

CNAS- GL XX

分子诊断检验程序性能验证指南

Guide of 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。

本文件的附录为资料性附录。

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。

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，但不得低于相应专业指南等要求。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。

**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 505-2017《定性测定性能评价指南》

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 420-2013《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》

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

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

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**

对于本标准，GB/T 29791.1（ISO 18113-1）中的定义以及下列术语和定义适用于本指南。

**3.1 性能特征（performance characteristic）**：用于说明体外诊断医疗器械性能的参数之一。

示例：检出限、精密度、特异性。

注：通常需要一个以上性能特征的信息以评价一个医疗器械对预期医疗用途的适合性。

**3.2性能声明（performance claim）**：在制造商提供的信息中给出的体外诊断医疗器械性能特征指标。

注1：可以基于前瞻性性能研究、现有性能数据或科学文献中发表的研究；

注2：改写自EN 13612:2002,定义2.7。

**3.3** **验证（verification）**：为给定项目满足规定要求提供客观证据。

示例1：对测量系统达到性能特性或法定要求的证实；

示例2：对目标测量不确定度能够满足的证实。

注1：给定项目可以是，例如，一个过程、测量程序、物质、化合物或测量系统；

注2：规定要求可以是，例如，满足制造商声明或技术指标；

注3：验证不应和校准（3.9）或确认（3.72）相混淆；

注4：在化学上，对于物质或活性的特征的验证需描述物质或活性的结构式或特性；

注5：GB/T 19000-2008/ ISO 9000 :2005 3.8.4中验证的定义为：通过提供客观证据，对规定要求已得到满足的认定。

[ISO/IEC 指南 99:2007定义2.44]

**3.4 检出限（limit of detection）：**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：IUPAC建议α和β默认值等于0.05。

注2：术语“分析灵敏度”有时用于代表检出限，但这样的用法现在不鼓励。

[ISO/IEC 指南99:2007，定义4.18]

**3.5 交叉反应 cross-reactivity：**在竞争结合的免疫化学测量程序中，不是分析物的物质与试剂结合的程度。

示例：抗体结合到分析物的代谢物、结构相似药物等。

注：分析特异性是一相关概念。

3.6 **干扰物 interferent：**不是被测量但影响测量结果的量。

示例：胆红素、血红蛋白、脂质或有色药物对特定比色法测量程序的影响；

注：干扰量可以是影响量，但不限于直接测量。参见分析干扰(3.7)。

**3.7分析干扰 analytical interference：**由一个影响量引起的测量的系统效应，该影响量自身不在测量系统中产生信号，但它会引起示值的增加或减少。

1. 对测量结果的干扰与分析特异性（3.7）概念相关。测量程序相对于样品的其它成分特异性越好，越不易于受到这些化合物的分析干扰。

[GB/T19702-2005/ISO 15193:2002, 定义3.9]

**3.5**  **分析灵敏度（analytical sensitivity）**：测量示值变化除以相应的被测量值变化所得的商。

注1：测量程序的灵敏度有可能依赖于被测量值。

注2：要考察的被测量值改变必须大于分辨率。

注3：一个测量系统的分析灵敏度是校准曲线的斜率。

注4：分析灵敏度不应用于表示检出限或定量限，并且不应与诊断灵敏度混淆。

[ISO/IEC 指南99:2007，定义4.12]

**3.6 分析特异性（analytical 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它量。

注1：缺乏特异性可被称为分析干扰。

注2：在免疫化学测量程序中缺少特异性可能由于交叉反应。

注3：测量程序的特异性不应和诊断特异性混淆。

注4：ISO/IEC 指南99:2007对此概念使用术语选择性而不用特异性。

注5：改写自ISO/IEC 指南99:2007，定义4.13。

**3.7 正确度（trueness）：**无穷多次重复测量所得量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。

注1：测量正确度不是一个量，且因而不能以数字来表达。一致程度的量度在GB/T 6379.3/ISO 5725-3中给出。

注2：测量正确度与系统测量误差反相关，但与随机测量误差不相关。

注3：术语测量准确度、不应用于测量正确度，且反之亦然。

[ISO/IEC 指南 99:2007，定义 2.14]

3.8 **精密度（precision）**：在规定条件下，对同一或相似被测对象重复测量得到测量示值或测得量值间的一致程度。

注1：测量精密度通常由不精密度的量度以数字表达，如规定测量条件下的标准差、方差和变异系数。

注2：规定的条件可以是，例如，测量的重复性条件、测量的中间精密度条件、或测量的再现性条件（见GB/T 6379.5/ISO 5725-5[78]）。

注3：测量精密度用于定义测量重复性、中间测量精密度和测量再现性。

注4：重复测量指在同一或相似样品上以不受以前结果影响的方式得到的结果。

[ISO/IEC 指南 99:2007，定义 2.15]

3.9 **重复性（repeatability）**：在一组测量条件下的测量精密度，包括相同测量程序、相同操作者、相同测量系统、相同操作条件和相同地点，并且在短时间段内对同一或相似被测对象重复测量。

注1：在临床化学上，术语批内或序列内精密度有时用于指此概念。

注2：在评估体外诊断医疗器械时，通常选择重复性条件来代表基本不变的测量条件（被称为重复性条件），此条件产生测量结果的最小变异。重复性信息可对故障排除目的有用处。

注3：重复性可以用结果分散性特征术语定量表达，如重复性标准差、重复性方差和重复性变异系数。相关统计术语在GB/T 6379.2/ISO 5725-2[77]中给出。

注4：改写自ISO/IEC 指南 99:2007，定义 2.20和2.21。

3.10 **中间精密度（intermediate precision）：**在一组测量条件下的测量精密度，这些条件包括相同的测量程序、相同地点并且对相同或相似的被测对象在一长时间段内重复测量，但可包含其它相关条件的改变。

注1：应在实际程度规定改变和未改变的条件，特别是如校准物、试剂批号、设备系统、操作者和环境条件等变量。

注2：在体外诊断医疗器械评价中，一般选择的中间精密度条件代表体外诊断医疗器械在一长时间段内的实际使用条件。

注3：相关统计学术语在GB/T 6379.3/ISO 5725-3[6]中给出。

注4：中间精密度可用结果的分散性特征术语定量表达。如标准差、方差和变异系数。

注5：改写自 ISO/IEC 指南 99:2007，定义 2.22 和 2.23。

3.11 **线性（linearity）：**给出与样品中被测量的值直接成比例的测得量值的能力。

注1：对于体外诊断医疗器械，线性与测量示值(3.28) 校正或线性化后给定测量区间（3.46）内的测量结果有关。

注2：线性通过测量包含配方已知或的相对关系已知（不必绝对知道）的被测量样品来评估。当测量结果相对被测量绝对或相对数值作图时，所划曲线对直线的符合程度即线性度的量度。

**3.12临界值（cut-off value）**：鉴别样品，作为判断特定疾病、状态或被测量存在或不存在的界限的数值或量值。

注1：测量结果高于临界值判断为阳性而低于临界值判断为阴性。

注2：测量结果接近临界值判断为非确定性。

注3：临界值的选择决定检验的诊断特异性和诊断灵敏度。

[ISO 18113-1，定义A.3.13]

注4：厂商根据检测的预期用途或预期的临床灵敏度和特异性，来建立其检测的临界值。一旦厂商建立了这个临界值，用户不可随意更改。

**3.13定量限 quantitation limit limit of quantitation:** 在规定的测量条件下以指定的测量不确定度能测量的样品中可被测量的最低值。

注1：在体外诊断标示中，有时候也被用来指检测下限、定量下限、测量下限。指导方针见A.2.8。

注2：不鼓励使用术语“功能灵敏度”表示此概念。

**4. 总则**

**4.1性能验证的时机**

4.1.1新检测系统常规应用前；

注：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。

4.1.2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受影响的性能进行部分性能验证。

注：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。

4.2 性能验证参数

定性项目性能验证内容宜包括检出限、符合率等。定量项目性能验证内容宜包括精密度、正确度、线性范围、检出限和定量限、抗干扰能力、测量区间等。在标本来源有限、标本组成复杂、目的基因在标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扩增系统有问题应进行扩增效率验证。如果检验程序适用标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，如果检验程序高度依赖人工操作，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。在肿瘤靶向基因检测时，如果检验程序适用标本类型包括除肿瘤组织/细胞以外的标本（如血浆），应进行与肿瘤组织结果一致性的验证。

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：

PCR定量检测选择验证的性能指标宜包括正确度、精密度、线性范围、可报告范围、抗干扰能力等；

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测序选择验证的性能指标宜包括检出限、准确性和特异性等；

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。

**4.3 性能验证的判断标准**

实验室应根据临床需求制定适宜的检验程序分析性能标准。实验室制定性能标准时宜考虑国家标准、行业标准、地方标准、团体标准、制造商或研发者声明的标准、公开发表的临床应用指南和专家共识等。

实验室性能验证的结果应满足实验室制定的判定标准。

注1：如果验证结果符合厂商或研发者声明的性能指标，但不满足实验室制定的判断标准，结果不可接受。

注2：如果验证结果不符合厂商或研发者声明的性能指标，但仍能满足实验室制定的判定标准，结果可接受。

**5.实验前准备**

5.1实验操作人员应熟悉方法原理与操作，包括样品处理、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. 5 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。

5.6 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：下列程序不属于已确认程序，如果程序中含有与检验程序不适用的仪器、标本类型、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**

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）。

a.样品：选取阴性样品至少5份、阳性样品（宜包含弱阳性（低扩增）样品）或每类变异至少10份，共15份样品。

注1：阳性率较低的项目，可酌情减少样本例数。

注2：若弱阳性（低扩增）样品不好获取，可用适当稀释强阳性样品获得类似的效果。

注3：对于杂交检测技术，若弱阳性（低扩增）样品不好获取，可用不同比例的特定细胞系混合获得类似的效果。阴性标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标本。

b. 验证方法：按照患者样品检测程序，采用参比方法和候选方法平行检测。将所有检测结果按表2归总填表，计算符合率。

表2 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 |

阳性符合率=a/(a+c)×100%

阴性符合率=d/(b+d)×100%

总符合率=(a+d)/( a+b+c+d)×100%

c. 可接受标准：参见4.3

**6.1.2检出限：**

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。

**a.样品：**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品进行20次重复测定（如测定5天，每天测定4份样品）。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。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。

【NGS】 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品进行测定（样品总数不得少于5个，每个样品检测浓度不得少于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。

【sanger测序】对确定基因变异类型的检测限同NGS。

【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份样品）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。

**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，应验证其它基因型对待测核酸测定的影响，应在待测核酸浓度水平进行验证。

**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标本保存液或经确认为阴性的标本中，与常规标本一样处理，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标本，与常规标本一样处理，至少重复检测3次。

**6.1.3.3 可接受标准**

结果应为阴性。

**6.1.4 抗干扰能力**

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、抗核抗体和药物等。实验室可根据临床需求、厂家声明和标本特点（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，也应评估抗凝剂和标本保存液等对结果的影响。

**6.1.4.1 验证方案**

实验室可根据实际情况选择验证方案。

方案1：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。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，与常规标本一样处理，至少重复测定3次以上。

方案2：实验组为在含待验证浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的临床标本中加入弱阳性标本（量小于10%），对照组为在含低浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的临床标本中加入弱阳性标本（量小于10%），与常规标本一样处理，至少重复检测3次。

**6.1.4.2可接受标准**

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 可接受标准**

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-GLXX《临床化学定量检验程序性能验证指南》。

**6.3 其它性能验证指标**

**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，核酸提取得率和完整性。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。在标本来源有限、标本组成复杂、目的基因在标本中含量低或怀疑提取试剂有质量问题时才需要进行验证。

**6.3.1.2 验证方案**

**6.3.1.2.1 核酸纯度**：按照试剂盒要求，提取含有不同浓度待测核酸的标本，核酸浓度宜覆盖厂家声明的可提取的核酸浓度，将核酸提取液用分光光度计测定A260/280比值。

**6.3.1.2.2 核酸提取得率**：将含有待测物质的标本平均分成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。

核酸提取得率= ×100%

**6.3.1.2.3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标本，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 可接受标准**

**6.3.1.3.1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。

**6.3.1.3.2核酸提取得率**：核酸提取得率应不低于厂家声明或实验室制定的标准。

**6.3.1.3.3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**

**6.3.2.1 验证要求**

扩增效率包括标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。扩增效率太低提示PCR体系可能存在抑制物，扩增效率太高提示可能存在非特异扩增。

**6.3.2.2 验证方案**

将接近线性范围上限浓度的标本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 可接受标准**

标本和标准品的扩增效率均≥90%且≤110%。

6.3.3 **测序深度参考区间**

**6.3.3.1 验证要求**

验证不同测序深度下检测结果的可靠性，明确测序深度的参考区间，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。

* + - 1. **验证方案**

# 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人工合成质粒混合物。如使用临床组织样本测定，样本总数不得少于60个。使用检测下限处突变丰度，检测不同测序深度之下结果的准确性。

* + - 1. **可接受标准**

特定测序深度范围，检测结果符合率均≥95％即为测序深度参考区间。

**6.3.4 上机测序的性能验证**

* + - 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。

* + - 1. **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（哪些参数？），根据性能参数标准评价设备性能是否符合使用要求。

# **6.3.4.3 可接受标准**

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。

* + 1. **数据分析系统的性能验证**
       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。

* + - 1. **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。

# **6.3.5.3 可接受标准**

检测结果符合率均≥95％即为验证通过。

* + 1. **参考区间【杂交】**

**6.3.6.1 验证要求**

至少20份来自正常（或非待验证方法检测疾病）个体的样本。

**6.3.6.2 验证方案**

每份样本至少收获200个肿瘤细胞进行原位杂交检测（检测目标为微缺失或微重复时可减少到50个分裂中期细胞），每种探针信号类型分别计数、计算95%置信区间。

**6.3.6.3 可接受标准**

每种探针信号类型均达到相应的检测标准要求。

**6.3.8 临界值【杂交】**

**6.3.8.1 验证要求**

如无客观资料证明，对定量原位杂交检测，针对每种探针信号形式和组织类型均应做临界值验证（同时检测多个探针、采用不同探针比值进行判定的---如Her2，只需验证比值的临界值，不必针对每个探针分别验证）。

**6.3.8.2 验证方案**

采用20份正常样本进行原位杂交检测，每份样本分别观察500个合格细胞核并记录，利用相适用统计学方法（通常为二项分布）计算95%置信区间的临界值。

**6.3.8.3 可接受标准**

不高于厂家声明或相应指南推荐的临界值。

**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》

4.WS/T 505：2017《定性测定性能评价指南》

5.CLSI EP12-A2:User Protocols for Evaluation of Qualitative Test Performance；Approved Guideline-Second Edition.

8. YY/T 1182-2010 核酸扩增检测用试剂(盒)

9.体外诊断试剂分析性能评估（准确度-回收实验）指导原则

10. 人表皮生长因子受体（EGFR）突变基因检测试剂（PCR法）注册技术审查指导原则

11 CLSI MM06-A2:quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline- Second Edition.

12.CLSI MM03-A3:Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases-Third Edition.