源: ISO 16577:2016, 3.185]

3. 45

序列数据库 sequence database

<生物信息学>由核酸 (3. 32) 序列、蛋白质序列或其他聚合物序列及相关注释组成的生物数据库。

注1: 注释可能与有机体、物种、功能、与特定疾病相关的突变、功能或结构特征、参考文献等有关。

注2: 已发表的基因组序列可以公开获得, 因为每个科学期刊都要求任何已发表的 DNA (3. 17)、RNA (3. 42) 或蛋白质序列必须存储在公共数据库中。

3. 46

目标序列 target sequence

目标核酸序列 nucleic acid target sequence

靶向检测的特定 DNA (3. 17) 序列, 例如通过 PCR (3. 34)。

[来源: ISO 16577:2016, 3.203]

3. 47

模板 template

指定新合成的 DNA (3.17) 或 RNA (3.42) 链的碱基序列的 DNA 或 RNA 链，这两条链互补。

[来源：ISO 16577:2016, 3.206]

3.48

单向工作流 unidirectional work flow**正向工作流程 forward work flow**

<检验医学>物料/样品处理的原则，用于确保原始样品 (3.44)、处理过的样品(包括扩增后的 DNA (3.17)) 在整个检验程序中保持物理隔离。

[来源：ISO 24276:2006, 3.3.5，有修改]。

3.49

确认 validation

通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。

注1：术语“已确认”用于表明相应的状态。

注2：改编自GB/T 19000—2016^[3]。

[来源：GB/T 22576.1—2018, 3.26]

3.50

验证 verification

通过提供客观证据对规定要求已得到满足的认定。

注1：术语“已验证”用于表明相应的状态。

注2：认定可能包括下述活动，如：

- 变换方法进行计算；
- 将新设计规范与已证实的类似设计规范进行比较；
- 进行测试和演示；
- 文件发布前进行评审。

注3：更多信息参见附录B。

[来源：GB/T 19000—2016]

4 微生物病原体实验室通用要求

4.1 实验室风险管理和生物安全通用要求

医学实验室应确保实验室员工和服务人员的安全和防护。ISO 15190的要求适用。由于许多微生物具有致病性，应采用适当的生物安全标准。

医学实验室应对基于核酸的检验过程进行评估，以识别故障模式、操作错误、危险和危险状况等相关风险。应在检验项目开发前和开发过程中对患者和实验室工作人员的相关风险进行识别。应在检验活动实施前和实施过程中，以及在其运行的生命周期内经常性的评估、监控和降低相关风险。

注1：医学实验室也适用于ISO 35001^[19]。

注2：WHO生物安全手册也可能适用，WHO/CDS/EPR/2006.6^[33]。

注3：通用原则和风险管理实践（如8所述）也适用于医学实验室。

注4：关于减少实验室误差的通用指南，参见ISO 22367^[9]。

注5：关于基于风险管理原则的质量控制计划的信息，参见CLSI EP23^[23]。

4.2 病原体检测的通用实验室设置

核酸扩增检测实验室设置应遵循最佳实践的通用要求，通常包括扩增前和扩增后的物理分区，以及各实验流程的区域化。在进行适当的风险评估时，应充分考虑病原体的因素。

值得注意的是，样品处理的风险水平高于提取的核酸。因此，较高风险类别的病原体样本通常需要处理为较低风险类别的核酸，然后进行核酸扩增检测。但是，不能由此认为提取程序可保证样品无传染性，仍然需要进行相关安全风险评估。

为提高生物安全性，病原体灭活宜尽早进行。但是，需要对灭活方法的有效性进行确认，适当的风险和安全程序仍然是必要的。

管理和减少污染的通用实验室设置。

污染源可分为五类，实验室的设置宜尽量减少每个潜在来源的污染风险。

a) 环境

来源于实验室外。病原体检测通常不存在问题，虽然密切相关的环境物种可能导致污染风险，该情况下宜使用正压实验室。

有关单向工作流和气压条件的详细信息，参见 7.2.2。

b) 实验室

主要污染源是由实验室大量核酸制备造成的。当使用核酸扩增检测时，这是一个典型的问题，因为其可产生大量靶标（扩增产物）；这是所有核酸扩增检测污染的主要来源。实验室污染来源也可以来自使用包含目标序列的载体。在病原体检测中，它也可能来源于目标病原体的微生物培养物。通过将样品制备和检测系统与可能产生大量核酸的其他实验室活动分隔开来，可降低污染风险。宜通过使用专用实验设备和工作服来减少进一步的污染风险。

c) 试剂

事实上许多核酸扩增检测试剂来源于重组表达，因此可能存在低水平的细菌 DNA。当靶向直系同源基因，如 16S 核糖体 RNA 基因时，将引起较大的问题。

d) 分析人员

由于分析人员通常不携带病原体，所以一般不是病原体特异性核酸扩增检测的主要污染源。但是某些病原体（或密切相关的物种）可引起无症状感染，因此也是潜在的污染风险。标准实验室程序（如使用防护服、手套、滤芯吸头等）可降低污染风险。

e) 样品

通常是未被识别的潜在主要污染源。当高浓度病原体样品在低浓度或阴性样品旁制备时，可能发生交叉污染。标准实验室程序（如使用滤芯吸头）可降低污染风险。

应编写、实施标准操作程序（standard operating procedures, SOP）并对员工进行培训，以降低污染风险。这可能包括限制人员走向和遵守从扩增产物阴性区域到扩增产物阳性区域的正向工作流，和/或使用一次性实验服或其他防护服。该做法可能不适用于核酸提取、扩增和检测自动化的单一工作流程封闭系统。

最终应以适当的方式监测污染，以确定其对检测结果的影响。实验室人员、保洁和所有其他进入实验室的人员应接受培训，并将培训形成记录。

更多信息参见第5章

4.3 商用设备（含软件程序）

对于核酸扩增检测的设备，包括分析所需的软件程序，应按照制造商的使用说明和实验室程序文件进行安装、验证、校准和维护。

在适用的情况下，应对实验室仪器与现有IT基础设施的整合情况进行验证。

示例：与数据库、生物信息功能等的可链接性。

如果同一核酸检测项目可能使用多台仪器，则应进行仪器间比较，以确保结果的可比性。实验室应验证实验室开发的仪器组件之间的接口，还应验证制造商开发的仪器组件之间的接口。

4.4 实验室人员

指定进行核酸扩增检测的人员应具备资格并接受培训，达到特定核酸扩增检测和病原体操作所需的能力水平，包括接受继续教育以维持能力。

人员的资格和培训应形成记录。

5 病原体核酸扩增检测试剂盒的设计和建立

一般情况下，设计的相关准则应列入设计计划中。

设计和建立的计划应包括：

- a) 用户需求和利益相关者要求的定义；
- b) 预期医疗用途的定义；
- c) 性能要求和规范以及基于预期用途的其他设计要求和规范；
- d) 产品风险评估；

- e) 试剂盒设计和试剂盒组分供应商资格,宜包括但不限于:标本采集与处理、核酸提取、核酸扩增、目标微生物病原体核酸的检测与鉴定、实验室设计、工作流程和实验室实践;
- f) 可行性阶段的实施;
- g) 验证和确认方案;
- h) 性能指标的验证;

示例:检出限、阳性判断值(cut-off值)、分析特异性(包括交叉反应性和干扰物质)、精密度、交叉污染、线性,以及在适当情况下,校准品互通性以及检测结果对参考物质或参考测量程序的溯源性。

- i) 实验室规模化生产流程的设计
- j) 预期用途确认
- k) 试剂研发过程中和建立后的设计变更应进行记录。

病原体特定的考虑项宜包括但不限于:病原体的基因、包括物种内和跨物种的序列异质性、“种下单元”(operational taxonomic unit, OTU)、密切相关物种的特异性、抗性基因的遗传关联等。例如:

- 使用多重 Panel (如呼吸道多重 Panel);
- 如使用的多重 Panel 不用于病原体的鉴别,考虑项可包括潜伏期、携带、参考区间等。

5.1 质控品

5.1.1 质控品的检查

为了获得可靠的数据和检测结果,选择和使用合适的质量控制和质控品至关重要。

实验室在进行性能验证或者性能确认之前,应先明确质控品的要求和规范。质控品的使用频率可根据性能验证或者性能确认结果的检测性能特征来确定。

在适当的情况下,实验室应使用质控品(例如,能够评估核酸提取过程有效性的质控品)进行检测,减少由于整体或部分检测程序的性能不足而产生错误结果的可能性。特别是质量保证程序的设计应尽量减少假阳性和假阴性结果的产生。

核酸扩增检测方法的内参/抑制物对照可以是外源性的同源内参/对照、外源性的非同源内参/对照、内源性的非同源内参/对照。如果在标本制备前加入,内参也可以作为全过程的对照。

核酸扩增检测的两个主要阶段需要进行质量控制,以避免可能的检测失败:(1)从样品采集到提取核酸的整个前处理流程(2)核酸扩增和检测在内的过程。核酸扩增检测应包含正确的质控措施,以确保所生成数据的整体质量和可靠性。

注:GB/T 42077—2022, 4.4^[7]中给出了 qPCR 和 dPCR 质控的总体指南。

对质控品和质控程序选择的理由应进行记录。

a) 阴性质控

阴性质控的目的是在没有预期靶标的情况下进行检测,以评价由方法的非特异性或污染导致的假阳性结果。最简单的阴性质控可以通过无模板反应实现,然而更复杂的阴性质控通常包括样品中可能也存在的核酸,例如人 DNA,以评估检测的特异性。

阴性质控可用于评价整个过程，以提供假阳性来源的进一步信息（例如，样品处理过程中的交叉污染）。在这种情况下，可以使用适当的生物样品或合成替代物（如血液、贮存液），但在用于评估假阳性之前，应证明其不含病原体靶核酸。

其他信息可见 CLSI 文件 MM03^[24]和 MM19-A^[29]。

b) 阳性质控

阳性质控的目的是用于评价假阴性结果和检测的质量，适用于对整个实验过程或单个样品的评价。阳性质控品可以是纯化的核酸、纯化的扩增产物、含有靶核酸序列的载体（例如质粒）和合成核酸（见表 1）。如使用载体或扩增产物，应在其加入 PCR 反应体系之前（见图 1），将其稀释至适当浓度（ $\leq 10^7$ copies/ μ L），以减少高浓度核酸造成污染的可能。

在已经验证的合理稀释度下，含有目标病原体的贮存液可用作阳性质控（如病毒检测）。应选择适合的质控品浓度，以验证检测方法在分析决定水平和临床决定水平的性能。

对于定性程序，阳性质控品（扩增或提取）的浓度宜接近阳性样本中较低的临床病原体载量水平。

对于定量程序，除非标准曲线已经涵盖，否则宜使用接近报告范围上限的强阳性质控和接近检测下限的弱阳性质控。标准曲线可以是系列稀释的病原体基因组核酸或等同物（例如，含有靶向核酸序列的质粒）。但是，这不适用于评价动态范围或校准整个过程。因此，在可能的情况下，建议使用适当基质中连续稀释的完整病原体，以覆盖提取过程的线性动态范围。由于潜在的引物二聚体污染，不宜将扩增产物用于建立标准曲线。

如果质控品由实验室设计和制备（加入靶标的混合样本、内参等），宜制备和保存足够的单管样品以避免反复冻融。对于实验室自制的质控品，需要对其稳定性进行确认。自制的质控品不应在明确的保质期外使用。

在适当的情况下，宜实施全过程对照（例如，能够同时评价分析前/分析中程序（如提取）有效性的对照品）。更多信息见表 1。

提取对照可以是一批含有目标核酸的患者标本，或添加目标病原体的无病原体基质。基质宜与待测样品相同或相似。

内参和抑制物对照（即能够检测到抑制的对照品）应尽可能模拟靶核酸，但不能被靶向病原的试剂检出。抑制物对照通常是可评价分子生物学检测步骤（例如，PCR 和逆转录）的核酸物质。

建议在适当的情况下使用整个病原体作为内参，而不仅是使用核酸。内参宜以已知浓度加到所有待测标本中。

内参宜在产量、完整性和纯度方面具有与提取靶序列相似的特征，且不与靶核酸竞争。其他信息可见 CLSI 文件 MM03^[24]、MM06^[25]和 GB/T 42077—2022^[7]。

表 1 阳性质控和阴性质控的示例

质控类型	质控名称	常见成分	纳入原因
阴性	无模板质控	无模板的水或缓冲液，加入反应混合液中	在 PCR 阶段监测 PCR 扩增造成的污染 检测意外扩增产物，如引物二聚体，这可能与使用 dsDNA 结合染料有关
阴性	提取空白质控	水、缓冲液或基质空白（如适合），与样品同时检	提取阶段监测模板污染

		测	
阴性	逆转录阴性质控	无逆转录酶或加入变性逆转录酶的逆转录反应	监测 DNA 污染（用于 RNA 检测）
阴性	特异性	DNA/RNA 模拟样品，但不包含目标模板	监测假阳性率（例如，检测突变基因时，监测野生型变体造成的假阳性结果）
阳性	定性	明确特征的生物材料或核酸	验证检测性能 扩增后采用溶解曲线分析评价分型检测的特异性
阳性	定量	明确特征的生物材料或核酸	作为定性阳性对照 评价定量检测准确性或用于校准
阳性	内参	加入外源模板的样品	确保不存在假阴性结果 作为单个样品检测过程的对照（如抑制物）或评估整个过程（包括提取），具体取决于模板类型和加入内参的反应阶段

5.1.2 确定目标序列

核酸扩增方法确认和验证的核心在于对核酸序列的选择，一方面包括扩增所用的引物，另一方面也包括了靶标序列。

通常情况下，检测的灵敏度主要取决于引物与基因靶序列结合的效率。同时检测的特异性在很大程度上取决于待扩增的基因区域的选择。

基因靶向区域的选择应根据文件中规定的检测预期用途来确定。

注1：病原体靶序列可以是基因组或载体DNA、信使RNA、核糖体RNA或基因组RNA。

注2：对于广谱的细菌鉴定，通常使用16S rRNA基因和23S rRNA基因，对于真核病原体可使用18S rRNA基因和28S rRNA基因。

对于多重检测试剂盒，每个靶序列之间不宜呈现任何同源性以尽可能减少交叉反应。

如果选择了靶区域，应使用适当的核酸序列数据库评估该序列与其他生物体的同源程度，宜使用多个数据库对序列进行验证。

在选择引物时，除非使用多态性来鉴别病原体，否则宜使用已知目标序列，并避免多态性区域。

引物的设计宜根据所用的分析方法，如PCR、等温扩增技术或其他方法。

宜参考相关指南进行设计，例如，“出版物中实时荧光定量PCR^[35]或数字PCR^[4]方法应提供信息的最低要求”。

5.2 性能验证和性能确认

一般来说，检测可以划分为四大类：

- a) IVD 试剂盒/诊断产品；
- b) 因未满足患者具体需求，实验室进行了修改的 IVD 试剂盒/诊断产品；
- c) 实验室自建的试剂盒/检测（LDT）；
- d) 市场上可购买，仅限研究用（RUO）的检测。

表2描述了对应每一类型检测方法，进行性能确认或性能验证的可能决定。

表 2 性能验证或性能确认的可能决定

分析类型	实验室应如何进行分析？	
	验证	确认
IVD试剂盒/诊断产品	是	否
实验室修改的IVD试剂盒/诊断产品	是	是
实验室自建的试剂盒/检测（LDT）	是	是
市场上可购买，仅限研究用（RUO）的检测	是	是

6 检测系统的验证或确认

附录B给出了进一步的信息。

6.1 性能验证或确认的方法

有两种方式可用来评价方法的检测性能。

第一种方式为进行方法比较的研究，即采用已开发的方法和一个有效的参比方法对标本/样品进行平行检测。

方法比较适用于有效的参比方法已在实验室使用或者可在其它临床实验室使用，并最好使用实验室所在地的患者标本/样品。

第二种方式，如果无法获得患者标本/样品来评价性能特征，尤其是准确度时，可在预期基质中加入已知量值的分析物，测试新试剂盒能否检出。可能有一些研究必须使用真实的患者标本/样品，具体视风险分析情况而定。

添加的标本/样品需要具有明确特征，可能包括标准、质控物、能力验证材料或具有已知或公认值的患者样品。

7 LDT 的设计和建立

7.1 概述

LDT建立的规划阶段应包括设计阶段和可行性测试阶段。在可行性测试阶段，应收集初步性能数据，并通过故障排除和优化流程来确定性能特征，并制定有效的性能确认程序。

在技术层面，实验室宜对方法研发所需的必要设备、试剂、成本以及质控品和参考物质等进行调研，并在试剂设计和性能确认过程中，考虑检测过程所需的时间和开展检测的可行性。

注：当引入IVD试剂盒/诊断试验时，预期的性能指标由制造商声明。验证计划的目标是验证在特定实验室环境中的检测的性能指标。

方法建立过程应包括初始评估（需求、预期用途、试验要求）、设计和开发规划、方法研发、性能验证、性能确认和实验室实施。更多信息参见GB/T 42077—2022^[7]。

7.1.1 确定客户/患者和利益相关者对分析预期用途的需求

实验室应了解当地法规和伦理原则，以维护客户、患者和公众信任关系^[30]。

利益相关者的需求和要求（如监管机构或法律规定）应予以识别和记录。

客户/患者的需求应予以识别和记录。

规定标本收集和处理程序以及接收/拒收标准。

检测的预期用途，包括临床效果，应予以验证。

宜通过考虑以下因素来确定预期用途，包括但不限于：

- a) 检测的目的、益处和用途（如筛查、诊断、预测、监测、确认）；
- b) 目标人群；
- c) 检测结果在患者管理中的应用；
- d) 标本类型；
- e) 收集和处理程序；
- f) 标本接收/拒收标准；

应决定是否继续进行设计和研发规划。

7.1.2 性能验证的一般标准

实验室应验证IVD制造商说明书中描述的IVD诊断产品的关键性能指标，以证明其在本实验室环境下的性能。对于定性检测，应将阳性和阴性结果与参比方法进行比较。对于定量检测，应比较覆盖全部

可报告范围的定量结果（准确度），并进行精密度研究。此外，宜对制造商宣称的检出限/可报告范围和测量不确定度等（如适用）进行验证，如涉及参考区间实验室宜进行验证。更多信息参见附录B。

如果实验室正在开发自建检测（LDT）或修改IVD诊断产品，实验室应进行验证，确定并证明其宣称的如准确性、精密度、分析敏感性、分析特异性（干扰物质的影响）、可报告范围，以及临床适用的参考区间等方面。有关干扰物质的数据可从文献或在其他实验室进行的研究中获得，若条件允许，宜进行验证。

性能验证宜在即将开展临床检测的实验室内完成；如果经过验证的检测方法转移到另外一个实验室开展，新实验室宜确定性能特征未受迁移或任何环境条件变化（温度、湿度等）的影响。

在实验室使用IVD诊断产品进行检测时，应进行性能验证。

根据方法建立的流程，作为实验室质量管理体系的一部分，应对验证程序（如验证计划、验证执行）、数据、结果以及结果不一致的可能解释进行记录。宜关注准确性、精密度和可报告范围，如果符合要求，宜先由实验室主任或指定人员批准该方法可作为诊断试验，再用于患者检测。

7.1.3 检测方法预设性能指标的验证

应分析实验流程中各步骤对结果有效性和可靠性造成的潜在影响和风险。

一般情况下，对可能影响检查结果的诊断工作流程的所有步骤，例如标本采集、运输、保存、预处理、提取、提取后可能需要的保存、以及检测过程如扩增、数据分析、结果报告等，都要进行规定和验证。

风险分析应明确整个实验流程任何步骤中不可控因素的影响。应采取措施降低不可接受的风险。

在验证过程中，宜检查实验室内的数据报告；如果数据从实验室信息系统进一步传输到医院信息系统，宜验证原始样本检测和报告后数据传输的保真性。

检测方法应包括可发现实验流程步骤中错误的适当对照（见5.1）。

性能验证宜采用与实际检测相同的替代基质和临床样本。

可使用适当的无靶标基质（如混合血清样本或粪便悬液）稀释含有明确量值病原体的临床样本，样本中可加入内参。

替代基质宜加入完整病原体和内参。

宜避免污染或引入干扰物质。对潜在污染和/或干扰物质的持续控制宜整合到检测系统中。

对于多重检测，该检测宜在预期用途中的多重感染情况下进行验证，例如几种病原体和/或病原体与对照。

7.1.4 预期用途的确认

根据性能确认计划，实验室应描述并记录与疾病或其他临床背景相关检测的性能特征。

实验室应确定与检测的临床相关性和临床有用性密切相关的性能特征。这些特征应记录为临床性能特征。

为了衡量实验室检测是否以临床相关方式定性和/或定量分析物，在适用时，宜计算阴性预测值和阳性预测值。

注：典型的临床性能特征包括临床（诊断）特异性、临床（诊断）敏感性、测量范围和参考区间。

实验室应对检测方法的预期用途进行确认，并与现有的参比方法（如有）进行比较。如果没有可用的参比方法，实验室应通过适当设计的研究确认预期用途。

实验室应在性能确认报告中明确记录确认结论。

更多信息参见7.4.1.1和附录B。

7.2 核酸扩增检测程序的流程分析

检测结果的可信度在体外诊断领域至关重要，因为其可能对患者产生社会心理、法医及治疗方面的影响。

因此，在本标准中，检测方法的选择或初始试验都应以检测目标微生物是否存在为目的。

典型的核酸扩增检测宜包含以下步骤：

- 样本采集、运输和保存；
- 核酸提取及纯化；
- 扩增（变性、退火、延伸）；
- 检测目标直系同源基因；
- 数据分析和解读。

避免扩增产物的残留污染是在核酸扩增检测的所有步骤中的关键挑战。

7.2.1 分析前工作流程要求

标本采集、运输和保存的要求应在使用说明书中规定，可参考ISO 15189的要求。

注：“分子检测方法标本的采集、运输、制备及保存”指南见CLSI MM13^[27]。

应特别注意样本采集、运输和保存对用于核酸提取的标本存在的可能影响。

示例：标本类型、标本容器、标本可接受性标准、减少核酸降解或污染所致改变的样本处理程序、标本量要求、添加剂要求、运输条件、保存条件、稳定性因素和注意事项。

医学实验室应依据样本采集手册中相应部分的说明，纳入标本采集、运输和保存要求。

核酸扩增检测的标本接收区和录入区宜独立于检测区域。患者样本宜及时处理并妥善保存以尽可能减少核酸的降解。实验室宜只接受指定的样品保存容器。更多信息参见附件A。

多次冻融可破坏样本完整性及降低核酸产量，因此，若未另行规定和验证，宜避免反复冻融。定量检测和低浓度水平检测可能更易受影响^[29]。

对于核酸提取及提取后核酸稳定的条件，实验室应进行规定、验证，并在使用说明书中明确。即使即使在同一条件下，不同样本类型，其稳定性可能不同。因此，每种样本类型的稳定性都需要通过检测来明确。新病原体和不常见的症状通常需要额外的研究来确定最佳样本类型和样本量。更多信息参见附录A和CLSI MM03^[24]。

样本中提取的核酸纯度、完整性和产量应满足预期用途。如果样本中的核酸量不足，应对同一样本重新提取，或再次采集样本以进行提取。

更多信息参见附录A，关于核酸制备和稳定性的更多信息参见ISO 21571^[13]。评估核酸提取效率的方法可见GB/T 42077—2022^{[7][40][41]}。

实验室应按照使用说明书制备和保存提取的核酸，以确保纯度、完整性和稳定性满足检测要求。

7.2.2 分析中工作流程要求

为了降低污染风险，实验室程序至少应包含以下注意事项（如适用）。对于使用独立设备和耗材的实验室工作流程要求，不适用于使用自动化仪器（样本制备、扩增和检测一体）的实验室。

- a) 应按照生物安全水平使用个人防护装备（PPE）（见 EP23-A^[23]、EP18-A2^[22]、ISO 35001^[19]）：宜在特定区域内使用专用实验服（如颜色标记）。实验服宜专人专用，且宜在出入每个区域时更换、定期更换、并考虑特定的清洁要求。实验室也可以使用一次性的实验服。宜对不宜叠放的实验服配备单独的衣架；
实验室人员如从一个实验区到另一个实验区，需更换手套以避免交叉污染。宜使用长袖手套，为防止过敏可使用无粉手套；
操作人员应佩戴护目镜、口罩或防护罩，或当地生物安全法规所要求的其他个人防护装备；
若有需要，宜考虑在不同的房间使用套鞋或可洗的实验室用鞋。
- b) 试剂准备、标本制备及扩增后分析的各区域，应使用专用设备（包括机器人）和适当的耗材，如带滤芯吸头。
- c) 为了减少样本间的交叉污染，如果检测流程需要打开 PCR 反应管，建议在开盖之前对所有样本的 PCR 管先进行瞬时离心。
- d) 宜在非样本组分（如 PCR 反应预混液、dNTPs、引物、缓冲液和酶）配制完成后，在专用区域将样本或核酸提取物加入反应管。（见图 1）
- e) 除了扩增后需进行 PCR 产物分析（如凝胶电泳或 DNA 测序）之外，实验室应保持反应管加盖密封，并应尽可能少的打开管盖。只有当需要的情况下进行开盖，且开盖前对 PCR 反应管进行瞬时离心。
- f) 宜避免在不同工作区域之间移动设备（包含 IT 设备）。易携类物品，如移液器、手套、笔、实验记录本和计时器，是造成污染的来源，应在每一个工作区域内专用，各工作区域的物品不

准许混用。此外，这同样适用于标准操作程序及其他打印和书写材料，如工作表。建议尽量避免各区域间任何样品和检测相关物品的移动，如需要，宜按照单向工作流进行（从低污染区到高污染区）。（见图1）

至少应使用2个单独的房间（若进行巢式PCR可扩展到3个）进行前PCR、后PCR和巢式PCR（如需要）。各工作步骤（用虚线标注）应在专用区域，最好在特定的房间内进行。

试剂和样本制备间/区域不宜共用冰箱和冰柜，以避免将样品和核酸提取物与试剂在同一位置存放。如需共用，宜进行明确的归类管理（如在二级容器中分离），见CLSI MM19A。扩增前及扩增后核酸（如样品和PCR产物）应存放在置于不同区域的单独冰箱或冰柜中，最好存放在各自的房间/区域。

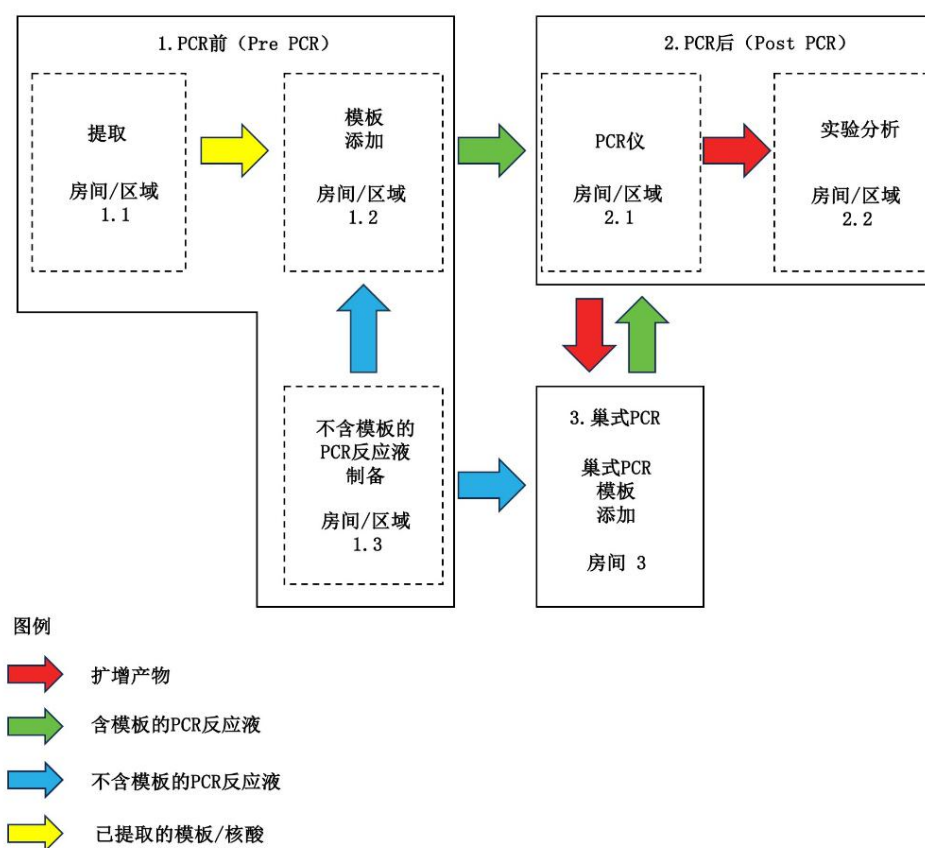


图1 使用独立房间或工作区的单向工作流示例

7.2.3 分析后工作流程要求

工作流程最后的步骤是检测结果的报告和解释。实验室的结果报告可由LIS系统支持，宜采用预设的可编辑的报告模板。

检测报告的要求宜符合法律规范并整合到实验室质量管理系统中，报告的要求应在SOP或实验室手册中予以说明。

7.3 验证和确认的性能特征

7.3.1 检测范围

实验室应仅报告在验证或确认过程中已建立的检测范围内的定量结果。

验证研究中线性范围的确定通常不适用于定性核酸检测方法。然而，线性范围的概念适用于定性报告的半定量检测。

线性范围的下限应与临床应用相关，并且在临床应用中可接受。

若适用，线性范围的上限宜与临床应用相关。

若结果高于线性范围的上限，则标本/样品可用适当的缓冲液或基质稀释。实验室应考虑精密度较差时对线性的影响，并将精密度研究作为线性研究的一部分。

为充分确定定量下限，可以在接近定量下限的低浓度增加额外的重复检测。

更多信息参见附录B。

有关NAAT性能确认更多信息参见GB/T 42077—2022标准和CLSI MM17指南^[28]。

为建立LDTs的线性范围，建议实验室在预期测量范围内对5到10个浓度水平进行研究。

为确定尽可能宽的线性范围，可在同一批中增加预期测量范围以外浓度水平的样品。当预期值和测量值呈现明显的线性关系时，实验室可使用线性回归进行数据分析，但应首选基于对数转换的PCR数据（C_q、C_t和C_p）进行分析。

注1：对数转换包括取每个测量值的对数（通常以10为底数）。

实验室应仅定量报告在线性范围内的结果。NAAT线性范围相关的指南见GB/T 42077—2022标准^[7]。

注2：进行多项式回归分析，以找到充分拟合数据点的多项式函数，并评估线性拟合和二次拟合之间是否存在显著差异。一阶、二阶和三阶多项式回归分析均可能适用。

7.3.2 准确度

诊断准确度的不同衡量标准与诊断程序的不同方面有关：一些衡量标准用于评估鉴别正确性，而另一些衡量标准用于评估其预测能力。诊断准确度的衡量标准不是固定不变的，有些取决于疾病的流行率，而另一些取决于疾病的范围和定义。此外，诊断准确度的衡量与研究的设计极为相关。不严格依照方法学标准的研究通常会高估或低估检测的性能指标，从而影响研究结果的适用性^[37]。

检测程序的准确度表示测量值与理论值或可接受参考值之间的一致性程度。检测结果的一致性程度是由系统误差（偏倚，表示为正确度）和随机误差（表示为测量精密度）造成的。

7.3.2.1 正确度研究

实验室宜在一段时间内检测，以反映典型实验室条件下的检测性能。

正确度研究宜按照研究设计、统计学推荐和ISO 15189标准进行。

对于多重检测，如果日常使用的分析方法均未涵盖多重检测的所有分析物，宜使用多个比较研究。宜为每个分析物以及多重检测选择适当的数据分析方法以确定正确度。

实验室宜选择并检测适当数量的标本。

注：适当的标本数量取决于检测的复杂性和精密度、目标分析物在指定人群中的流行率、参考/比较方法的准确度、用于统计数据分析的方案以及可接受的统计学置信水平和成本。建议标本数量不少于20个，通常可使用40~50个或更多的标本。

理想情况下，准确度部分的验证宜采用临床样品，应选择具有足够数量且有代表性的临床样品类型（如血液、血浆、粪便、体液）。如果在整个分析或报告范围内无法获得这些样品，则可使用适当的无目标分析物基质（如混合血清样品或粪便悬浮液）稀释含有已知量值病原体的临床样品或人造样品，并可以在检测前于样品中添加内参。

为明确检测的正确度，实验室应以图形和统计方式解释获得的数据。

对方法学比较的数据，实验室宜使用线性回归分析的散点图和95%一致性界限的差值图来展示。

7.3.2.2 精密度研究

在适当的情况下，应使用已知分析物浓度的样品进行精密度的研究。应在尽可能接近适当临床标本的基质中选择或制备样品。

用于完成研究的测试材料可以包括标准品、质控品、能力验证样品或足够数量的患者标本。

精密度研究应测试重复性、中间精密度和再现性（如适用）。

重复性是采用相同方法、相同设备和相同操作人员，在相同实验室短时间内对同一物质进行多次重复测量。也被称为“批内精密度（within - batch/run, intra-assay precision）”。

中间精密度是采用相同方法、相同设备和相同操作人员，在相同实验室较长时间内对同一物质进行多次重复测量。

再现性是采用相同方法，不同操作人员和（或）不同设备，在不同实验室对同一物质进行多次重复测量。也被称为“实验室间再现性（inter-laboratory reproducibility）”。

实验室应根据检测的预期用途，确定适当的研究时长和标本数量进行精密度研究。

精密度研究宜按照研究设计、统计学推荐和ISO 15189进行。

实验室宜在精密度研究设计中考虑并纳入可能的重要变异来源，如不同的操作人员、多试剂批次、多台仪器。

定性检测中，精密度研究应提供分析物浓度在接近检出限时不精密度的。

精密度研究设计宜纳入整个动态范围内适当的浓度样品：分别设定为检出限浓度、高于检出限浓度20%，以及低于检出限浓度20%。三个样品重复检测40次。

定量检测中，精密度研究应至少纳入高浓度水平样品、低浓度水平样品和尽可能接近医学决定水平浓度（通常为检出限）样品。通常较高的变异出现在测量范围两端的低浓度和高浓度水平。若三个浓度水平的精密度估计值存在较大差异，则应检测其它浓度，以充分反映检测方法的精密度。

建议精密度研究设计可计算批间和批内变异，二者相结合以计算检测方法的总变异。

精密度应采用不精密度的统计量来表示，如标准差（standard deviation, SD）或变异系数（coefficient of variation, CV）。

注：CV通常用信号值或量值表示，该值将产生具有特定变异系数（CV，计算公式为 $CV = s / \bar{x} \times 100\%$ ，S为检

测结果的标准差、 \bar{x} 为算术平均数）的估计值。

实验室进行数据分析时，应根据文件化的可接受标准对精密度研究结果进行评价。

不精密度通常表示为目标值 $\pm 2SD/3SD$ 或目标值 \pm 某个百分比（如目标值的10%）。一般来说CV不宜超过15%；最低定量限的精密度不宜超过20%。在确定可接受的精密度性能时，建议构建精密度特征图，其中标出SD或CV作为分析物浓度的函数。

7.4 分析敏感性/检出限

实验室应确定定量和定性测试的LOD，即在可接受的精密度水平检测到样品中分析物的最低实际浓度。在确定分析特异性时，实验室应进行交叉反应性和干扰物质研究。

交叉反应生物体包括与靶标具有序列同源性的生物体、可同时存在于标本中的正常菌群以及引起类似疾病状态或临床共感染的生物体。

实验室应对检测方法进行干扰物质研究（干扰筛查），可添加潜在干扰物质到含有目标核酸的标本中，通过分析干扰物质的影响来进行。

应使用适合标本基质的潜在干扰物质，确定其在检测系统中对每种标本类型的干扰/交叉反应性。

用于确定分析特异性的数据分析应遵循常用的统计方法，如配对t检验、重复测量检验或配对差异检验。具体的分析可基于检测和对照样品的均值之间的差异，以及该检测具有临床意义的允许误差来进行。

注：对于定量检测，如果在LOD水平观察到的偏倚和不精密度满足分析总误差的要求，此时LOD可能等于LOQ。然而，大多数情况下，LOD低于分析的线性范围，并且低于LOQ。LOD不能高于LOQ。

实验室应通过对已知目标物质浓度样品进行覆盖预期LOD水平的系列稀释，经验性地确定LOD。

应确定将在临床实验室常规检测的每种类型标本基质的分析敏感性。

实验室应确认每种基因型的分析敏感性（如合理）。

为确定检出限，实验室应检测统计学上适当数量的样品。

对于数据分析，实验室宜使用probit分析法，确定可稳定检出的最低浓度水平。

Probit回归分析可产生probit（概率单位）值，并将其转换为C95值（95%样品中可检测到的浓度），表明检出限为一定数量的拷贝数/ml，且含有该浓度的样品将在95%的受试样品中检测到。

对于多重检测，应使用多重检测方法确定每种分析物的LOD。

7.4.1 分析确认

7.4.1.1 研究报告的确认

收集所有必要的性能确认数据后，实验室应撰写性能确认报告。

该报告应包括主要要求、所用方法的完整描述、性能确认研究的清晰描述以及获得的所有详细分析结果。

本文件应记录经性能确认的实验流程中各个步骤（例如，检验前步骤）、使用的试剂和条件以及参与研究的操作人员。本文件将包括接受/拒绝标准、样品重复/再分析的详细信息以及检测结果的临床解读信息。

应提供文献参考，补充实验室性能确认研究结果，并填补可能缺乏直接证据的潜在空白。

报告完成后，应按照实验室质量管理体系进行评估。

最后，实验室主任应签署报告并注明日期，声明检测方法已（或未）准备好用于常规临床实施。

注1：在某些国家，可能存在实验室声明的法律义务。

注2：与制造商和实验室声明相关的指南见ISO/IEC 17050-1和ISO/IEC 17050-2。

只要方法开发的条件没有改变，性能确认是一次性的过程。如果现有方法以任何方式进行修改，实验室应重新确认。

注3：变更可包括添加新的样品类型或改变可能影响检测性能的关键成份或试剂。

7.4.1.2 部分确认

当对已验证的方法进行了不会改变检测方法原理的微小变更（取决于改变）时，可以进行部分性能确认。例如，如果更换了同一种样本类型的采集装置或容器，但预期不会对样本本身产生影响，在这种情况下，仅需对有限数量的样品（如5~10个）进行准确性和精密度测试，以进行最小限度的性能确认。

8 实验室实施和使用

一旦完成性能验证/性能确认，检测项目需要整合到实验室的工作流程和质量管理体系中。

宜编写一份完整的标准操作程序用于指导日常操作。

对于厂家已完成性能确认的核酸检测体外诊断试剂，医学检验实验室在未对其进行修改的情况下，投入临床应用前必须进行性能验证。

对已完成性能确认的体外诊断试剂，医学实验室对其所进行的任何后续修改都需要在再次进行性能确认，且需遵循ISO 15189的要求。

在开展项目之前，实验室宜制定一套日常质量控制和质量保证体系（参见表 1 和表 2）。

在开展新项目之前，实验室应对人员进行培训和能力评估，以满足质量需求。

实验室宜为临床医生和其他用户提供该新项目临床应用的咨询服务。

9 结果的报告和解释

实验室应制定适当的 SOP 以确保检验结果报告的及时性。定量检测项目的结果通常宜报告为目标核酸分子在特定体积的体液、特定数量的细胞或特定量的组织中的分子数量（如，拷贝数、基因组当量、国际单位 IU）。

通常情况下，宜使用 Log10 转换的数据报告定量检测结果。

宜报告程序的检测范围，明确标识所使用的单位（例如，每毫升血浆中的拷贝数）。

示例：“未检出”或“低于检出限”。

定性检测项目不宜报告为“阳性”或“阴性”，其可能会引起解释上的歧义，而宜使用“检出”或“未检出”，“存在”或“不存在”。

实验室应制定一套结果报告 SOP，以确保所有结果在发布前均经过授权人员的审核和确认。实验室应编写一套数据分析工具及其参数使用的 SOP。

对于不确定的检测结果，实验室应制定复检程序，可对同一样品采用相同或不同方法进行重复检测和/或重新采样复检。

阳性判断值（cut-off 值）应作为报告的解释性注释。

对于定量检测 and 没有明确 cut-off 值的检测项目，实验室应在报告中注明该检测项目经过确认的检出限、定量限（如涉及）。

实验室应明确可对临床患者管理决策产生重大影响的检测结果，并应制定相应的 SOP 以确保结果发布后及时通知相关临床医生。

结果报告中应注明任何已知的且具有临床意义的局限性。

注：局限性可包括交叉反应、不同基因型和干扰物质等对检测结果质量的影响。

IVD 或 LDT 产品必须附带操作程序。任何有意或无意偏离说明书/操作程序的情况（如离心时离心力不正确或由于冰箱故障导致的反复冻融）均应进行记录，并制定是否接受相关检测结果的程序。

10 质量保证程序

医学实验室应实施适当的质量保证程序，以确保核酸检测结果的质量。可参考 ISO 15189。

应特别设计质量保证程序以尽量减少假阳性和假阴性结果。

检测方法一旦经过性能确认，实验室在使用过程中应对检测性能进行定期监测，宜包括使用各种质控品监测试剂性能、仪器设备运行状态以及人员操作等。持续监测过程中的数据应进行记录。

10.1 性能监测和分析优化

为进行检测性能的内部监测，实验室应在临床检测前的性能确认和日常检测工作中，以适当的频率使用合适的内参和外部质控品。实验室应定期对外部质控品进行评估，以保证其结果始终在预设范围之内。

宜将内参添加至样本基质中（如血清、血浆、培养基等），并独立于目标序列进行提取、扩增、分析和检测。内参应和目标序列在同一样本管中进行处理。

实验室需要监控基因组数据库的升级和更新，特别需要关注对检测的性能参数或结果解释存在重大影响的新发现。

推荐使用内参，但应评估并尽量减少内参竞争对目标序列检测性能的影响。

实验室宜定期核查检测的性能参数。持续监测过程中的数据应予以解释和记录。

10.2 实验室间比对

作为持续质量保证计划的一部分，实验室应定期参加室间质量评价（external quality assurance, EQA）计划。

如无适合的 EQA 计划，实验室宜定期组织内部能力验证计划。详见 ISO 15189。

参加 EQA 计划前，实验室应仔细评估该计划的适用范围和预期目的，以及对被分析物定性和/或定量检测所使用的方法。

应至少每年参加一次内部组织的或外部组织的能力验证计划。

推荐至少每年参加两次实验室间比对。

外部质控品（External quality controls）应和临床标本在同一批次内进行检测，但不应在同一管或同一孔中进行检测。

外部质控品的检测数据应进行统计学分析，以监测一段时间内的检测性能。

注：例如，可将外部质控品的检测数据进行对数变换，绘制Levey-Jennings质控图，用于评估一段时间内检测体系的检测性能。

附录 A

（资料性）

样品制备的分析前因素

A.1 血清和血浆

A.1.1 样品采集

对于血清样品，应使用含有血清分离胶的真空采血管采集外周血。将采血管置于室温下一小时，待样品完全凝固后离心。在采血管中添加促凝剂可缩短血液凝固时间。

对于血浆样品，宜使用含有EDTA的真空采血管。不建议与细胞免疫学或染色体分析样品共用血样，因这些样品常使用肝素抗凝管。

当通过IVH导管抽血时，宜舍弃初始几毫升血液，采集后续的血液作为样品，以避免肝素的潜在影响。

使用柠檬酸葡萄糖（acid citrate dextrose, ACD）或柠檬酸磷酸葡萄糖（citrate phosphate dextrose, CPD）抗凝的血浆，与EDTA抗凝血浆都可用于核酸扩增检测。

采血后应立即将EDTA抗凝采血管反复颠倒混匀，以防止血液凝固形成纤维蛋白沉淀。由于肝素会抑制核酸扩增，因此不宜使用肝素抗凝的采血管。

有沉淀、变色或因冷冻造成脱水现象的样品，不应进行检测。这可能由于存储条件不适当，如长期暴露在高温环境或反复冻融导致。若提取的核酸保存在适当条件下，则可用于复检。宜尽量减少并记录冻融次数。

A.1.2 样品贮存和运输

病毒样品在血清和血浆中相对稳定。分离后，血清和血浆样品可冷藏保存（2℃~8℃）。一些IVD制造商已经证明血清和血浆样品可以在2℃~8℃的条件下保存7天。

如长期保存，建议将样本进行冷冻。例如，对于HBV，用于DNA检测的样品宜在-20℃或更低温度下保存，对于甲型肝炎病毒（HAV）、丙型肝炎病毒（HCV）和戊型肝炎病毒（HEV），宜在-70℃或更低温度下保存。

宜避免将样品转移到另一个容器中。如果样品在离心后不能立即进行检测,宜将原始采血管中分离的血清直接冷冻(−20℃或以下)保存以备。对于丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV),宜在采血后6小时内分离血清或血浆,对于乙型肝炎病毒(HBV),最好在24小时内完成分离。

A.1.3 干扰物质的控制

所有人类样品中都可能含有潜在的“干扰物质”;这些物质可能会干扰目标分析物的扩增和/或检测。干扰物质可以是内源性的或外源性的。当浓度足够高时,一些内源性干扰物质是肉眼可见的,如血红蛋白、甘油三酯和胆红素。病理过程的大量产物可能是其他内源性干扰物质的来源,例如骨髓瘤患者的轻链或糖尿病患者的葡萄糖。这些干扰物质通常是不可见的。内源性干扰物质还包括用于治疗的物质,如抗凝剂、药物、血浆扩张剂和肠外营养。内源性干扰物质还包括患者摄入的物质,包括酒精、娱乐性药物、维生素和其他营养补充剂。干扰物质也可以是“外源性”的;这些是在样品采集过程中引入的污染物,可能包括手套粉末。为了最大限度地减少已知干扰物质(例如肝素)的影响,宜将样品收集在指定容器中。核酸提取有时可以去除或失活干扰物质,但由于潜在的干扰物质种类繁多,并且其中许多是不可见的,因此,证明每个样品或从每个样品提取的核酸都能够实现靶基因的扩增和检测是非常重要的,可通过向每个样品添加扩增对照(内参)来完成。如果内参的结果未处于预期范围(或没有扩增),则可能存在抑制物。更多信息请参见参考文献[38]和[20]。

如果检测试剂中包含内参,则可以评估扩增反应的抑制效果,并减少假阴性结果的发生率。在没有内参的情况下,可以向已提取的DNA或cDNA溶液中加入已知量的质粒DNA,并评估其扩增效果以确认抑制物的影响。

A.2 尿

A.2.1 样品采集

检测尿液中病原体的分子诊断技术主要用于性传播疾病(Sexually transmitted diseases, STD)的诊断,例如淋病奈瑟菌、衣原体及其他病原体的检测。尿液的病原体检测宜采集最可能含有致病病原体基因组DNA和RNA的尿液样品,建议首选早晨的初始排尿样品。在一天的排尿过程中,病原体会被多次排尿冲洗掉,从而导致假阴性的结果;并且大量白细胞、红细胞和脱落的上皮细胞的存在也可能会干扰检测,进一步导致假阴性。

在诊断胎儿或新生儿巨细胞病毒感染时,建议使用出生时的首次排尿样品。

A.2.2 样品保存和运输

怀疑血尿或胆红素尿的尿液样品和含有大量沉淀物的尿液样品不宜进行检测。血尿是由尿道或膀胱的炎症导致的，其原因可能是感染性或非感染性病因，如辐射。样品被冷藏时，尿液也会形成沉淀。尿液样品（男性）可用于沙眼衣原体和淋病奈瑟菌的核酸检测。此时，尿液样品宜冷藏保存（2℃~8℃），并在四天内进行核酸提取。样品通过标准方法正确提取后，DNA在冷藏条件下（2℃~8℃）可稳定保存一周或更长时间，否则建议将样品冻存。由于细菌生长而出现浑浊外观的尿液样品不宜用于检测。菌尿样品产生的可能原因包括未在适当的条件下保存样品，例如在不恰当的保存温度下将样品长时间放置在收集容器中。如需长期保存，最好将样品进行冷冻。

A.2.3 样品制备

疑似为血尿或胆红素尿，以及含有大量沉淀物的尿液样品不宜进行检测。

注：尿液样品在提取和纯化核酸之前，应在室温下，低速低温离心5分钟，可有效消除血细胞成分的污染。然而，由于解冻过程中会发生溶血，冷冻保存的尿液样品偶尔会不可避免的受到血红蛋白的污染。

检测病毒时，可将样品离心取上清液进行分析。检测细菌时，因不当离心可能会沉淀细菌，宜谨慎使用上清液，宜反复颠倒样品采集管使样品充分混匀。因样品冷藏易致沉淀物的形成，因此，在移液和后续分析之前，应将冷藏样品在37℃下孵育30分钟，使沉淀物尽可能溶解。为了尽可能降低杂质的影响，宜选择包含离心柱、微孔滤膜或磁珠颗粒的核酸提取试剂。

为了监测杂质对核酸扩增反应的实际抑制作用，宜使用检测试剂盒中自带的内参。如果以上标准品无法获得，需要采用拷贝数接近检出限的质粒DNA单独进行添加-回收实验。确认杂质的干扰后，可通过稀释核酸样品以消除抑制作用。但是，值得注意的是，该过程存在一定的风险，即目标核酸可能被稀释到低于检出限的水平，从而导致假阴性结果。

A.3 痰

A.3.1 样品采集

痰标本主要用于感染性疾病的诊断和监测，例如肺炎或由结核杆菌、非结核分枝杆菌等引起的疾病。

对于结核分枝杆菌的检测，痰标本的质量保证至关重要。通过肉眼观察评估痰标本质量，确认是脓性痰而不是唾液。如果受检者自己咳痰有困难，宜考虑使用吸痰管吸痰或用胃液作为替代标本。

此外，宜考虑收集替代标本，包括混合痰、胃液、支气管肺泡灌洗液（BAL）和支气管刮取物。

A.3.2 样品保存和运输

对于核酸检测，痰标本宜使用NALC-NaOH去污，并悬浮在磷酸盐缓冲液中。悬浮液能冷藏保存一周（2℃~8℃），冷冻可保存更长时间。使用标准方法正确提取的DNA在冷藏（2℃~8℃）条件下可稳定一周或更长时间。如需长期保存，最好将样品进行冷冻。

为避免标本反复冻融，冻存前宜将悬浮液等分装。提取核酸的稳定性与提取条件密切相关。

粘度较差的痰标本，如在高温、反复冻融等不恰当的条件暴露较长时间，则不宜对其进行检测。

可用肉眼观察来判断标本为脓性痰而非唾液，并且宜使用非粘稠的（唾液样或黏液样，根据Miller-Jones分类）的标本。如标本为唾液，通常是由于患者咳痰不足或痰分泌有限引起的。当标本中痰太少时，目标病原体如抗酸杆菌和非结核分枝杆菌可能检测不到，并可能产生假阴性结果。

A.3.3 样品制备

受感染的呼吸道（如支气管）出血可能导致痰标本含有大量血液，这种标本不适合进行检测。当痰中混入大量血液时，痰液离心沉淀物中血红蛋白污染是不可避免的，需充分考虑对随后PCR或转录介导扩增(transcription mediated amplification, TMA)分析中核酸扩增反应产生抑制的可能。在这种情况下，建议重新采集痰标本。这尤其适用于只采集到唾液的情况。

必要时，将痰的剩余部分（含有粘液包围的细胞成分和细菌）溶解在N-乙酰基-L半胱氨酸（N-acetyl-L-cysteine, NALC）、半碱性蛋白酶（Semi-alkaline protease, SAP）或二硫苏糖醇中以消除粘性。然后，应使用生理盐水或PBS洗涤痰液，离心1190g（重力加速度）[半径170mm转子为2500rpm]，4℃10分钟，再用于核酸提取。如果试剂说明书中注明了标本的预处理程序，则按照制造商说明书进行操作。如果洗涤和离心后的沉淀物的颜色接近白色，则在接下来的步骤中可能不会发生血红蛋白对反应的抑制。

A.4 全血和骨髓

A.4.1 样品采集

将规定体积的血液抽取到含有抗凝剂（EDTA和其他）的采血管后，宜立即颠倒采血管并轻轻混合。使用了含抗凝剂（EDTA和其他）的采血管时，无需添加稳定剂。

A.4.2 样品保存和运输

若标本用于检测引起菌血症或败血症的病原体,室温下长期保存标本可能会降低检测灵敏度。因此,用于此类检测的细胞长期存放时,宜将其存放在超低温条件下(−70℃或更低)。对于骨髓标本(骨髓抽吸物),宜将规定体积的标本在特殊的保存液(含FBS的细胞培养基)中冷藏(2℃~8℃)保存。

A. 4.3 样品制备

在含有纤维蛋白凝块的标本中,纤维蛋白可影响细菌的离心收集以及从液体中取样,并可能导致定量测定的准确性降低。通过试管内容物流动性不佳或移液操作,可判断是否存在纤维蛋白凝块。

提取核酸前,应物理破碎标本中的纤维蛋白凝块,直到其开始分解,进而纤维蛋白充分分散在整个标本中,然后进行检测。在DNA提取过程中,可添加DTT(二硫苏糖醇)和蛋白消化酶蛋白酶K促进纤维蛋白降解。

注1:肝素的影响能够通过使用核酸提取试剂盒来降低,因核酸可以吸附到过滤器、膜或磁性颗粒上,通过洗脱去除杂质。然而,杂质不可能完全去除。通过肝素酶完全消化样品,可消除肝素污染。由于标本中引起菌血症或败血症的病原体的量取决于标本采集时患者的状况,因此宜向检测人员提供相关信息。

注2:对于菌血症或败血症,在含有少量细菌的标本中,使用蛋白酶K处理可提高DNA提取效率,从而有助于在某些情况下实现病原体的检测。

A. 5 胸腔积液、腹水、心包液、胰液和支气管肺泡灌洗液

A. 5.1 样品采集

标本采集时,宜避免引入血细胞成分。宜使用含柠檬酸钠或EDTA的容器收集胸腔积液,因为采集后的胸腔积液有时候会因纤维蛋白沉积而发生凝固。

A. 5.2 样品保存和运输

宜在采集标本当天提取核酸,否则宜冷藏(2℃~8℃)保存标本。若长期保存,每个标本收集后宜冷藏(2℃~8℃),或冷冻(−70℃或以下)。为防止标本采集后细菌生长,宜严格遵守标本保存条件。脓性标本含有多种不同类型的细菌,使用碱性热处理进行DNA提取可能导致假阴性结果。

A. 5.3 样品制备

当溶血导致标本中含有大量细胞成分(包括血红蛋白)时,需关注PCR抑制导致的敏感性降低。

在含有纤维蛋白凝块的标本中,细菌的离心收集以及准确取样可能受到影响,并可能导致定量测定的准确性降低。通过试管内容物流动性不佳或移液操作,可判断是否存在纤维蛋白凝块。提取核酸前,应物理破碎标本中的纤维蛋白凝块,直到其开始分解,进而纤维蛋白充分分散在整个标本中,然后进行检测。在提取DNA的过程中,加入酸解离步骤,使纤维蛋白充分分解至整个标本中。然后,将含有纤维

蛋白的整个标本用于分析。在DNA提取过程中，可加入DTT（二硫苏糖醇）和蛋白酶K促进纤维蛋白降解。

注：在被血液成分污染的标本中，通过向标本中加入无菌蒸馏水，然后离心，再从这些沉淀物中提取DNA，可消除红细胞中血红蛋白对PCR扩增的抑制作用。另一种方法是，使用稀释后的提取DNA进行PCR，以降低抑制物的浓度。

A. 6 淋巴结和实体组织（活检或手术）

A. 6.1 样品采集

在采集标本时，宜将受影响的病变区域与未受影响的区域分离并保存。组织标本的形态学检查有助于区分靶细胞部分和其他部分，以便能够将其分离和取出进行检测。对于大的或过大的标本，被影响的病变（靶细胞）占整个标本的比例较小。被影响的病变可被其他组织稀释，这可能降低检测灵敏度，最终导致假阴性结果。对于结核杆菌的检测，可通过显微镜下的形态学检查来确认病变。

A. 6.2 样品保存和运输

通过活检或手术获取的组织标本宜立即在超低温（-70℃或更低）下冷冻，以防止组织自溶导致核酸降解。此时，最好从获取的组织中仅取出受影响的病灶。

对于结核杆菌的检测，可以通过形态学检查确认病变。

对于FFPE，通过活检或手术获取的组织标本宜尽快浸泡在固定剂中。如果不能立即进行固定，最好将组织标本存放在冰箱（4℃）中，并在大约3小时内固定。可在2℃~8℃条件下进行组织标本运输。

A. 6.3 样品制备

受影响的病变可被其他组织稀释，这可能会降低检测灵敏度，最终导致假阴性结果。

对于结核杆菌的检测，可以通过显微镜下的形态学检查确认病变。

激光显微切割可以从玻片上制备的冰冻组织切片中准确采集靶细胞。最简单和最容易的方法是用刀片手动收集靶细胞部分，尽可能去除玻片上石蜡包埋组织切片中不必要的细胞部分。

在使用胃活检组织检测幽门螺杆菌（*H.pylori*）和肝活检组织检测丙型肝炎病毒和乙型肝炎病毒时，红细胞污染会导致PCR扩增不良，从而导致假阴性结果。红细胞污染状况可以通过肉眼观察铁锈色或测定血红蛋白浓度确认。

通过使用基于纯化方法的核酸提取试剂盒，能够降低PCR扩增受到污染杂质的抑制作用，在纯化过程中，核酸可吸附到过滤器、膜或磁性颗粒上，通过洗脱去除杂质。

A.7 粪便标本

患者采样前的饮食情况可能会对检测结果产生抑制作用。

A.7.1 样品采集

粪便已被用于分子方法检测病原体的标本，主要用于诊断病毒性腹泻。粪便标本也可用于出血性大肠埃希菌的鉴定或相对少见的Vero毒素基因检测。因为标本是在腹泻症状最严重时采集的，所以大多数都是水样便。特别注意，在医疗机构外采集粪便标本时，宜严格按照操作说明进行采集。

A.7.2 样品保存和运输

在没有能够保存样品的添加剂的情况下，粪便标本宜在采集后一天内冷冻在 -20°C 或以下。否则它的质量可能会下降。将标本长期置于室温下，会导致多种非目标细菌的增殖，降低目标病原体的检测灵敏度，增加非特异性扩增事件的发生频率，最终导致假阴性结果。病毒核酸也可能被细菌产生的蛋白酶和核酸酶降解，从而导致检测结果假阴性。

A.7.3 样品制备

在分析之前，从技术上很难检测出标本状态异常。由于标本状态异常在检测前不易识别，因此核酸扩增检测目标病原菌的灵敏度降低的可能性始终存在。

附录 B

(资料性)

试验的验证和确认

试验在进行应用前应视预期用途进行适当的性能确认或验证，以下为相关的验证或确认流程。

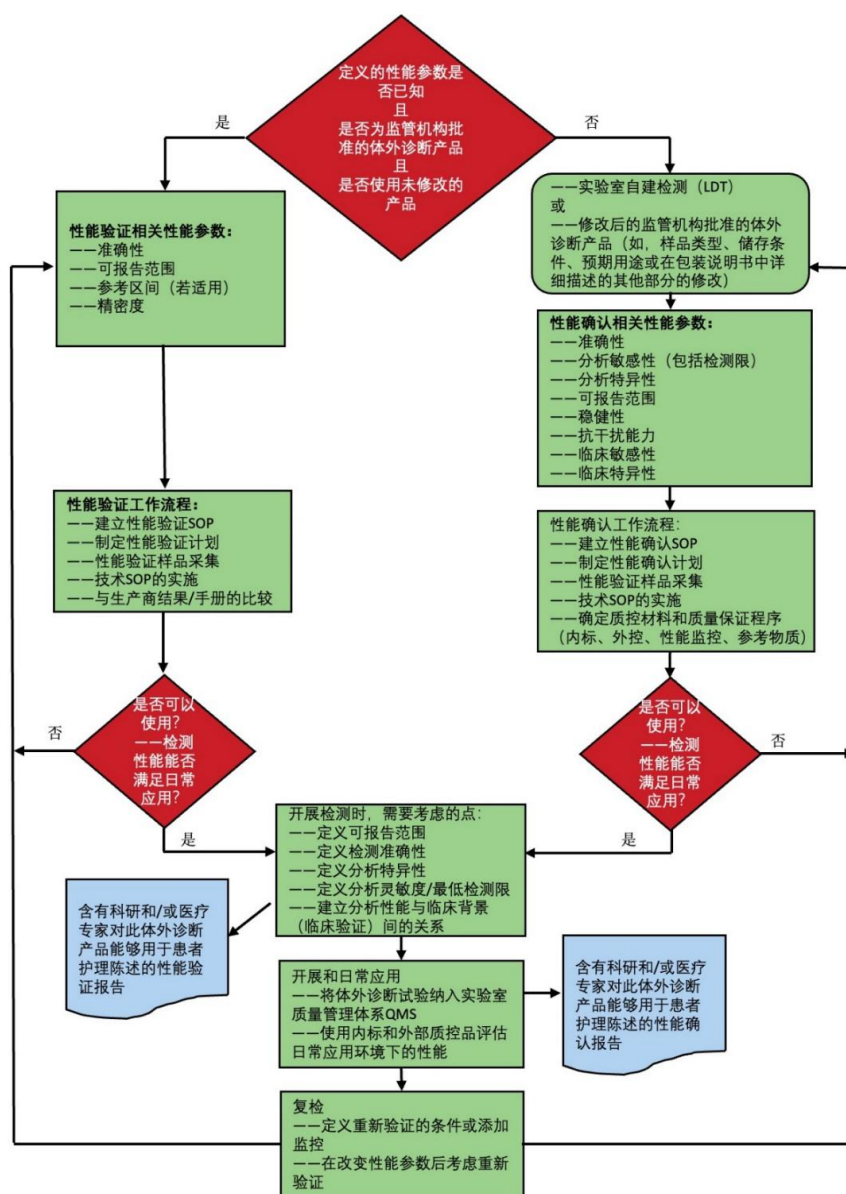


图2 试验的验证和确认流程

参 考 文 献

- [1] GB/T 3358.2—2009, 统计学词汇及符号 第2部分: 应用统计
- [2] GB/T 15000.7, 标准样品工作导则 第7部分: 标准样品生产者能力的通用要求
- [3] GB/T 19000—2016, 质量管理体系 基础和术语
- [4] GB/T 21415—2008, 体外诊断医疗器械 生物样品中量的测量 校准品和控制物质赋值的计量学溯源性
- [5] GB/T 29791.1—2013, 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第1部分: 术语、定义和通用要求
- [6] GB/T 33260.1—2016, 检出能力 第1部分: 术语和定义
- [7] GB/T 42077—2022, 生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR法和dPCR法
- [8] GB/T 42216.1—2022, 分子体外诊断检验 福尔马林固定及石蜡包埋组织检验前过程的规范 第1部分: 分离RNA
- [9] GB/T 43278—2023, 医学实验室 风险管理在医学实验室的应用
- [10] GB/T 43279.1—2023, 分子体外诊断检验 静脉全血检验前过程的规范 第1部分: 分离细胞RNA
- [11] ISO Guide 30:2015, Reference materials. Selected terms and definitions
- [12] ISO/IEC Guide 99:2007, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM; JCGM 200; 2012^[32])
- [13] ISO 21571:2005 + Amd 1:2013, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction
- [14] ISO 21572:2013, Foodstuffs — Molecular biomarker analysis — Protein-based methods
- [15] ISO 22174:2005, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions
- [16] ISO 24276:2006, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions
- [17] ISO 24276:2006/Amd 2013, Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions — Amendment 1
- [18] ISO/IEC 25062:2006, (INCITS 354) Preview Software engineering — Software product Quality Requirements and Evaluation (SQuaRE) — Common Industry Format (CIF) for usability test reports
- [19] ISO 35001:2019, Biorisk management for laboratories and other related organisations

- [20] CLSI EP 07; Interference testing in Clinical Chemistry, 3rd edition; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [21] CLSI EP17-A2; Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition; Approved Guideline; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012
- [22] CLSI EP 18-A2; Risk Management Techniques to Identify and Control Laboratory Error Sources; Approved Guideline-Second Edition; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
- [23] CLSI EP23-ATM: Laboratory Quality Control Based on Risk Management; Approved Guideline; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2011
- [24] CLSI, MM03; Molecular Diagnostic Methods for infectious disease. 3rd ed.; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- [25] CLSI MM06-A2; Quantitative molecular methods for infectious diseases; Approved Guideline, Second edition; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010
- [26] CLSI MM07-A2; Fluorescence In Situ Hybridization Methods for Clinical Laboratories, 2nd Edition; Approved Guideline; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012
- [27] CLSI MM13-A; Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline, First edition; Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005
- [28] CLSI MM17-A2; Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays; Second edition, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018
- [29] CLSI MM19 A; Establishing molecular Testing in Clinical Laboratory Environments-Approved Guidelines; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011
- [30] CLSI QMS01-A4; Quality management system A model for Laboratory Services; Approved guideline-4th edition; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011
- [31] JCCLS MM5-A1; An Approved Guideline for the Quality Management of Specimens for Molecular Methods: The Procurement, Transport, and Preparation of Specimens; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011
- [32] JCGM 200:2012; International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM 3rd edition; JCGM 200:2008 with minor corrections)
- [33] WHO/CDS/EPR/2006.6; Biorisk management — Laboratory biosecurity guidance; September 2006

- [34] Global Harmonization Task Force, Study Group 5 Final Document SG5/N2R8 Clinical Evaluation.
- [35] Bustin SA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr; 55(4):611-22. Translated into Chinese, Japanese and Arabic
- [36] Jennings L. et al. Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests, Arch Pathol Lab Med, 2009, 133, 743 – 755
- [37] Šimundić A.M. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. EJIFCC. 2009 Jan 20;19(4):203-11. eCollection 2009 Jan.
- [38] Burd E.M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases, Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3): 550–576
- [39] Huggett JF et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. Clin Chem. 2013 Jun; 59(6):892-902
- [40] Devonshire AS et al. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculous. BMC Infect Dis. 2016 Aug 3; 16:366
- [41] Pavšič J et al. Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA. Anal Bioanal Chem. 2017 Apr; 409(10):2601-2614
-