



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX/ISO 21474-2:2022

体外诊断医疗器械 多重核酸分子检测 第2部分：验证和确认

In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids
—Part 2:Validation and verification

(ISO 21474-2:2022,IDT)

草案版次选择

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
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言.....	III
引言.....	IV
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 总则.....	1
4.1 一般原则.....	1
4.2 实验室要求.....	2
4.3 试剂要求.....	2
4.4 仪器设备.....	2
4.5 参考物质和质控品.....	3
4.5.1 概述.....	3
4.5.2 内源性核酸.....	3
4.5.3 非基因组参考物质.....	3
4.6 校准的分析.....	3
4.7 投入核酸范围.....	4
5 性能特点评估.....	4
5.1 总则.....	4
5.2 分析特异性.....	4
5.2.1 分析反应性.....	4
5.2.2 空白检测限.....	4
5.2.3 交叉反应.....	4
5.2.4 排他性.....	5
5.2.5 干扰物质和残留污染.....	5
5.3 可靠信号范围、可报告范围和参考范围.....	5
5.4 多重分子检测平台的检出限 (LODP).....	5
5.5 测量精密度和不确定度.....	6
5.6 准确性和方法对比研究.....	6
附录 A (资料性) 有证标准物质.....	7
A.1 核酸有证标准物质的使用.....	7
A.1.1 通用原则.....	7
A.1.2 检测确认和测量不确定度.....	7
A.1.3 校准.....	7
A.1.4 质量控制和质量保证 (QC&QA).....	7
A.2 标准物质适当性的评定.....	7
A.3 证书和支持性报告.....	8

附录 B (资料性) 人基因组标准物质.....9

 B.1 人基因组标准物质的使用.....9

 B.2 证书和支持性报告.....10

 B.2.1 证书和支持性报告.....10

 B.2.2 人基因组材料的适用性的评定.....11

 B.3 人基因组材料的内部制备.....11

参考文献.....12

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》的规定起草。

本文件等同采用ISO 21474-2:2022《体外诊断医疗器械 多重核酸分子检测 第2部分：验证和确认》

本文件做了下列最小限度的编辑性改动：

删除了ISO 21474-2:2022的前言；

适用的我国标准化文件替换“规范性引用文件”中ISO/IEC国际文件；

适用的我国标准化文件替换“规范性引用文件”中ISO/IEC国际文件；

适用的我国标准化文件替换“规范性引用文件”中ISO/IEC国际文件；

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：

本文件主要起草人：

引 言

第一代分子体外诊断 (IVD) 医疗器械专注于对临床样本中单一核酸序列 (如病毒核糖核酸 (RNA)、信使核糖核酸 (mRNA) 和基因组脱氧核糖核酸 (DNA)) 的定量或定性检测。与之相比, 多重分子检测是指在一次反应中同时检测多个核酸序列。随着技术的进步, 以及对许多生物标志物新的临床意义的阐明, 多重体外诊断医疗器械的开发和临床应用正在迅速扩张。

在多重分子检测体系中, 为了避免可能由不同反应之间的竞争导致的非特异反应或背景信号, 对于样品纯度、试剂组分投入量和平台有更严格的要求。与单一靶标分析相比, 多重分子检测需要更多的质控品、更复杂的性能评价/数据分析算法和更复杂的结果报告。

基于各种技术和仪器平台, 实验室可以开发内部 (或称自制、实验室开发) 检测方法或使用商品化多重分子检测方法。随着多重分子检测的可用性和适用性程度的提高, 越来越需要制定多重分子检测方法开发、确认、验证、整理控制、数据分析和实施的指南。为了使多重分子检测可靠地实现其预期用途, 应该从样品采集和用于检测的核酸制备环节, 到数据评估和结果报告环节等全流程进行控制。多重分子检测给实验室带来了重要挑战, 例如适合的确认和验证方法、适合的质控品的获取、数据分析和报告等。与单一靶标分析相比, 多重分子检测的数据分析和结果报告更复杂。此外, 适合的生物物质控品的获取可能极其困难甚至无法获取。因此, 获取足量且适合的质控品或参考品对多重分子检测进行正确的确认和验证是重要挑战之一。本文件描述了在开发和实施阶段, 关于确认和验证用于临床的核酸多重分子检测各个方面的建议, 从而确保此其性能具有良好的复现性。

体外诊断医疗器械 多重核酸分子检测

第2部分：验证和确认

1 范围

本文件提供了多重分子检测（同时检测两个及以上核酸序列）确认和验证的通用要求。本文件适用于所有用于外诊断医疗器械和实验室自建检测方法（LDT）的定性或定量多重分子检测。

本文件旨在为定性和/或定量检测人体临床样本中的人类或病原微生物体核酸序列的多重分子检测提供指导。

本文件适用于医学实验室使用的各种多重分子体外诊断方法。同时，为实验室用户、体外诊断开发商和制造商、生物样本库机构、从事生物医学研究的商业化组织，以及监管机构等提供参考。本文件不适用于宏基因组学。

注：实验室内部使用的检验方法称为“实验室自建方法（LDT）”或“内部方法”。

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 15189:2012，医学实验室——质量和能力的要求

ISO 21474-1:2020，体外诊断医疗器械—核酸多重分子检测—第1部分：核酸质量评价的术语和通用要求

3 术语和定义

请选择适当的引导语

ISO 21474-1提供的术语和定义适用于本文件。

ISO和IEC维护用于标准化的术语数据库，参见以下网址：

——ISO在线浏览器平台：位于<http://www.iso.org/obp>

——IEC Electropedia：位于<http://electropedia.org>

4 总则

4.1 一般原则

多重分子检测是指同时检测多个核酸序列的体外诊断医疗器械，例如多重PCR、DNA微阵列芯片和大规模平行测序等方法。

在核酸多重分子检测的情况下,为了避免可能由单个反应之间的竞争导致的非特异反应或背景信号,对于样品纯度、试剂组分投入量和平台有更严格的要求。与单一靶标分析相比,多重分子检测需要更多的质控品、更复杂的性能评价/数据分析算法和更复杂的结果报告。

确认活动由制造商或实验室在方法开发过程中执行,旨在确保确定预期用途的性能特征。IVD和LDT的确认方案应该旨在建立性能参数规格,如准确性、精密度/再现性、检出限(LOD)/分析范围以及交叉反应性/干扰物质;在检测方法的设计开发时,应明确预期用途,包括用于检测的样本类型;检测方法开发商应明确检验流程说明书。在开发过程中,应遵守上述内容。在验证过程中和验证实施后,如果过程或方法发生任何变化,实验室应重新确认检测方法的性能特征。实验室应进行验证活动,以确认前期通过验证活动建立的性能参数规格能够满足预期用途。然后,实验室通过程序文档控制、操作员培训、常规质量控制、能力验证、仪器校准以及与临床结果的相关性,对多重分子检测进行持续的质量保证。

实验室工作流程中的所有环节都可能影响多重分子检测结果的有效性和可靠性,包括分析前阶段的原始样品采集、运输储存和处理环节,以及分析环节等。

注:MM17-A指南为多重分子检测的验证和确各个方面提供了建议^[4]。

4.2 实验室要求

ISO 15189:2012描述了医学实验室的质量和能力的要求。

对于未完全集成在单一的一次性或整体平台上(从样品到结果)的测试,应按照ISO 22174:2005第6条的规定,在单独的工作区/房间内进行样品处理。

DNA和RNA的意外污染可能源于灰尘和播散的气溶胶,这些气溶胶含有先前扩增的核酸靶标产生的扩增子。因此,实验室工作区域的组织和良好实践应基于:

- 应考虑产物结果中方法步骤带来的系统性污染,以及
- 样品处理的“正向流动”原则。

后者确保测试材料中的DNA和RNA保持物理分离。更多详细信息可参见ISO 21571:2005。

4.3 试剂要求

分析中使用的所有试剂和材料应与方法宜按照相同或等效等级的试剂和材料。否则,所有试剂和材料都应具有与分子生物学相关的等级。例如,去除DNA和RNA酶的水。

检测试剂应按照供应商的建议或实验室质量保证规范进行储存和使用。

应验证或确认试剂(如荧光染料、缓冲液等)的特性和质量以及添加到反应混合物中的外部测量标准品或参考物质的量。

在纳入正式性能评估之前,应测试所有关键试剂的功能。在多重分子检测中,当不能获得所有靶标的基因组标本时,应使用合成质控品来评估检测试剂。

如果检测制造商提供了商业试剂盒的储存和使用说明,则应遵守这些说明。如果检验制造商未提供此类说明,则应由实验室进行规定和验证,并遵照执行。

4.4 仪器设备

实验室宜根据制造商的说明和ISO 15189中给出的要求确认设备(包括,安装质量、操作质量和性能质量)。用于多重分析的标准实验室仪器和特殊设备在ISO 16578微阵列部分中有相应独立的标准可疑适用。

应对其性能影响检验结果的设备进行常规的定期校准。

4.5 参考物质和质控品

4.5.1 概述

只要有参考物质（RM），就宜选择适合其预期用途的参考物质。当参考物质不可用时，应制定并记录替代方法。

核酸多重分子检测的验证宜考虑参考物质。参考物质也可用于定性或定量方法，具有许多不同的功能，如检查程序的校准和评估。特别是对于使用大规模平行测序方法的基因组分析，基因组参考物质可以根据所选材料改变序列数据（见附录A和B）；因此，此类方法的参考物质应考虑适合预期用途。

实验室宜按照ISO 15189的规定，使用与检测试剂反应方式宜尽可能接近患者标本的质控品。如果这些质控品不可用，将不能够检测盘中的所有探针，对试剂正确性和合理的监督起到作用。实验室要特别考虑到临床情况来调整其安排。

检验结果宜评价确认样品参考物质或质控品的质量符合预期用途。当进行评估时，应考虑使用参考物质，包括非基因组（见4.5.3）和基因组（见4.5.2）参考物质（见附录A和B）。

为了验证不同基质的使用，过量加载测定（显著的）是必要的。

如果制造商提供了参考物质和质控品的储存和使用说明，则应遵守这些说明。如果检验制造商未提供此类说明，则应由实验室进行规定和验证，并遵照执行。

4.5.2 内源性核酸

基因组DNA（gDNA）是与患者样本最相似的质量控制材料，也是最优选的，尽管并不总是最有效的。任何材料（如永生化的人类细胞系、纯化的gDNA、细菌/微生物培养物和细菌gDNA）中是否存在突变或变异，应由实验室在使用前对每个新批次进行验证或确认。

合成重组工程化或人工构建的长DNA，例如重组人工染色体，可以用作gDNA的替代质控品（见4.5.3）。管家基因的几个转录本可以用作质控物。

注：管家基因包括，如beta-actin、GAPDH和cyclophilin。

4.5.3 非基因组参考物质

非基因组参考物质是通过合成、重组、基因工程或者人工构建的，大多由质粒构成，由于它的稳定性和容易使用。非基因组参考物质具有很高的价值，特别适用于多重检测，因为它们可以把基因片段中包含所有序列变异设计在一个样品中用来检测。在质量保证中应仔细选择非基因组对照，以确保它们适用于监控所需的系统参数。非基因组对照存在以下方面的问题和限制。某些测试系统和/或软件的设计不能正确识别包含的等位基因在一个多质控中。非基因组参考物质不得不加入病人物质，因此不能作为病人来源的样本参与整个分析过程。这种状况应该被重点关注，当有合理的机会误导或假阳性报告，由于存在假基因或其他序列，通常存在于与感兴趣的目标高度同源。

非基因组参考物质在DNA和RNA分析中应同样被应用。

注：DNA或者RNA参考物质通过认证的参考物质，如NMIJ CRM 6205-a和NMIJ CRM 6204-b，建立计量溯源方法进行评价。

4.6 校准的分析

在定量测量中，如基于qPCR的实验，应该使用一个能够覆盖可信区间的合适数值的校准点和重复。校准影响测量的不确定度。关于PC校准的更多细节可疑参考ISO 20395[16]。

作为基因组DNA或mRNA 校准参考物质的替代方案，例如稀释含有靶序列或质粒或合成dsDNA的质粒或合成dsDNA系列和ssRNA可以分别使用，前提是它被证明以等效的方式发挥作用基因组DNA参考物质和从样品中提取的基因组DNA，或mRNA参考物质和从样品中提取的mRNA。

例如：作为个可以替代基因组DNA或mRNA校准物的参考物质，应该是一个可稀释包含靶标序列质粒或者合成的dsDNA，或者是可独立使用的质粒、合成dsDNA和ssRNA。

4.7 投入核酸范围

应以滴定最优化投入的核酸浓度范围，以确保实验中检测到每个目标序列，如典型的PCR、微阵列和测序。

5 性能特点评估

5.1 总则

分析性能评价的对象应为完整的多重分子检测系统，而不是每种单重检测。

5.2 分析特异性

5.2.1 分析反应性

试剂不同，序列变异或不同型别病原体的反应性也不同，因此为了获得准确的结果应该尽可能地对所有涉及的序列变异或不同型别病原体的检测能力进行确认。可检测的分析物应在试剂的预期用途内进行描述。对于病原体的检测，应包括弱阳性样本（例如，建立的LOD浓度或者临床经验性诊断水平下限的浓度）。

在基于PCR的多重分子检测中，应优化引物和探针的相对浓度，确保每个靶标序列的检出，通过最大化扩增效率并尽量减少二级结构（例如，茎环，假结结构），从而优化产物的检测。

在PCR中，为了平衡反应之间的竞争，可以评估与产物累积相关的每个参数来最大化效率。使用相同的探针组进行单基因和多基因反应来检测探针的相互作用；由多引物和探针引起的检测效率下降，可通过比较信号强度和阈值确认。

5.2.2 空白检测限

空白检测限是在空白样本中可能观察到的最高测量结果。在没有任何分析物的情况下也可能检测到信号。这通常由引物二聚体引起。在反应中，引物对数量越多，越容易出现二聚体。应该对引物序列进行筛选，避免所有3'末端同源的引物以减少引物二聚体的形成。在引物的3'末端包含G或C有助于引物的紧密结合，防止末端不处于退火状态，从而增加引物结合的效率。可采用修饰后的聚合酶减少非特异性扩增，因为其在室温状态没有活性，在耐受反应起始的高温后，退火延伸阶段恢复活性。

5.2.3 交叉反应

应该评估一组密切相关的生物/等位基因，以确定多重检测是否与靶标之外的分析物发生交叉反应。在设计引物/探针时应考虑物种特异性。在检测病毒时，设计的引物/探针应避免与人类和细菌基因组DNA发生交叉反应。在设计过程中，应该包括核酸数据库搜索等生物信息学分析以确认物种特异性，避免与人类和细菌发生交叉反应。

对于多重病原体检测，应考虑临床合并感染的情况，确认其它病原体不会干扰目标病原体的检测；还应采用包含高浓度人基因组DNA背景的模拟样本，评价人基因组DNA对临床标本中病原体检测的影响。

5.2.4 排他性

对于等位基因内目标变异位点的多重检测，引物/探针的设计应当考虑对变异位点检测的特异性。

5.2.5 干扰物质和残留污染

应明确干扰检测的可能来源，在性能确认时系统地评估每种干扰物质的影响。在检测的每一步都应评估残留污染的风险。每批检测均应包含一个无模板对照。

注1：在人基因组大规模平行测序中，重复序列和假基因具有较显著的干扰作用。对于高度片段化的DNA，假基因的短读长可能发生比对错误，从而产生假阳性结果。假基因和高度重复的序列可消耗捕获探针导致在靶率降低，导致检测靶标数偏低。

注：注2：对于检测低丰度变异的人基因组测序来说，残留污染是一个重要的问题。在检测方法设计时，建议采取措施避免残留污染从一个样本带入另一个样本。可使用生物信息学分析，通过比较不同样本的结果来监测是否发生残留污染。

5.3 可靠信号范围、可报告范围和参考范围

在性能确认时，有必要确定多重分子检测的可靠信号范围（如LOD和线性范围）。该方法仅在该范围内适用。在可靠信号范围内的分析物结果应该是准确可靠的。

应在交叉反应性研究和相关分析性能评价（如LOD和精密度的）中，充分确认用于多重分子检测分析物的判定规则。

可报告范围是所有检测结果都被认为有效的范围。参考范围是正常值的范围。可报告范围和参考范围应根据预期用途确定。

注：在基于大规模平行测序的人基因组多重分子检测中，参考范围不仅包括良性或非致病性的变异，还包括来自健康人群的人参考基因组数据集。

5.4 多重分子检测平台的检出限（LODP）

对于多重分子测试产品，宜尽可能评估试剂中所有靶标的LOD。如可能，建议确立每个主要靶标和变异体的LOD。在选择合适靶标进行LOD测试时，宜将流行率或检测难度

视为一个选择标准。建议至少包括最常见的和最难检测的检测靶标。对于其它靶标，建议提供可在 $\geq 95\%$ 的样品测试中稳定检出靶标分析物的最低浓度。

当靶标序列由待测序列和非待测序列混合组成时，无论使用何种平台，宜考虑使用 LODP 替代LOD。

对于多重分子测试产品，并非总能为每个被探测靶标建立LOD。如果需要单个靶标的 LOD，可以在给定平台上采用外部测量标准（或参考物质）确定代表性靶标的LOD。每个待检测分析物的数量宜多于LODP。

LODP实验与检测方法的分析部分、分析物的质量/数量以及检测方法的绝对LODP有关。建议采用合适的参考品和质控品，以室间对比的方式对LODP值进行确认。外部测量标准（或参考物质）最低检测水平的假阴性率宜 $\leq 5\%$ 。

在包括 LOD 确定的性能评估过程中，建议评估系统中使用的引物/探针之间的任何交叉反应。建议性能评估的接收标准包括综合考虑单个分析物检测组成的整个分析系统的描述。

注1：NMIJ CRM 6204-a 可作为RNA 表达通用的外部测量标准的示例。

注2：当无法获得适当的参考品或质控品时，国际常用的校准品或由实验室和制造商内部制备的工作校准品可替代作为参考物质。实验室需确保出于验证目的任何参考物质的可互换性。

5.5 测量精密度和不确定度

在精密度研究中，应考虑变异来源是仪器、实验室、操作人员、样品浓度、样品来源、试剂批次、运行次数、日期和时间。

精密度研究宜包括具有挑战性的样本，例如近 LOD（如2-3倍 LOD）样本或近临界值临床样本。

在重复性研究中，建议包括代表性的稀有等位基因，以确保能够准确检测到它们的存在。每次重复性测试宜包含合理组合的多种变异。

重现性检测参考品盘宜包含每一个分析物。

对于具有潜在定量输出功能的定性测试，可以通过每种变异源的变异系数（CV）和总体变异的方差成分分析测量精密度。建议使用对多重分子试剂中的分析物具有反应性的样本，以及至少部分对所有靶标/分析物不具有反应性的样本来确定。

注1：变异系数（CV）不适用于报告任意荧光单位（例如 C_q/C_t）的核酸扩增检测（NAAT）方法，在数学上也不适用于遵循对数正态分布的核酸测量。

测量不确定度可以定义为测量真值所在的估值范围。对于具有潜在定量输出功能的定性测试，可以通过方法学验证实验得到的精度和偏差信息来估计测量不确定度。

在多重分子测试中，并不总是能够确定每个被探测靶标的测量不确定度。如果需要单个靶标的测量不确定度，可以在给定平台上通过测试外部测量标准（或参考物质）来确定代表性靶标的测量不确定度。测试获得的整体测量不确定度宜大于每个靶标的测量不确定度。

注2：注：ISO/TS 20914: 2019 提供了测量不确定度估计的实用指南。

5.6 准确性和方法对比研究

准确性包含多种要素，例如分析/诊断灵敏度和特异性、阳性预测值（PPV）和阴性预测值（NPV）、百分比符合率、假阳性和假阴性率。建议与已建立的参考方法或对比产品、其他经过验证的分子体外诊断产品或参考物质或两者同时进行性能的比较。它们应通过设计合适的方法对比研究，对产生的数据集进行相关统计分析来建立。应选择合适的数据分析技术和参考方法来确定单个分析物和整个系统的准确性。

注1：当使用非参考标准评估新测试时，灵敏度和特异性的无偏估计无法直接计算。当估计值称为阳性符合率（PPA）和阴性符合率而不是灵敏度和特异性时，可以应用相同的数值计算。

多靶标检测产品某些靶标或等位基因的分析灵敏度、诊断灵敏度和阳性预测值通常是清楚确定的。在这种情况下，建议通过获得尽可能多的阳性样本进行方法学比较，并使用替代样本来源获得补充数据来进行产品开发。使用相同检测方法研究这些罕见靶标的诊断灵敏度的文献资料可以提供额外的数据补充。

对于大规模平行测序，应建立并记录每个报告的变异类型（如，单核苷酸变异、插入缺失、拷贝数变化和结构变异）的阳性符合率（PPA）和阳性预测值（PPV）。

注2：一些报告描述了在多重分子测试包括高通量测序的验证/确认中，基于95%置信区间和95%可靠性分析设计的适当最小样本数量的框架，但在本文件中没有描述。

附录 A (资料性) 有证标准物质

A.1 核酸有证标准物质的使用

A.1.1 通用原则

ISO指南32和33中提供了关于有证标准物质(CRM)和标准物质(RM)使用的更详细说明。

A.1.2 检测确认和测量不确定度

偏差估计值(测量值和真实值之间的差值)是检测确认中最困难的因素之一,但在标准物质(RM)标准值的不确定度和被确认检测的不确定度范围内,适当的参考材料(RM)可以提供有价值的信息。尽管可追溯标准值非常理想,但可以通过使用相对容易的有证标准物质来确定两次或两次以上检测之间的偏差估计值的差异。显然,标准物质需要在基体类型、分析物浓度等方面处于检测范围内。理想情况下,建议对覆盖整个被测检测范围的多个标准物质进行测试。当对既定检测所做的微小修正进行评价时,可以采用更容易的偏倚研究。

标准物质的重复测量值涵盖了被确认的检测允许的所有变量范围,可用于估算与任何偏倚相关的不确定度,通常会对其进行修正。

与标准物质相关的不确定度将控制在不大于样本测量值不确定度的三分之一范围内。

A.1.3 校准

标准物质通常作为纯物质用于检测的测量阶段的校准。检测的其他组成部分当然不包括在内,例如样品消解、分离和衍生化,而分析物的损耗、污染和干扰及其相关的不确定度作为检测确认的一部分进行处理。与标准物质纯度相关的不确定度将贡献测量的总不确定度。例如,经认证纯度为99.9%的标准物质,其扩展不确定度 $U(k=2)$ 为0.1%,将为整个测量不确定度预估贡献0.1%的不确定度分量。

在痕量物质分析的情况下,这种不确定度水平的重要性不大,但对于分析工作来说,可以预见其具有重大意义。

其他一些检测,如X射线荧光(XRF)分析,使用基体标准物质来校准整个分析过程。除了基体的高度匹配外,样本和标准物质中的分析物形式也将相同,而且标准物质的分析浓度将设计为覆盖样本的分析浓度。

ISO指南32和参考文献10提供了额外的有用信息。

A.1.4 质量控制和质量保证(QC&QA)

对于内部质控,可以放宽对认定特性值的要求,但充分的均匀性和稳定性是必需的。类似的要求适用于用于确定不同实验室的测量结果是否一致的样本。在能力验证的情况下,均匀性至关重要,且验证时间范围内的样本稳定性会进行评定并受到控制。尽管能力验证可取,但对能力验证样本的特性值进行认证的成本通常会阻碍这一工作,且通常使用一致性平均值替而代之。因此,能力验证方案中使用的赋值值的可靠性经常存疑。这是因为,尽管一组数据的一致性平均值有值,但“大多数”并不一定正确,所以这些值带有某种未披露的不确定性因素。因此,对能力验证数据的解释需谨慎。

A.2 标准物质适当性的评定

如前所述,关键质量参数是与认定值相关的不确定度和不确定度估计值的可靠性。不确定度预估采用ISO方法计算。“认证”数据将与扩展不确定度(U)一起进行声称,使用覆盖系数 $k=2$,置信水平约为95%。

然而,通常无法获得完整的不确定度数据,因此应考虑其他质量标准。此外,非专家人员可能无法全面评定“认证”数据,需要质量检查清单或第三方质量审批系统。这些系统正在开发中,但需要一段时间才能完全建立起来。

A.3 证书和支持性报告

理想情况下,将提供符合ISO指南31的证书以及符合ISO指南35且涵盖表征、认证和统计分析程序的报告。然而,许多标准物质,特别是较旧的物质和并非作为标准物质专门生产的物质,可能不完全符合ISO指南31和35。任何形式的替代等效信息,只要能够提供可靠的符合性证明,就可以被视为可以接受。例如:技术报告、贸易规范、期刊论文或科学会议报告以及与供应商的通信。

附 录 B
(资料性)
人基因组标准物质

B.1 人基因组标准物质的使用

ISO指南32和33中提供了关于有证标准物质(CRM)和标准物质(RM)使用的更详细说明。

评定人类基因组物质(hGM)适用性的方案如图B.1所示,并在下文进行了讨论。用户应根据客户和分析要求评定任意一种标准物质的适当性和适合性。需要考虑的因素包括:

a) hGM的适用性取决于分析规格的细节。基体效应和诸如碎片化等的其他因素可能很重要。需要考虑的因素包括:

- 1) 包括分析物的被测量
- 2) Measurement range (call and/or depth) 测量范围(广度和/或检测深度)
- 3) 基体匹配和潜在干扰
- 4) 样本量
- 5) 均匀性和稳定性
- 6) 多重分析中的组合测量不确定度
- 7) 赋值程序(测量和统计)

b) 不确定度数据的有效性,包括关键程序是否符合ISO指南35和GUM[17]。

c) 生产商和材料的跟踪记录。例如,当使用的hGM接受实验室间比较、通过使用不同方法进行交叉检查,或者有多年在多个实验室使用的经验时。

d) 符合ISO指南31的报告的可用性。

所有或部分要求将在客户和分析规格中详细说明,但通常要求分析师使用专业判断。

最后,质量不一定等同于小的不确定度,需要使用适合性标准。

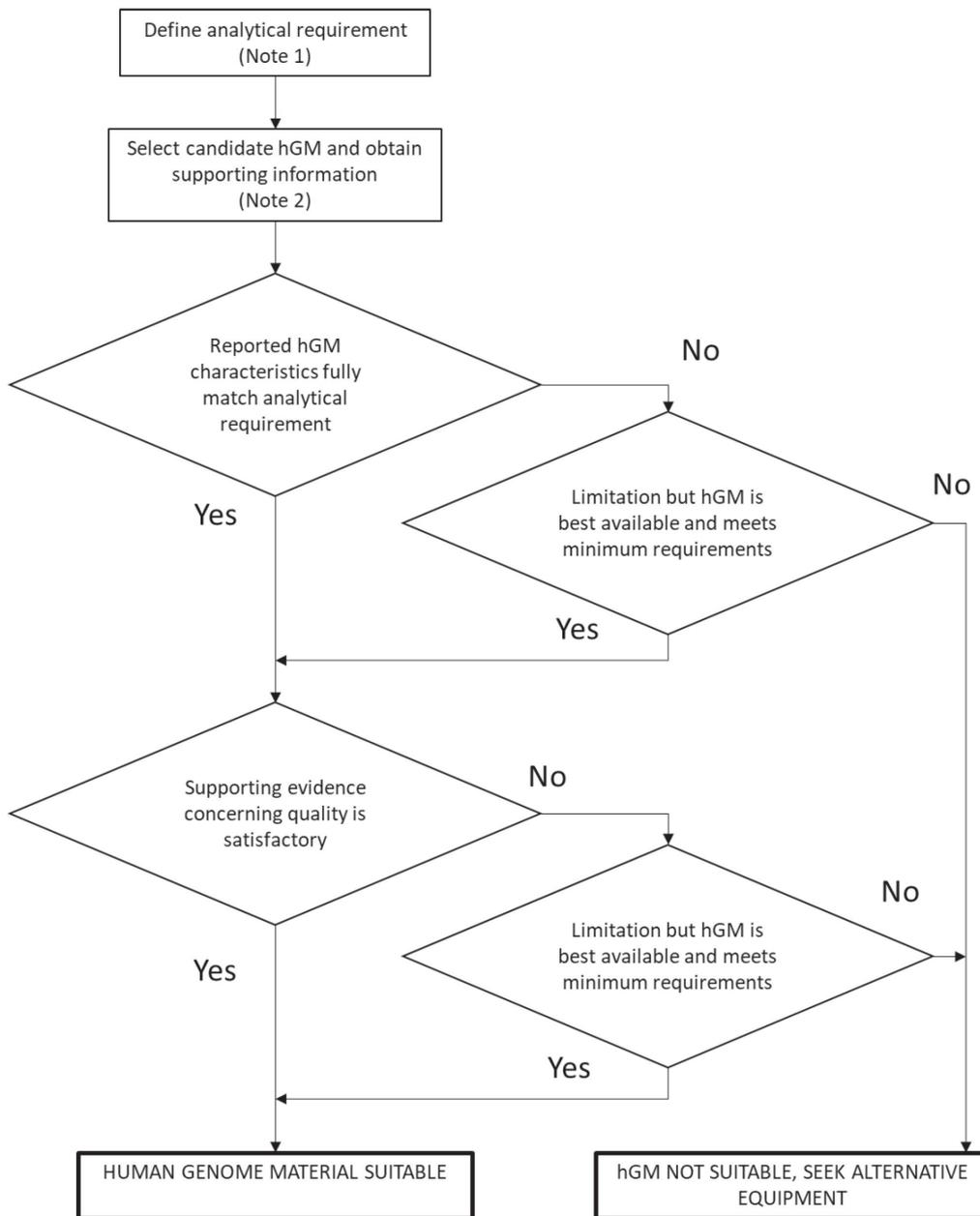


图 B.1 一人基因组材料的适用性的评定

B.2 证书和支持性报告

B.2.1 证书和支持性报告

理想情况下，将提供符合ISO指南31的证书以及符合ISO指南35且涵盖表征、认证和统计分析程序的报告。然而，许多标准物质，特别是较旧的物质和并非作为标准物质专门生产出来的物质，可能不完全符合ISO指南31和35。任何形式的替代等效信息，只要能提供可靠的符合性证明，就可以被视为可以接受。例如：技术报告、贸易规范、期刊论文或科学会议报告以及与供应商的通信。

B.2.2 人基因组材料的适用性的评定

实验室能够解释和证明选择所有hGM的依据,以及任何决定不使用不合格hGM的依据。在缺乏具体信息的情况下,无法评定hGM的质量。进行评定需要的严格程度取决于测量的关键性、技术要求的水平以及特定hGM对测量有效性的预期影响。只有当hGM的选择显著影响测量结果时,才需要进行正式的适用性评定。

B.3 人基因组材料的内部制备

高质量hGM的生产要求严格,成本居高,如果材料可以从其他来源获得,那么实验室自制通常不划算。然而,当实验室需要自制时,指南可以用来帮助非专业实验室制备hGM。

需要考虑的关键点包括以下:

- 材料的选择,例如适当性、天然材料与加标样品、材料制备等,
- 均匀性测试、制备和包装,例如均匀性、污染、稳定性等,
- 稳定性测试、认证研究、不确定度估计、文件编制和质量保证、认证批准、保存和分发。

参 考 文 献

- [1] ISO 15189:2012, Medical laboratories — Requirements for quality and competence
- [2] ISO 21474-1:2020, In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids — Part 1: Terminology and general requirements for nucleic acid quality evaluation
- [3] ISO 20395, Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR
- [4] CLSI, Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays Approved Guideline CLSI document MM17-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008
- [5] CLSI, Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine Approved Guideline—Second Edition CLSI document MM09-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2014.
- [6] ISO 21569:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods
- [7] 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
- [8] ISO 21571:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction
- [9] ISO 20837:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for sample preparation for qualitative detection
- [10] ISO 20838:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for amplification and detection for qualitative methods
- [11] ISO 21570:2005, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods
- [12] ISO 22118:2011, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens — Performance characteristics
- [13] ISO 22119:2011, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions
- [14] ISO 17511:2020, In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples
- [15] ISO/TS 20914:2019, Medical laboratories — Practical guidance for the estimation of measurement uncertainty
- [16] Roy S et al. , Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2018. PMID: Review.29154853
- [17] Guide to the expression of uncertainty in measurement. SO/BIPM/IEC/IFCC/ IUPAC/IUPAP/IOML, First Edition, 1995
- [18] ISO Guide 31:2015, Reference materials — Contents of certificates, labels and accompanying documentation
- [19] ISO GUIDE 32:1997 Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials
- [20] ISO Guide 33:2015, Reference materials — Good practice in using reference materials

[21] ISO Guide 35:2017, Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability