

# 实验室自建分子诊断项目基本要求 专家共识

中国医师协会检验医师分会分子诊断专家委员会

随着分子诊断技术飞速发展,分子诊断在疾病预防、诊断、个体化药物治疗、疗效观察、预后、健康管理等方面发挥着越来越重要的作用,对临床医疗的贡献度也越来越大<sup>[1-2]</sup>。但目前我国各级医疗机构能够提供给临床的检测项目十分有限,主要集中在传染性、少量遗传性疾病和肿瘤相关基因检测等方面,与国外实验室开展项目的差距十分巨大。许多临床上急需的项目市场上缺乏产品供应,有些疾病因相对局限或较少、厂家投入产出比过低,生产厂商缺乏开发产品的积极性<sup>[3-4]</sup>。这些因素一方面限制了我国医学的创新和发展,另一方面,也造成了许多患者得不到及时的诊断治疗。解决这一矛盾,按照国家《药品管理法》的要求和发达国家的一贯做法,允许有资质、有条件、符合要求的实验室在有效监管、确保质量的前提下,开展少量临床确有需求,但市场无合格产品供应的自建项目是一个合理的解决办法之一。

实验室自建方法(laboratory developed tests, LDTs)是指由实验室内部研发、确认和使用、以诊断为目的的体外诊断方法。仅限于本实验室内使用,不得在市场销售,也不得转移到其他实验室使用<sup>[5-8]</sup>。做好实验室自建分子检测项目(laboratory-developed molecular tests, LDMTs),使其既能满足临床日益增长的分子诊断需求,又符合我国行政管理规范的要求。

## 一、LDMTs 的监管要求

### (一) 实验室资质以及环境要求

1. 实验室资质:分子诊断实验室应通过卫生计生行政部门认可的临床基因扩增实验室审核验收,并在有效期内。

2. 实验室环境要求:要求达到国家相关临床基因扩增实验室要求。

### (二) 人员要求

1. 开展 LDMTs,实验室应该有相应团队(应至少包括具有检验等相关专业的博士学位并具有相关研究经验和工作基础的研究人员 1 名,临床相关专业中级以上医师 1 名,检验相关专业中级以上检验技师 1 名)。

2. 自建分子诊断项目负责人应至少具有副高级以上专业技术职称、博士学位、并从事分子诊断工作至少 3 年。

3. 分子诊断实验室操作人员应经过有资质的培训机构培训合格取得上岗证。

4. 签发分子病理报告的医师应至少具有中级病理学专业技术职务任职资格,并有从事分子病理工作的经历。

### (三) 管理要求

1. 开展 LDMTs 项目之前,应有相关临床科室的申请、医务机构的审批以及医院伦理委员会的同意。

2. 应通过相关行政管理机构组织的同行专家委员会的评议,或经所在地省、自治区、直辖市人民政府相关行政部门审核同意。

3. 通过初次评议的项目在试运行一年后,宜申请相关行政管理机构组织的同行专家委员会的再评议,通过再次评议的项目,正式运行。

4. 通过再次评议的项目,宜接受每 3 年一次的复评审,用以监督该项目的运行情况。

5. 停用项目的标准和措施:一旦造成医疗纠纷或进入司法程序,相关单位的 LDMTs 项目应立即停止使用,并进入紧急审核程序,通过相关行政管理机构组织的同行专家委员会的评议后,项目方可恢复检验。

6. 实验室须建立相应的程序和管理制度。

### 二、质量控制的基本要求

(一) 应不低于国家标准、行业标准、地方法规要求,如《医疗机构临床实验室管理办法》、《CNAS-CL36 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》等。

(二)开展 LDMTs 项目临床应用检测之前,应进行性能确认<sup>[9-12]</sup>。

(三)实验室自建分子诊断项目中,涉及的市售试剂耗材的质量保证,应不低于国家标准、行业标准和地方法规要求。

(四)定性检测项目,每次实验应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控物。如为基因突变、基因多态性或基因型检测,则应包括最能反映检测情况的突变或基因型样品,每批检测的质控至少应有一种基因突变或基因型,并建议在一定周期内涵盖所有的基因型<sup>[13]</sup>。

(五)定量检测项目,每次实验应设置高值、中值和低值质控物。

(六)应参加通过认可的能力验证计划提供者提供的能力验证计划。

(七)在没有能力验证提供的情况下,通过与其他实验室(如已获认可的实验室、使用相同检测方法的实验室、使用配套系统的实验室)比对的方式确定检验结果的可接受性时,应满足如下要求:

1. 规定比对实验室的选择原则。

2. 样品数量:至少 5 份,包括正常和异常水平或不同常见基因突变或基因型;频率:至少每年 2 次。

3. 判定标准:至少应有  $\geq 80\%$  的结果符合要求。

4. 实验室使用两套及以上检测系统检测同一项目时,应有比对数据表明其检测结果的一致性,比对频次每年至少 1 次,样品数量不少于 20 份,浓度水平应覆盖测量区间,计算回归方程,系统误差应  $< \pm 7.5\%$ 。应定期(至少每年 1 次,每次至少 5 份临床样品)进行检验人员的结果比对、考核并记录。使用不同生物参考区间的检测系统间不宜进行比对<sup>[14]</sup>。

### 三、LDMTs 性能确认的基本要求

对于 LDMTs 涉及的方法学性能评价,需要进行“确认试验(validation)”<sup>[9-12]</sup>。主要为了验证本试验在临床使用中的各项性能指标及其实际效果,这些指标并不是现成的,需要确认实验完成。其观察的指标可以概括为 PARR + AS + AS,即:准确性(accuracy)、精确性(precision)、参考范围(reference range)、可报告范围(reportable range)、分析敏感性(analytic sensitivity)和分析特异性(analytic specificity)等<sup>[15]</sup>。除此之外,还需要进行临床验证

(clinical validity)<sup>[12]</sup>。

### 四、LDMTs 的方法学确认的技术指标

1. 准确性(accuracy):对定量分析,准确性指的是“接近真实值”,而对于定性分析,准确性则是指与比对试验或者标准方法检测结果的相关性。

确认方法:准确性的评估可以使用参考物质进行评定,或者与另一种临床上有连续性并被普遍接受的方法(所谓“金标准”)进行比对。在缺乏金标准的情况下,可以引用参考文献作为指导。用于确认的标本通常选用与临床检测同类的标本。样品数  $n \geq 20$ ,浓度应覆盖测量区间。定性结果一致性宜大于 90%,定量结果一般可接受为不能超过对照方法平均含量的 3 个标准差或者 15% 变异度<sup>[10-12]</sup>。

2. 精确性(precision):精确性是指规定条件下所获得独立测量结果的接近程度,评价检测技术的重复性。包括同一批标本用同一种方法同一种仪器的精密度(repeatability),以及不同日间、操作者、不同仪器、不同实验之间的精密度(reproducibility)。

确认方法:因需考虑安排不同的操作者、不同批号的试剂以及不同型号的仪器来进行多次的重复操作,一般建议确认一项分子检验方法的精密度大致需要 20 个工作日。在选择待测标本用于确认实验时,一般用高和低 2 个不同含量标本来进行,并接近检测限。标本类型、取样与储存条件应尽量符合待测的临床标本。目前尚缺乏统一的国际参考标准来确定临床诊断实验室可普遍接受的精密度范围。对于定性试验,判断结果的一致性,一般符合率应该大于 90%。对于定量试验,一般确认实验可接受的精密度为不能超过已知靶分子平均含量的 3 个标准差或者 15% 变异度<sup>[10-12]</sup>。FDA 建议变异度不能超过 20%<sup>[6,13]</sup>。CNAS 的要求则以能力验证/室间质评评价界限(靶值  $\pm 0.4$  对数值)作为允许总误差(TEa),重复性精密度  $< 3/5TEa$ ;中间精密度  $< 4/5TEa$ <sup>[14]</sup>。

3. 参考范围(reference range):指特定人群检测结果的预计数值范围,等同于参考区间或者正常参考值范围,其数据来源于不存在可能影响检测结果疾病的人群的样本。

确认方法:对于大部分检测项目,正常参考范围与异常值范围都是在前期研究中就已经明确,目的是为了给特定患者群体确定正常数值范围。对于定性试验,参考范围可以是阴性、正常、无克隆性增生,或者其他能够表明检测结果是否正常的用词。需要注意的是,某些检测项目是没有参考范围的。如对

于 HCV 阳性样本的 HCV 基因分型检测,就无法在所有 HCV 已知基因型中选出一个“正常”的基因型。

4. 可报告范围 (reportable range): 可报告范围是指当仪器、试剂或系统的测量反应为有效时的检测结果范围。简单地说,报告范围包括所有可能被报告的结果。

确认方法:对于定性测试,应包括所有的报告结果(如野生型纯合子、突变型杂合子或纯合子)。对于定量试验,实验室必须明确定量分析中的分析测量范围(analytic measurement range, AMR)是指待测样品在未被稀释、浓缩或其他不属于常规检查步骤部分的预处理条件下,一种方法可直接测量待测样品值的范围。因为可以稀释样品,报告范围可能大于 AMR<sup>[10-12,16-17]</sup>。

5. 分析灵敏度 (analytic sensitivity): 检测系统或方法可检测的最低分析物浓度称为分析灵敏度或检测限。在分子检测领域,分析敏感性是指用该项分子测试技术能够测到生物标本中待测靶核酸分子的最低含量。定性实验中,分析灵敏度常用“最低检测限(limit of detection, LoD)”来表达。这种检测限指能连续在同一个标本中测到靶核酸的可能性在统计学上概率 $\geq 95\%$ 。定量实验中,多用“定量限(limit of quantitation, LoQ)”来表示。与 LoD 不同,LoQ 表示一个能够检测出的靶物质在标本中的最高和最低的量。对于某些分子检测方法来说,LoD 与 LoQ 相同。但由于 LoD 不需要考虑是否在线性范围内,所以 LoD 常常比 LoQ 还要低。

确认方法:通常通过一系列稀释已知含量的靶病原体或分子来分析最低检测限。在同一个实验条件下并用同一个批号的制剂,重复测定已稀释至最低浓度的标本,重复测定来自临床的 5 个标本,60 个结果,CV 值小于指定标准视为接受<sup>[10-12,16-17]</sup>。

6. 分析特异性 (analytic specificity): 是指该方法本身能够检测出特定待测核酸分子的能力。与其他相关的核酸分子的交叉反应和标本条件的变化是否对待测分子的检测造成影响。分子测定方法的交叉反应多来源于其他有相关或类似的核酸分子。干扰物质是指标本中其他非靶分子物质对待测的靶分子检测正确性的影响。在生物样本中,内源性干扰物质除去包括常见的血液中的血红素、胆红素、三酯甘油外,还有很多肉眼不能观察到的与疾病有关的代谢产物等。外源性干扰物常见于采集和处理标本过程中的污染。例如:采样管含有的抗凝剂、防腐

剂、稳定剂,手套上的滑石粉以及核酸分子提取纯化过程中残留的试剂。

确认方法:评价分子检测方法的交叉反应性,首先要获得尽可能多的可能与特定待测靶分子发生交叉反应的分子核酸序列并加以分析。如果在所测的标本中存在某些结构和核酸序列相近的病原体或内源性生物分子,应对这些病原体和生物分子进行验证评价。干扰物的作用是抑制正常 PCR 反应,使结果偏低,从而造成假阴性。最常见的验证方法之一是在验证实验的过程中加入一个已知的 PCR 反应对照。在测定过程中,如果 PCR 反应对照未发生扩增或扩增产物量低于预期值范围,即可证实有干扰抑制物在该标本中存在<sup>[18]</sup>。

7. 临床验证 (clinical validity): 临床验证是确定某种分子检测技术检出核酸分子诊断疾病的能力。临床验证的目的是评价这种新的分子检测技术是否适合于特定的临床疾病的诊断。临床敏感性不同于分析敏感性:分析敏感性主要指参考方法检测结果为阳性的结果中,用实验方法得到阳性结果的一致性;临床敏感性主要指结果为真阳性的人群中真正罹患某种疾病或异常的比例,强调实验结果与临床诊断的一致性。同样的,临床特异性也不同于分析特异性,分析特异性主要指参考方法检测结果为阴性的结果中,用实验方法得到阴性结果的一致性。临床特异性主要指实验结果为真阴性的人群中真正没有罹患某种疾病或异常的比例<sup>[12]</sup>。也强调实验结果与临床诊断的一致性。值得注意的是在评价某些罕见的疾病,由于阳性病例的数量有限,实验室进行临床敏感性评价存有一定难度,这时可以引用文献报道的临床敏感性和特异性作为理论支撑。正常对照容易收集,比较容易实现临床特异性的评价。

分子诊断项目分析前、中、后质量按相关要求执行,国家有相关规定的按相关规定执行。

编写组成员(按姓氏汉语拼音顺序排序):李敏(上海交通大学附属仁济医院),刘维薇(上海同济大学附属第十人民医院),王华梁、肖艳群(上海市临床检验中心)

中国医师协会检验医师分会分子诊断专家委员会成员:顾问:张曼(中国医师协会检验医师分会会长),主任委员:王华梁,副主任委员:崔巍、关明、潘世杨

委员(按姓氏汉语拼音顺序排序):潘世杨(江苏省人民医院检验医学部)、傅启华(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心检验科)、邓芳(安徽省肿瘤医院检验科)、陶志华(浙江大学医学院附属第二医院检验科)、李伯安(中国人民解放军第三〇二医院检验科)、李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科)、刘维薇(上海市第十人民医院

检验科)、姜加陶(上海市胸科医院检验科)、关明(复旦大学附属华山医院检验医学科)、邱广斌(中国人民解放军第二〇二医院检验科)、肖艳群(上海市临床检验中心分子生物学室)、张曼(首都医科大学附属北京世纪坛医院检验科)、郑磊(南方医科大学南方医院检验科)、陈鸣(第三军医大学附属大坪医院检验科)、陈晋(上海市肺科医院检验科)、陈国千(江苏省无锡市人民医院医学检验科)、尚世强(浙江大学附属儿童医院)、邹琳(重庆医科大附属儿童医院临床分子医学中心)、崔巍(中国医学科学院北京协和医院检验科)、应斌武(四川大学华西医院实验医学科)、袁宏(大连医科大学附属第一医院)、王华梁(上海市临床检验中心)、王伟灵(上海中医药大学附属上海市中西医结合医院检验科)。

**特邀专家**(按姓氏汉语拼音顺序排序):柏乾明(复旦大学附属肿瘤医院病理科)、鲍芸(上海市临床检验中心分子生物学室)、马展(上海市儿童医院检验科)、方园(上海瑞金医院胰腺疾病研究所)、丁春明(温州医科大学)、陶炯(上海国际妇婴保健院生殖遗传中心)、谭龙益(上海市第一人民医院宝山分院检验科)、郦卫星(浙江省临检中心)、林勇(复旦大学附属华山医院检验医学科)、林萍(上海市精神卫生中心检验科)、蒋玲丽(上海市临床检验中心分子生物学室)、徐翀(上海市临床检验中心临床免疫室)、徐晨明(上海国际妇婴保健院生殖遗传中心)、郑江华(上海市公共临床卫生中心检验科)、赵虎(复旦大学附属华东医院检验科)、蔡贞(南方医科大学南方医院检验科)、蔡枫(上海市中医医院检验科)、杨莉萍(北京医院药学部)、应春妹(复旦大学附属妇产科医院检验科)、杨卓(中国医学科学院北京协和医院检验科)、王鹤尧(北京妇产科医院精准医学中心)、王蕾(上海中医药大学附属龙华医院检验科)、王皓(第二军医大学附属长征医院实验诊断科)、王雪亮(上海市临床检验中心分子生物学室)、吴冰冰(复旦大学附属儿科医院儿科研究所)、王慧君(复旦大学附属儿科医院儿科研究所)、周小燕(复旦大学附属肿瘤医院病理科)。

### 参 考 文 献

- [1] Pont-Kingdon G, Gedge F, Wooderchak-Donahue W, et al. Design and analytical validation of clinical DNA sequencing assays [J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(1): 41-46. DOI: 10.5858/arpa.2010-0623-OA.
- [2] Louis DN, Virgin HW, Asa SL. "Next-generation" pathology and laboratory medicine[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(12): 1531-1532.
- [3] Jennings L, Van DV, Gulley ML. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests[J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(5): 743-755. DOI: 10.1043/1543-2165-133.5.743.
- [4] Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(12): 1276-1288. DOI: 10.1038/ejhg.2010.101.
- [5] Secretary's Advisory Committee on Genetics, Health, and Society (SACGHS). U. S. system of oversight of genetic testing: a response to the charge of the Secretary of Health and Human Services. Washington (DC): Department of Health & Human Services; 2008 Apr. 276 p.
- [6] Federal Register. June 17, 2010. 75: 34463-34464. FDA/CDRH Public Meeting: Oversight of Laboratory Developed Tests (LDTs).
- [7] Weiss RL. The long and winding regulatory road for laboratory-developed tests[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 138(1): 20-26. DOI: 10.1309/AJCP6OAU3CMFEJ.
- [8] Ferreira-Gonzalez A, Emmadi R, Day SP, et al. Revisiting oversight and regulation of molecular-based laboratory-developed tests: a position statement of the Association for Molecular Pathology[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(1): 3-6. DOI: 10.1016/j.jmol dx.2013.10.003.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Good laboratory practices for molecular genetic testing for heritable diseases and condition[J]. MMWR Recomm Rep, 2009, 58(RR-6): 1-37.
- [10] Guzel O, Guner EI. ISO 15189 accreditation; Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4-5): 274-278. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.011.
- [11] Yanikkaya-Demirel G. ISO 15189 accreditation; Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory II [J]. Clin Biochem, 2009, 42(4-5): 279-283. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.09.099.
- [12] Jennings L, Van DV, Gulley ML, et al. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests[J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(5): 743-755. DOI: 10.1043/1543-2165-133.5.743.
- [13] Joly Y, Koutrikas G, Tassé AM, et al. Regulatory approval for new pharmacogenomic tests: a comparative overview [J]. Food Drug Law J, 2011, 66(1): 1-24, i.
- [14] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL36:2012 医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [15] Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays [J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(1): 11-13. DOI: 10.5858/arpa.2011-0212-ED.
- [16] Allen TC, Hammond ME, Robboy SJ. Quality and the college of american pathologists [J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(11): 1441. DOI: 10.5858/arpa.2011-0287-SA.
- [17] Vance GH. College of american pathologists proposal for the oversight of laboratory-developed tests[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(11): 1432-1435. DOI: 10.5858/arpa.2011-0304-SA.
- [18] Raymaekers M, Smets R, Maes B, et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays [J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(3): 145-151. DOI: 10.1002/jcla.20307.

(收稿日期:2016-05-30)

(本文编辑:唐栋)