旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于下一代测序（NGS）的体外诊断产品（IVD）设计、开发和分析确认考虑因素

利益相关者和美国食品药品监督管理局工作人员指南

**文件发布日期：2018年4月13日。**

**文件草案发布日期：2016年7月8日。**

如对本文件有关CDRH监管器械的疑问，请致电301-796-6206联系Zivana Tezak，或请致电240-402-1592或发送邮件至OIRPMGroup@fda.hhs.gov联系Adam Berger。有关本文件适用于CBER监管器械的疑问，请致电1-800-835-4709或240-402-8010或发送邮件至ocod@fda.hhs.gov联系CBER交流、外联和发展办公室。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | **美国卫生与公众服务部**  **美国食品药品监督管理局**  **医疗器械和放射健康中心**  **生物制品评价和研究中心** |

**前言**

**公众意见**

电子版意见和建议可随时提交至 [https://www.regulations.gov，供FDA审议。](%20https://www.regulations.gov，供FDA审议。)可将书面意见提交至：美国食品药品监督管理局备案文件管理部（5630 Fishers Lane, Room 1061, (HFA-305）, Rockville, MD 20852）。所有意见均应注明备案文件编号FDA-2016-D-1233。下次修订或更新本文件前，FDA可能不会对意见采取行动。

**更多副本**

**医疗器械和放射健康中心（CDRH）**

更多副本可通过互联网获取。贵司也可以通过电子邮件发送请求至[CDRH-Guidance@fda.hhs.gov](mailto:CDRH-Guidance@fda.hhs.gov)获取本指南的副本。请在申请中提供文件编号16009和完整的指南标题。

**生物制品评价和研究中心（CBER）**

更多副本可通过以下途径获取：寄送信函至生物制品评价和研究中心（CBER）、交流、外联和发展办公室（OCOD），（10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Room 3128, Silver Spring, MD 20993-0002），或致电1-800-835-4709或240-402-8010，或发送电子邮件至[ocod@fda.hhs.gov](mailto:ocod@fda.hhs.gov)或登录网址：  
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm。>

**目录**

[I. 引言 1](#_Toc98752458)

[II. 背景 3](#_Toc98752459)

[III. 范围 4](#_Toc98752460)

[V. 旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的要素 6](#_Toc98752461)

[VI. 旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的设计、开发和确认建议 7](#_Toc98752462)

[A. 检测设计考虑因素 8](#_Toc98752463)

[1. 检测的使用适应证声明 8](#_Toc98752464)

[2. 用户对检测的特定需求 8](#_Toc98752465)

[3. 试样类型 9](#_Toc98752466)

[4. 基因组的测定部位 9](#_Toc98752467)

[5. 性能需求 10](#_Toc98752468)

[6. 检测要素和方法 10](#_Toc98752469)

[B. 检测性能特点 13](#_Toc98752470)

[1. 准确性 13](#_Toc98752471)

[2. 精密度（再现性和重复性） 16](#_Toc98752472)

[3. 检测限（LoD） 17](#_Toc98752473)

[4. 分析特异性 17](#_Toc98752474)

[C. 检测运行质量度量 18](#_Toc98752475)

[1. 覆盖度（读取深度和完整性） 18](#_Toc98752476)

[2. 检测运行度量和性能阈值 19](#_Toc98752477)

[D. 性能评价研究的一般建议 22](#_Toc98752478)

[E. 补充规程 25](#_Toc98752479)

[F. 变体标注和筛选 25](#_Toc98752480)

[G. 介绍说明书的检测性能 26](#_Toc98752481)

[H. 检测报告 28](#_Toc98752482)

[VII. 修改 29](#_Toc98752483)

[VIII. 审评器械设计和生产变更的建议 31](#_Toc98752484)

[IX. 附加资源 33](#_Toc98752485)

[X. 附录A 35](#_Toc98752486)

旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于下一代测序（NGS）的体外诊断产品（IVD）设计、开发和分析确认考虑因素

利益相关者和美国食品药品监督管理局工作人员指南

|  |
| --- |
| 本指南代表美国食品药品监督管理局（FDA）对该主题的当前看法。本文件不赋予任何人任何权利，对FDA或公众不具有约束力。如果替代方法满足适用的情形和法规的要求，则贵司可使用替代方法。如需讨论替代方法，请联系标题页所列负责本指南的FDA工作人员或办公室。 |

I. 引言

基因组检测领域不断变化，依托不断增加的数据量和快速发展的技术基础。尽管目前的监管方法适用于测量与疾病或病症有关的有限数量分析物的常规诊断，但基因组检测中采用的新测序技术可以一次检测数百万DNA变体，因此，需要采取灵活的监督方法，以适应这些新颖且不断发展的检测。FDA的目的是优化其对下一代测序（NGS）*体外*诊断（IVD）检测产品的监管方法，以支持在基因组医学中快速发展的新技术的需求，同时满足其关键任务，确保医疗器械具有合理的安全性和有效性。

FDA的愿景是利用适当的标准、质量体系控制和社区临床有效性评估来简化上市前审评流程，从而开发和验证基于NGS的检测产品，并供临床使用。本指南文件描述了FDA为监督基于下一代测序（NGS）的检测而确定灵活且可调整的监管方法所付出的部分努力。

作为实现该愿景的一个步骤，FDA概述了设计、开发和确定基于NGS的检测产品用于全外显子组人类DNA测序（WES）或靶向人类DNA测序分析有效性的主要考虑因素，旨在帮助诊断疑似种系疾病或其他疾病的有症状个体（以下简称为“旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品”或“基于NGS的检测产品”）。这些考虑因素是基于FDA迄今为止对基于NGS的检测产品的总体审评经验、FDA对适合此类检测的设计和分析验证考虑因素的了解以及与社区的广泛互动。

在本文件中，“种系疾病或其他病症”一词包括由遗传或*初始*种系变体引起的遗传疾病或其他疾病。疑似种系疾病的体征和症状的示例可能包括发育迟缓、先天性畸形或其他临床特征。本指南未阐述健康个体测序检测。

FDA希望本指南中的建议既能直接帮助检测开发机构，又能为社区专家提供制定公认标准所需的信息。FDA制定了成功且广泛使用的标准认可计划，该计划促进了公认标准的应用，以满足器械上市前书面意见的要求。最终，如果社区制定了旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的相关公认标准，并得到FDA的认可，那么，检测开发机构可以在上市前书面意见中证明符合此类标准，这将大大简化审评过程。FDA乐于制定标准，以阐述本指南所述内容以外的考虑因素，因为随着技术及其应用的发展，专家群体可以定期更新标准。

此外，FDA认为本指南中的建议和/或涉及这些建议的标准，有可能构成特殊控制的依据，从而合理地保证这些检测的安全性和有效性（关于体外诊断，这通常意味着分析和临床有效性的合理保证），允许旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品有可能通过初始过程而被归类为第二类器械。如果被归入第二类器械，随后可能由经认可的第三方组织通过510（k）计划对旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品进行审评。[[1]](#footnote-0)FDA希望，符合FDA认可的包括性能标准的稳健标准将最终为分析有效性提供充分保证，这样，只要也有临床有效性的充分保证（例如，通过FDA认可的数据库，其中包含足够的、经过严格审评的、可公开获取的有效科学证据）和适当的说明书（见21 CFR 801和21 CFR 809.10，以及下列第VI.G节和第VI.H节的适用章节），FDA可以考虑将来完全免除这些检测的上市前审评。

FDA指南文件，包括本指南，并未规定具有法律强制力的责任。相反，指南描述了FDA对该主题的当前看法，除非引用了具体监管或法定要求，否则应仅视为建议。FDA指南中使用的“应该（should）”一词指建议或推荐进行某一事项，并非强制要求。

II. 背景

FDA致力于实施灵活且可调整的监管和监督方法，以促进创新，同时保证患者的检测结果是准确且有意义。

虽然大多数体外诊断通常旨在检测有限数量的预定义分析物，以诊断预先指定的病症，但基于NGS的检测产品可以测量与众多病症有关的数百万分析物（即碱基），并有可能检测出以前未识别的变体。此外，基于NGS的检测产品通常具有广泛的预期用途，并且往往在检测实施后才会知晓具体的变体以及反馈的这些检测临床信息性质。FDA在针对基于NGS的检测产品制定适当的监管方法时遇到了挑战，并已在一些讨论文件中已经考虑到了与潜在解决方法有关的问题和想法。这些讨论的核心是，符合用于分析确认基于NGS的检测产品的适当既定标准是否有助于提供更有效的监管和监督。

2015年2月20日，FDA召开了题为“优化FDA对下一代测序诊断检测的监管和监督”的公开研讨会，讨论并听取社区利益相关者关于使用NGS技术进行人类遗传学或基因组学检测的可能监管方法的反馈。[[2]](#footnote-1)根据收到的反馈，FDA于2015年11月12日召开了题为“基于标准的下一代测序体外诊断检测的分析性能评估方法”的第二场公开研讨会。[[3]](#footnote-2)FDA还于[2015年11月13日](http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/default.htmhttp:/www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm459450.htm)召开了与使用基因数据库有关并题为“使用数据库确立人类基因变体的临床相关性”的公开研讨会，[[4]](#footnote-3)并于2016年3月2日召开了题为“患者和医疗专业人员对基因检测结果反馈的看法”的另一场研讨会。[[5]](#footnote-4)在研讨会上获得的大部分公众反馈意见表明，用于分析确认基于NGS的检测产品的标准是一种合理方法，通过符合该标准可以允许这些检测产品的开发和验证存在差异，并可以适应NGS技术的预期快速发展。在2015年11月12日的研讨会上，一些利益相关者的意见表明，需要制定涵盖基于NGS的检测产品的设计和性能评估的标准。FDA并不知晓有任何现有的、全面的分析验证标准，适用于旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品，其认为此类标准可用于帮助提供这些检测的安全性和有效性合理保证。FDA希望本指南文件能够促成此类标准的制定。

III. 范围

本指南文件为设计、开发和验证基于NGS的检测产品（这类检测旨在帮助临床医生诊断疑似种系疾病的有症状个体）提供建议。

本文件不适用于有以下用途的基于NGS的检测产品：

• 协助诊断微生物感染，

• 无细胞DNA检测，

• 直接面向用户的用途，

• 胎儿检测，

• 微生物基因组鉴定和抗菌素耐药性和毒力标记检测，

• 植入前胚胎检测，

• 风险评估，

• 风险预测，

• RNA测序，

• 筛查，

• 独立诊断目的，

• 肿瘤基因组测序，

• 用作辅助或补充诊断。

有关这些用途的检测可能存在其他性能特点和/或风险考虑因素，但本指南所描述的原则可能适用于其中某些用途的检测。欢迎申办者探讨将本指南原则应用于其检测的机会。

本指南文件还探讨了FDA对基于NGS的检测产品（这类检测旨在帮助临床医生诊断疑似种系疾病的有症状个体）的未来监管愿景。

**IV. 旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的监管途径**

迄今为止，FDA已经批准了少量的单基因、特定疾病、靶向性、基于NGS的检测产品（如Illumina MiSeqDx囊性纤维化139变体分析（k124006）和Illumina MiSeqDx囊性纤维化临床测序分析（k132750））。但FDA尚未将基于NGS的检测产品归入帮助诊断疑似种系疾病的更普遍的预期用途，而且目前尚未有合法上市的同类型器械可以在《联邦食品、药品和化妆品法案》（FD&C法案）（《美国法典》第21篇第360（k）条）第510（k）条上市前通知中作为审评此类基于NGS的检测产品的同品种器械。因此，根据法律规定，此类检测被自动归入第III类，并且此类检测目前须遵守上市前批准申请（PMA）的要求。[[6]](#footnote-5)

如果没有现有同品种器械，低至中度风险的器械也可以通过初始分类过程进入市场。[[7]](#footnote-6)FDA认为，通过一般控制和特殊控制相结合，可以充分降低与基于NGS的检测产品有关的风险，以帮助诊断疑似种系疾病，这是合理可行的。因此，此类检测可能为初始分类过程的合适对象。提交初始分类请求的申请人应在上市前申请中提供，旨在证明一般控制措施或一般控制和特殊控制措施，足以为其检测提供合理安全性和有效性保证的信息。如果FDA批准了旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的初始请求，并将此类检测归入第二类，则本检测将授权上市，并可作为其他旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品未来在申请510（k）时的同品种器械。所有此类检测均受限于新分类法规中可能包含的一般控制措施和任何特殊控制措施，例如关于具体性能数据和/或说明书内容的要求。FDA鼓励申请人按照预申请过程与FDA联系，以讨论任何预期的初始要求。关于FDA预申请过程的信息，请参阅FDA指南《医疗器械申请的反馈请求：预申请计划和与美国食品药品监督管理局工作人员的会议》  
[（https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm311176.pdf）](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm311176.pdf）)。

此外，根据FD&C法案第510（m）条，如果FDA确定上市前通知对于提供该器械的安全性和有效性合理保证没有必要，那么FDA可以主动或根据相关人员的请求，豁免第II类器械遵守FD&C法案第510（k）条的上市前通知要求。随着FDA通过这些器械获得更多的经验，FDA认为，未来可能会制定特殊的控制措施，为旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品提供合理的安全性和有效性保证，可能在某些豁免条件下，无需510（k）上市前审评。

长期以来，FDA一直认为，提供其对已许可和已批准产品的审评是很重要的，以便所有相关人员（如医疗保健机构和患者）都可以了解FDA已许可或已批准的性能。为此，对于自2003年11月以来获得FDA许可或初始分类的体外诊断，FDA已经公布了一份决定摘要，其中包括对分析和临床有效性数据以及申请人为支持书面意见而提交的其他信息的审评，以及FDA批准体外诊断的理由；根据FD&C法案第520（h）条（《美国法典》第21篇第360j（h条）规定，FDA还需要公布已批准的上市前批准的安全性和有效性数据摘要。FDA认为，无论此类检测是否经过FDA审评或豁免于510（k）上市前审评，关于基于NGS的检测产品的相关信息的类似公开可及性和可获取性很重要，审评这样是为了方便患者和医疗保健机构能够获得这些有关检测能力和限制信息，从而做出充分知情的医疗决定。

V. 旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的要素

针对临床用途的基于NGS的检测产品通常包括试剂、耗材、仪器和软件。确定哪些试剂、耗材、仪器和软件适合实现特定适应证的预期目的，取决于合适的和一致功能所需的特定属性。鉴于此，任何两项基于NGS的检测在设计和工作流程方面可能有所不同。

基于NGS的检测产品可能包括以下步骤：（a）试样采集、处理和储存，（b）DNA提取，（c）DNA处理和库制备，（d）生成序列读数和碱基识别，（e）序列比对/映射，（f）变体识别，（g）变体标注和筛选，（h）变体评价和判断，以及（i）生成检测报告。其中某些项目可能并不总被视为检测的一部分，这取决于具体检测的设计。一般来说，对于每个检测要素而言，检测开发机构应该确定特定于其特殊检测的度量和验收标准。

在本指南中，“变体评价”一词指评估遗传变异与疾病或病症之间的关联证据，并是对这种关联（或缺乏这种关联）作出评估的过程。

医疗保健机构和实验室专业人员仅为诊断或治疗特定个体患者，而对已识别变体的临床意义进行的解释，不被视为检测的一部分，但某些标准操作规程（SOP），包括但不限于变体评价协议，可能将一些软件产品视为检测要素。FDA建议申请人在检测开发过程中尽早通过预申请过程讨论其特定检测。

VI. 旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的设计、开发和确认建议

以下建议与检测设计、开发和确认方式有关。作为一般原则，检测开发机构应首先定义其检测的使用适应证声明，因为这决定了检测的执行方式。在定义适当的检测性能时，开发机构应前瞻性地确定应进行的研究类型（如准确性）以及每种研究类型应达到的阈值（最低值和目标值）并且满足检测用适应证的性能需求。在设计和开发检测后，验证研究应表明是否达到了预定义的性能。如果检测未达到任何预定义的性能阈值，应该对检测进行修改和重新确认。应持续设计、开发和验证的周期，直到检测满足预定义的性能规格。在整个过程中，检测开发机构应记录所有活动、决定和结果，以及开展这些活动的理由。

FDA鼓励制定载有本条概述的设计、开发和验证活动的标准。为了使标准得到FDA的认可，[[8]](#footnote-7)除其他事项外，该标准应包括对应进行的设计活动和应验证的性能特征的描述，以及具体的方法、材料和性能阈值（视情况而定）。FDA预计，旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的开发机构可以在上市前申请中使用符合此类标准的证明，并且可能在将来代替上市前审评。但是，符合FDA认可的分析有效性标准声明是否充分，可能取决于具体的使用适应证和上市前审评的类型或豁免。

A. 检测设计考虑因素

检测符合FDA认可的标准，有助于证明基于NGS的检测产品的开发机构，确定检测使用适应证和使用设计检测开展必要活动。一项或多项设计和开发标准应涉及检测设计机构执行和记录下述活动的能力，以便产生一项持续满足适用于检测使用适应证的性能度量的检测。每项性能度量应该有预设的验收间隔或阈值（如适用）。在检测设计阶段，开发机构应确定并证明每项性能度量的最小可接受值和目标值适当，并满足检测使用适应证的性能需求。标准可以提供其他解释、示例、格式和其他信息。

1. 检测的使用适应证声明

虽然本指南适用于所有旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品，但每个检测开发机构应定义特定检测的具体适应证。

*前瞻性地定义并记录推动检测开发的特定临床需求。这通常包括具体说明、所关注的疾病或其他病症、检测的临床应用以及检测拟针对的群体（即目标群体）。定义和记录提供检测的临床环境（如果不是一般的临床环境）也可能是有参考价值的。*

此处考虑的广泛使用适应证声明下，常见的临床应用示例包括但不限于帮助诊断：具有发育迟缓或智力障碍症状和体征的儿童、未确诊的有症状患者、接受鉴别诊断的患者等。

有关目标群体的考虑因素示例包括但不限于：预计检测将提供结果的受影响人群比例，或检测所针对特定疾病或其他病症的流行率（如适用）。

2. 用户对检测的特定需求

*通过咨询、专业经验、专业指南和其他相关来源，前瞻性地确定并记录所需的特定检测特征，以保证开发出满足用户需求的检测。*特定用户将需求定义检测设计期间需要解决的关键因素。对用户需求进行优先排序可能会有所帮助，以便对最关键的需求投入最多的设计关注。在设计检测时，检测开发机构应该考虑检测用户的范围。

用户有特定需求检测的示例：用户需要在有限的周期内处理大量样品。该用户需求将有助于确定哪个下代测序平台应作为检测的一部分、如何执行复用，以及如何设计检测的其他方面。

3. 试样类型

*指定并记录检测用可接受试样类型。*

接受供检测的试样类型将引出设计问题，例如所需的采集器械类型、最小含量和数量，或在采集和使用期间为保证样本稳定性而必须遵循的任何采集条件。多种试样和采集类型可能适用于一项检测，但每种类型都应经过验证，以用于产生适当质量和数量的DNA，并用于整体检测性能。适当的试样类型可能取决于检测的用途。

试样类型包括但不限于：全血、口腔拭子。

4. 基因组的测定部位

*指定并记录通过检测进行测定的基因组部位，包括基因和变体*。

检测中测序和/或报告的基因类型将取决于特定的使用适应证，这反过来将影响检测设计和检测性能定义的各个方面。基于证据的评估，提供并证明特定适应证应包括的基因。对于某一特定适应证的已知临床相关变体，如果该变体不在通过检测而检验的部位内，应予以指定。如果关键测定部位不符合最低性能规格（例如，最低覆盖阈值），则应修改和重新验证检测，以达到最低适用阈值。

示例：一项旨在帮助诊断新生儿疑似遗传疾病的检测可能采用全外显子组测序技术，而不采用具有明确临床意义的靶向基因组。在这种情况下，可根据患者的表型、临床表现和患者先前可用的检测结果，将检测配置为仅报告通过全外显子组测序技术获得的可能与疑似疾病或其他病症相关的基因子集。例如，当根据临床表现为疑似心脏疾病时，检测可能仅报告了已知与心脏疾病相关的基因结果。

5. 性能需求

*为了*验证*性能需求，需考虑以下几点：*

*• 定义并记录应针对充分分析验证检测而进行评估的最小度量集（例如，准确性、精密度、检测限（LoD））。*

*• 根据检测的使用适应证声明和预定义的用户需求，定义并记录这些度量的适当性能阈值。*

*• 定义并记录不符合检测运行质量度量（例如，覆盖深度；见第VI.C条）的测定部位可以被纳入检测中的程度。*

*• 确定并记录辅助规程的使用（例如，家族检测、结果正交核实），因为辅助规程的使用可能会影响性能需求。*

*• 记录检测性能的可能限制。*

示例：如果试样有限（例如，试样含量小，或者无法从患者身上收集更多试样），或者如果结果无法通过正交法予以核实，则在报告结果这部位，检测的最低准确性应更高，并且应记录未报告的部位。同样，如果测定的基因组部位的一部分难以测序且无法达到性能阈值，则应将其作为检测限制予以报告，并说明可在检测设计期间采用正交方法予以核实，或可能需要在该部位有更高的覆盖率。

6. 检测要素和方法

a. 检测要素和规格

*指定并记录所有检测要素（如仪器、软件、耗材、试剂），包括规程用检测要素（例如库制备材料）和检测用一般实验室设备（例如自动液体处理器）。对于基于NGS的检测*产品*的每个步骤，根据已识别的用户需求、使用适应证声明和预定义的性能规格（例如准确性阈值），针对检测要素，设置技术规格（例如测序平台的流量）。记录每个检测要素对关键因素的限制（例如，覆盖率、复用）。*

应确定并记录基于NGS检测产品的每个要素的规格。这些规格通常由用户需求、使用适应证声明和预定义的性能阈值驱动。在某些情况下，检测设计问题可能会反馈到使用适应证声明或预定义的性能阈值中。例如，可能需要修改使用适应证声明，以适应所采用的特定测序平台施加的限制。

以下列出了基于NGS的检测产品的选定要素或步骤的建议：

i. 测序平台

*指定将使用的测序平台。*

特定测序平台应具有符合用户需求和检测使用适应证声明的特定性能特征。

ii. 对照材料和参考材料

*指定对照和参考材料，以获得检测置信度。*

这些材料应包括但不限于每个样品或每次运行的对照材料，或按需提供的其他对照材料，以确定性能质量。这些材料还可能包括检验用于诊断明确定义的疾病或其他病症的常见致病性变体的基因和疾病特异性对照材料，泛病症阳性对照材料（最常见的致病性变体），以及其他适当的对照材料和参考材料。

iii. 生物信息学

• 描述并记录数据处理及分析，包括变体识别、筛选和标注的所有规程。

• 指定并记录待使用的所有软件，包括软件来源（例如由内部开发、来自第三方）和任何修改。

• 记录软件版本和可追溯性、参考序列程序集以及编译、安装和运行生物信息学渠道所需的要素。

• 指定并记录软件是本地运行还是远程运行（例如，基于云）。

• 指定并记录将使用哪些数据库（包括适用的版本）（如有），以及这些数据库是内部数据库还是第三方数据库。

生物信息学渠道的选择应基于测序类型和检测报告的变体类型，并考虑渠道在变体识别和评价方面的任何限制。应通过记录和验证生物信息学软件在基于NGS的端到端检测中的性能，在检测设计中纳入第三方生物信息学工具。

b. 方法

*开发并记录运行检测的规程和方法。详细记录检测每个步骤的方法（例如，DNA提取、复用）。制定并记录使用仪器、耗材、试剂和辅助方法的规程。识别并记录每个步骤的限制（如有），包括对其他步骤的潜在影响。*

*识别并记录（如适用）将要使用的测序类型（例如单端测序/双端测序/配对测序）。*

应确定并记录基于NGS的检测产品的每种所需方法的规格。这些规格通常根据用户和性能规格予以定义。

以下是基于NGS的检测产品选定要素的建议列表：

i. 样品制备和输入

• 制定并记录试样处理、保存、加工、储存和拒收标准的具体方法（如适用）。

• 指定并记录用于确定DNA数量和质量的方法。制定并记录满足预定检测性能规格的最小DNA含量、数量和质量。

• 确定并记录当样品是从外部来源提取的DNA时是否可以进行检测，以及制定并记录此类外部样品的验收标准和其他要求。

ii. 复用

• 指定并记录可在单次检测中复用的、不会对报告部位的质量分数或覆盖率产生负面影响的样品数量。

• 指定并记录分子条形码的组成及其使用规程，包括任何避免条形码相冲突、错误识别或错误分类的必要规程。

• 指定并记录复用池中每个输入样品的规范化方法

iii. 库制备和靶向富集

• 制定并记录库制备和靶向富集的具体方法（例如，基于扩增子、基于捕获），如适用。

• 指定并记录性能度量（例如，目标排序、一致性、库复杂性）以及用于接受该方法的阈值。

iv. 后续规程

• 定义并记录检测运行失败（例如，由于未能满足一个或多个检测运行质量度量）时使用的规程。

• 例如，此类规程可能包括重新运行、填补未达到适当质量度量的特定部位或对检测结果进行Sanger核实。

请注意，上述列表并不全面，应记录检测的所有步骤，包括规格理由。

B. 检测性能特点

分析检测验证涉及根据一组预定义度量进行的检测分析性能测量，以证明该检测的性能是否足以满足其使用适应证，并符合预定义的性能规格。这通常涉及评价检测是否在定义的统计范围内成功识别或测量，将提供患者疾病或其他病症信息的变体是否存在。

一旦最终确定和记录所有方法，并验证检测的端到端性能，以确定检测的使用适应证，则应在临床使用期间持续监测检测性能。一般来说，作为检测设计和开发的一部分，应优化基于NGS的检测产品的各个步骤，并确认检测要素是否按预期运行，以及是否满足适用于检测使用适应证的预定义性能阈值，这点很重要。在开始临床使用该检测之前，应对基于NGS的完整检测进行整体分析验证（即，验证实验应从试样处理开始，以变体识别结束，包括性能满足预定义阈值的文件）。本条介绍了一组性能度量，在分析验证旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品时，应评估这些度量。

1. 准确性

*通过测量阳性符合率（PPA）、阴性符合率（NPA）和技术阳性预测值（TPPV）来证明准确性。针对阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值设置阈值，以确保检测符合其预定义的性能规格。根据不同情况或所使用的方法，可以制定评价准确性的其他度量。*

准确性包括确定实际值和被测对象的真实值之间的一致程度。[[9]](#footnote-8)对于基于NGS的检测产品，准确性表示从检测获得的序列和通过FDA确定的有效比较方法中，或基于NGS的检测参考样品与参考样品高置信序列之间的一致性程度，确定的相同序列之间的一致性（或符合率）程度。[[10]](#footnote-9)

对于检测所需的每种变体类型，应预定义和报告阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值点估计的最低可接受总体阈值和目标阈值以及基于NGS的检测产品的95%置信区间（CI）下限（见21 CFR第801部分和21 CFR 809.10，以及下列第VI.G节和第VI.H节的适用章节）。这些阈值将取决于检测使用的适应证和变量，例如检验到的变体类型以及是否采用正交分析法来核实变体。应使用客观证据和有效的统计技术证明阈值是合理的，并应报告此类阈值。

a. 阳性符合率

*计算并记录*阳性符合率*，即通过检测检验到的已知变体数量（真“阳性”（TP））除以检测到的已知变体数量（真阳性+假阴性（FN））。计算并记录每种变体类型的阳性符合率。*

阳性符合率是检测正确识别样品中存在的变体的能力。阳性符合率反映了假阴性的频率。在本指南中，当返回某变体时，检测结果为“阳性”，即参考序列（例如，人类基因组的当前构建）中相同部位出现序列差异。

b. 阴性符合率

*计算并记录阴性符合率，即真“阴性”（TN）除以报告的每种变体类型的野生型（wt）结果的数量（真阴性+假阳性（FP））。*

阴性符合率通常被定义为：使用分析方法在无分析物情况下正确识别的比例（在这种情况下，不存在某种遗传性变体），且可以反映假“阳性”的频率[[11]](#footnote-10)。更具体地说，对于基因检测，阴性符合率指正确识别野生型碱基的能力（即在无碱基的情况下，通过分析不会检测到序列变异的概率）

c. 技术阳性预测值

*计算并记录技术阳性预测值，方法是使用检测所得的真阳性数量除以检测所得的阳性结果总数（真阳性+假阳性）。*

技术阳性预测值与变体识别为真阳性的可能性有关，并反映了每次检测的假阳性数量。如果不进行变体核实，则尤其要关注假阳性数量。

d. 计算准确性

应在能够通过检测予以检测的情况下，计算每种变体类型以及临床相关变体的准确性。对于变体类型，使用表征良好的参考材料或商定的高置信识别样品进行研究，对研究结果可能会有所帮助。对于临床相关变体，准确性的计算应使用与进行检测适应证相关的临床样品的研究结果。（见第VI.D条：性能评价研究的一般建议，以了解评价基于NGS的检测产品准确性的更多详细信息。）

可通过编制以下类型的表格来计算准确性：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 对照方法 | | 总计 |
| 阳性 | 阴性 |
| 检测组 | 阳性 | A | B | A+B |
| 阴性 | C | D | C+D |
| 无识别或无效识别 | E | F | E+F |
|  | 总计 | A+C+E | B+D+F | N |

N是准确性研究中的样品总数（N=A+B+C+D+E+F）。“无识别”或“无效识别”描述了未进行碱基识别的结果，这可能是多种因素造成的，例如但不限于碱基水平性能未达到预定义的质量阈值，导致没有足够的数据进行变体识别。一些检测也报告了不确定的结果，即从质控角度来看，这些结果是有效的，但却是既非阳性也非阴性的非缺失、非错误的结果；也就是说，这种结果不能提供关于突变是否存在的明确二进制信息。

请注意，无识别或无效结果与不确定的识别是不同的。

在准确性研究中，无识别或无效识别的百分比应估计为（E+F）/N以及95%的双侧置信区间。[[12]](#footnote-11)此外，对于对照方法的阳性结果，无识别或无效识别的百分比应估计为E/（A+C+E），对于对照方法的阴性结果，无识别或无效识别的百分比应估计为F/（B+D+F）。

阳性符合率、阴性符合率或技术阳性预测值计算中不应使用无识别和无效识别，但应作为准确性研究结果的一部分进行单独记录。无识别或无效识别数的最小可接受值取决于使用适应证和检测设计。例如，应在较短的周转时间内生成结果的检测可能需要最低的无识别或无效识别的比率。

删除无识别或无效识别后，产生的准确性研究数据仅包含有效检测结果，具体如下表所示：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 对照方法 | | 总计 |
| 阳性 | 阴性 |
| 检测组 | 阳性 | A | B | A+B |
| 阴性 | C | D | C+D |
|  | 总计 | A+C | B+D | A+B+C+D |

*•* 阳性符合率的计算方法是将A（即通过检测产品而检测的已知变体的数量（真阳性检测结果）除以（A+C）（即检测到的已知变体的数量）（真阳性+假阴性检测结果）。这些计算不应包括无识别或无效识别，其应单独列出。阳性符合率产生假阴性（FN）比率（假阴性=1-阳性符合率）。在变体和试样层面，应计算每个变体类型以及临床相关变体（如适用）的阳性符合率。

• 阴性符合率的计算方法是将D（真阴性结果数量）除以（D+B）（检测变体的野生型结果数量）（真阴性+假阳性检测结果）。阴性符合率反映假阳性（FP）的频率（假阳性=1-阴性符合率）。在试样层面计算阴性符合率。理想情况下，应计算每个变体类型以及临床相关变体（如适用）的阴性符合率。阴性符合率可作为正确识别为野生型的碱基数量进行计算，或表示为预定义的区间内假变体数量。

• 技术阳性预测值的计算方法是将A（真阳性检测结果数量）除以（A+B）（通过检测而检测的所有阳性结果数量）（真阳性+假阳性检测结果）。在测定部位（变体）和试样层面计算技术阳性预测值。应计算每个变体类型以及临床相关变体（如适用）的技术阳性预测值。

详见第X条：附录A：

2. 精密度（再现性和重复性）

*评估变体和野生型识别的精密度（再现性和重复性），并针对每一种条件、测定部位和变体类型，分别报告每个度量。开展导致检测差异性的主要因素检测，包括但不限于检测多个样品、运行、试剂批次、天数和操作人员。开展导致其他适用的差异性来源（如适用）检测，包括但不限于检测多台仪器、多个检测点、泳道平行样品和泳道。*

基于NGS的检测产品的再现性定义为：在各种指定条件下，（例如使用不同操作人员、不同操作条件、不同测量天数、不同仪器等）使用同一样品（包括在检测截止时间前后的样品）测量检测的差异性，以及解释检测中的主要差异性来源。重复性包括，在短时间内，使用相同的操作人员、相同的测量系统、相同的操作条件和相同的地点，对相同或类似的对象进行重复测量，其检测结果显示的差异性。这些研究无需黄金标准序列结果；相反，检测开发机构应该计算每个样品的具有相同结果的重复百分比。还应报告无识别或无效重复的百分比。

应预定义基于NGS的检测产品的再现性和重复性阈值，并针对每种检测条件和基因组环境，分别报告每个变体类型。这些阈值将取决于一系列变量，包括使用适应证和将检测的变体类型。应使用客观证据和有效统计技术证明阈值的合理性。

3. 检测限（LoD）

*确定并记录DNA的最小量和最大量（例如，可接受的输入范围），使检测能够在95%的检测运行中提供预期结果，并具有可接受的无效识别或无识别结果水平（即无准确性损失）。确定并记录包含在检测使用适应证的每种变体类型的检验限度下限。如果对含有混合内容物的试样（例如嵌合体试样）进行检测，则确立和记录检测不同等位基因比的能力，并确定基于稀释法（通过混合两个纯临床样品或通过代表一定比例范围的细胞系来创建混合物来执行稀释分析法）变体的检测限下限。*

基于NGS的检测产品的检测限，应在不同的常规临床实验室条件下，以及在定义的试样类型中进行评价。一般来说，检测限下限指的是分析物的最低浓度，在该浓度下，至少95%的阳性识别和可接受水平的无效识别或无识别是在检测该浓度的重复物中获得。当不同的变体类型可能具有不同的检测限时，在不同的序列环境下，计算每个变体类型的检测限。同样，应确定并记录检验限度上限。

4. 分析特异性

*使用下列度量来确定和记录分析特异性。使用拟定方法，确定并记录潜在干扰和交叉反应物质或交叉污染是否会影响检测性能。*

分析特异性与检测产品仅测量预定分析物的能力相关。根据使用适应证和检测设计，内源性或外源性物质对测量的干扰可能会导致无法检测到某种分析物，并可能产生假阴性结果。交叉反应（例如，来自同源部位、假基因和其他类型的交叉反应序列）可能导致错误检测到一种错误的分析物，从而产生假阳性结果。患者试样的交叉污染将在检测中引入错误的序列，从而导致产生假阳性和假阴性结果。

a. 干扰

*识别并记录可能降低扩增或测序能力的任何干扰物质（包括基质效应）。选择与试样或样品类型相关的物质进行干扰实验，并选择检测的使用适应证所涵盖的DNA提取方法。*

b. 交叉反应

*根据将通过检测进行测定的目标，评估并记录已知交叉反应等位基因和同源部位（例如假基因）的交叉反应的可能性。*

*c.* 交叉污染

*制定、验证并记录检测患者试样或样品之间携带或交叉污染的方法。*

请注意，对于全外显子组测序等检测，许多测定部位在任何两个试样中都是相同的，交叉污染评价可能需要评估样品之间的已知差异。

C. 检测运行质量度量

*确定并记录，与特定设计和检测过程相关的覆盖率、碱基质量和其他检测运行质量度量的最低可接受阈值（例如，输入DNA质量、库复杂性、测序仪表、生物信息学渠道相关指标）。设置样品和变体水平质量控制验收标准（例如，映射的读数数量、覆盖率、链型）。*

检测运行质量度量用于确定是否应接受单个检测运行、样品或变体识别，或者在适用情况下，是否应使用补充规程进一步查询变体识别。特别是，应记录和报告基因组临床相关部分的检测运行质量度量（即有足够证据表明致病性变体与疾病之间存在因果关系的基因和部位）。

可以使用与整个检测或基于NGS的检测产品的特定步骤相关的一系列检测运行质量度量，并且除其他因素外，将取决于所使用的技术。这些度量如下所述。

不应报告检测运行中未达到质量阈值的部位的变体。应如实报告因未能达到质量阈值而未被测定的部位。另见第VI.G.和VI.H.条规定的说明书建议。

1. 覆盖度（读取深度和完整性）

*确定、证明并记录平均和最小覆盖度深度、覆盖度均匀性以及靶向部位中高于检测最小覆盖度深度的碱基百分比的最小性能阈值。[[13]](#footnote-12)*

*确定并记录要求部位的覆盖度百分比/完整度（即，检测中超过最低阈值的足够覆盖度的百分比）。*

应根据检测的使用适应证预先定义和报告平均和最低覆盖度深度阈值，并使用客观证据和有效的统计技术进行证明和报告。一般来说，减少平均覆盖度会增加不足最小覆盖度检测百分比。如果关键测定部位未达到最低覆盖度阈值，则需修改检测要求，以便限制将报告的结果类型。

为解决测定部位未达到预定义覆盖度阈值这一问题，可能需将补充规程（见下文第VI.E条）纳入检测方案中。

阈值的选择应证明，足够的检测性能可以满足，使用适应证声明和预定义用户需求。平均和最小覆盖度、完整度百分比和相关度量，将根据检测适应证的使用、设计（例如仪表）、规程（例如家族三人组检测与患者检测比较）、性能（例如碱基识别错误率、独立读数数量）和其他相关信息的细节而变化。

对于预期杂合子和纯合子种系等位基因组分，检测应满足所报告的变体预定义阈值。如果检测报告了等位基因频率超出预期杂合子和纯合子种系范围（例如，种系嵌合体）的变异，则检测开发机构应确保达到检测这些变体等位基因频率所需的最低覆盖度。可能需要补充规程，以充分测定这些变体。

2. 检测运行度量和性能阈值

FDA建议为所有基于下一代关键测序的检测步骤，确定检测运行度量和性能阈值。这些阈值将取决于一系列变量，并应使用客观证据和有效统计技术进行证明。应在检测确认中对这些度量及其性能阈值进行评估。如果确认结果表明，这些度量不适用于检测，或无法达到性能阈值，则应修改和重新确认检测设计。

以下是确定检测要素的列表：检测运行度量和性能阈值的因素：

a. 试样质量

*• 确定并记录试样验收或拒收标准。*

b. DNA质量和处理

*• 确定、记录并证明基因组DNA浓度、含量和质量的阈值。*

*• 如适用，确定并记录评估DNA数量和浓度的方法（如荧光法）。*

*• 如适用，确定并记录切变后可接受的DNA大小范围和/或范围模式，确定并记录库产量的性能阈值，建立并记录靶向富集方法。*

这些方法和阈值将影响适当的DNA提取方法的选择。

c. 序列生成/碱基识别

*• 确定、记录并证明测序读数的碱基质量分数（例如，Q分数）的阈值。*

*• 确定并记录各周期碱基质量的中位数以及高于预定质量阈值的碱基百分比的阈值。*

*• 如果适用，确定并记录调整碱基百分比的阈值。*

如果不使用碱基质量分数，则记录所使用的适用方法，并证明其为什么为合适的方法。

可以酌情使用序列生成的其他度量。例如：

*• 聚类密度和聚类通过筛选率。*

*• 读数（例如，读数的数量）；独特读数的百分比（在删除重复项之前）；重复读数的百分比（反映了在同一位置开始的读数的数量，是一项库复杂性指标）。*

如果使用此类其他度量，则应确定、记录和证明每个度量的阈值。

d. 映射或程序集度量

*• 确定并记录适当的度量及其相关的映射质量的阈值。*

可能的度量示例包括：

• 映射到参考基因组的读数百分比。

• 映射到靶向部位的读数百分比。

• 映射质量分数和正确映射的读数百分比。

• 靶向覆盖百分比、映射到非靶向/诱饵序列的读数百分比，以及未映射到任何人类序列的读数百分比。

• 覆盖度深度（见上文第VI.C.1条）

• 非特异性映射，例如由于巨大缺失导致的错位或剪接读数，由于序列同源性导致的非特异性映射，以及使用泛种族参考序列评估的映射错误。

在检测确认时，如果关键碱基/位置不符合映射质量阈值，则应评价检测设计和/或度量和阈值是否适合使用适应证，包括用户需求。当已知少量碱基/位置映射不良时，可接受替代方法，例如采用第二种方法补充基于NGS的检测产品，或指定未报告的部位（并相应修改检测的使用适应证声明和限制）。

e. 变体识别度量

*• 确定并记录适当的度量及其相关变体识别质量的阈值。*

变体识别度量包括单个变体度量（变体级度量）和样品级、总体变体识别汇总度量。度量是否合适，取决于变体识别用生物信息渠道。应确定、证明和记录报告阈值。

合适度量示例包括：

• 变体识别质量分数。

• 报告的变体读数的数量和百分比。

*•* 等位基因读数百分比，包括不同变体类型的百分比（例如，杂合子识别、缺失、无意义变体），以及碱基替换的部分和比率（过渡/转换（ti/tv））。

• 变体等位基因频率（例如，针对纯合子和杂合子识别而定义的预期识别频率阈值/变体读数的最低百分比）。

• 新变体的百分比，与参考变体/序列的一致率。

• 链偏向性。

在渠道开发中，可能需要考虑或纳入系统性错误概况和抑制。如果是这种情况，需确定并记录分析和抑制的方法。

D. 性能评价研究的一般建议

*在评价检测性能时，应酌情纳入下列特征。针对偏离这些建议的情况，提供详细理由。*

*•* 对基因组部位、变体类型以及序列环境为代表的使用适应证，进行确认研究，包括临床相关目标。如果高度同源、高度多态或其他困难部位的变体是检测使用适应证的一部分，则确定这些部位的检测性能。

• 评估检测限制，例如，大于特定大小的插入、删除、或重排，并识别检测无法以预期的准确性和精密度检验的序列变异类型。

• 酌情使用反映实际待检测试样类型（如全血、唾液）和待检测人群。

• 确定所需样品的数量和类型，以证明在相关度量和使用适应证方面满足性能阈值置信度。该数量将取决于检测的使用适应证、要求通过检测予以检测和报告的变体的数量和类型（如果相关），以及为支持该使用而必须满足的关键性能参数。

• 评价不同基因型（即野生型、杂合子、复合杂合子、纯合子）的检测性能，与检测的使用适应证一致。此外，如果在检测的使用适应证中，要求具有混合内容物（如嵌合体）的试样或DNA样品，则评价不同等位基因比率的检测性能。这可以通过混合两个纯临床样品或从覆盖一系列等位基因组分的细胞系中，创建混合体来进行。

*•* 在评价端到端检测性能时，包括DNA制备、试样和试剂获取、处理和储存（如适用）。

• 包括最终确定的用于数据处理和分析的生物信息学渠道，作为整个端到端检测确认的一部分。

• 如果适用，确认样品池方法，包括最小和最大的复用样本量，以确保保持单个样品身份。如果条形码进行复用，则评估并记录条形码对检测性能的影响，无论每个样品使用哪种条形码，以及当最大样本量被复用时，确定并记录运行中患者/条形码的组合，能提供的准确和可重复的结果。

*评价基于NGS的检测*产品*的准确性：*

*•* FDA确定适当的参照物方法（如双向测序或另一种经过充分验证的方法），进行比较，评价并记录准确性。如果可用且适当，则通过将检测生成的序列与表征良好的“黄金标准”参考序列或商定的表征良好的样品共有序列进行比较，以评价准确性。

• 为了确定通过检测可检测的变体类型和环境（无论变体是否为致病性），使用具有良好表征的参考材料或具有高置信度识别的商定样品来确定准确性（基线准确性）。根据检测适应证，准确性研究应包括代表性变体和变体类型。研究应考虑，与检测的使用适应证相关的具有临床意义的部位、不同基因组环境下的变体、基因组的难以测序或难以映射的部位、嵌合体以及检测的使用适应证中包含的任何其他变体类型、部位或环境。例如，如果检测旨在检测和报告缺失，则应以适当大小的增量（例如，不超过五个碱基对），分别以插入和删除形式，纳入变体分布。

• 包含检测相关的临床相关变体使用适应证的临床样品，应用于准确性研究，并应选择以确保，充分代表检测要求检测和报告的临床相关序列变体和基因组环境。使用新鲜的临床样品评估检测的准确性，样品的采集和处理方式应与检测的使用说明一致。应尽可能使用含有特定临床相关变体的新鲜临床样品。如果没有可用的新鲜临床样品，则可以接受使用含有临床相关部位特定变体的存档临床样品，或人类细胞系样品来替代或补充研究。在某些有限情况下，如果FDA认为合适，也可以使用人造的或生物合成的样品作为可接受的替代品。

• 试样的数量和类型将取决于各种检测特定因素，在进行研究前应予以确定并说明理由。虽然没有要求检测一定数量的基因位点，或检测一定数量不同患者的检测样品（这也可能取决于特定确定样品中不同类型变体的数量），但研究中使用的样品数量和类型，应该在统计学上证明检测的使用适应证，并且应该记录和报告样品类型的细节以及研究开展方式说明。

• 当临床样品、细胞系或生物合成材料不可用时，除了生物试样外，在*硅基中*构建包含各种要求类型（如单核苷酸变异、缺失、复制、重复扩增、拷贝数变异、结构变体）的已知序列变体，可用来评估生物信息学渠道的性能。然而，应使用与检测所采用的相同预分析和分析方法生成这些数据文件。可采用几种不同的方法（应清楚描述、证明和记录这些方法）构建*硅基*序列。有关软件确认的更多信息，请参见题为“软件验证的一般原则”的指南文件[（https://www.fda.gov/MedicalDevices/Device RegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm085281.htm）](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/MedicalDevices/Device%20RegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm085281.htm）)。

• 分别计算要求的每种类型（例如单核苷酸变异、缺失、结构变体）变体的PPA、NPA和TPPV和待检测评估的序列环境（例如高度同源、高度多态或其他困难部位）的阳性符合率、阴性符合率、技术阳性预测值。关于计算准确性的更多信息，见第VI.B条。

• 如果FDA认为合适，可以在同一平台上的多个类似的基于NGS的检测产品中，使用某些确认研究结果，例如，使用相同的分析前步骤、库制备方法和测序方法。

*记录确认研究结果：*

*•* 以平均值和相关的95%双侧置信区间的形式介绍结果。以表格形式呈现结果，并分别记录每个变体、检测的变体类型和序列环境的结果。在相关情况下（如插入、删除），按大小分布记录结果。

• 分别呈现用于确认每种试样类型的结果，并说明所用试样的类型（例如，临床试样、细胞系）。

• 对于再现性研究，记录每个变体或变体类型的结果。说明每个变体的检测重复次数和检测条件（例如，运行次数、天数、仪器、试剂批次、操作人员）。

• 在呈现再现性和重复性研究结果时，说明质量控制失败率，并列出所有无识别或无效识别。不符合覆盖度深度、覆盖度均匀性和其他技术度量的运行数据通常被视为质量控制失败。

E. 补充规程

*包括任何适用的补充规程（如正交核实、填充、三重检测），将在设计、开发和确认活动和文件中的检测说明中，指出其反射性使用。如果未执行补充规程，则记录检测不会报告的结果类型。*

补充规程指那些不属于从输入试样或DNA生成变体识别的核心过程的规程，尽管该规程可能被视为基于NGS的检测产品的一部分。当作为检测使用适应证关键部分的基因组变体或测定部位，不能满足预定义的检测运行质量度量或性能阈值时，应实施填充或正交核实等补充规程。在这些情况下，可确定补充规程，以确保检测能够可靠地报告这些部位的变体。此外，对于一些罕见的未确诊疾病，建议进行三重测序或其他家族检测，如果没有进行适当的亲子或家族检测，检测结果可能是不确定的。

例如，当准确性的95%置信区间下限低于预定义阈值时，可能需要对关键变体类型进行核实性检测。或者，可以通过其他方式，报告那些准确性较低变体的充足理由。

F. 变体标注和筛选

*选择并证明适用于检测使用适应证的筛选算法，确定并记录过滤阈值，并记录筛选方式和筛选时间。记录应用的任何筛选标准，并描述其目的，例如，从考虑因素中排除低等位基因频率的变体、难以测序的部位或难以识别或分析的变体、筛选出特定类型的变体等。当使用数据库帮助标注和筛选时（例如，从大型对照队列中估计等位基因频率，如外显子组整合数据库（ExAC）、基因组整合数据库（gnomAD）或千人基因组数据库中发现的等位基因频率），验证数据集中是否包含所示的检测群体，并记录所用数据库的版本。包括识别并将外部数据源中的变更纳入标注和筛选规程的过程。*

从外显子组或基因组测序中识别和优先考虑备选原因变体或基因的筛选算法，可能包括根据群体频率选择变体、根据对基因和基因产物功能的影响和/或表型数据进行优先排序、概率方法（当性能在不同环境中已得到充分确认并证明达到预定义的性能特征时）或共享基因组片段（例如，通过血缘关系认同的部位和家族研究中变体与表型的共分离）。

G. 介绍说明书的检测性能

*检测说明书必须符合21 CFR 809.10以及第21篇第801部分的适用章节。在提供有关检测性能的信息时，说明书中应包括以下内容：*

*•* 通过检测开发机构网站上显眼的超链接，提供并让公众不受限制地查看检测的使用适应证声明、限制和性能概要信息。

• 检测的使用适应证声明中包括以下内容：

○ 要求通过检测进行检测和报告的序列变异类型（例如，单核苷酸变体、多核苷酸变体、插入、删除、复制、重复扩增）。

○ 检测的任何限制（例如，检测无法通过验证性能予以检测的基因、序列变体类型、等位基因频率或基因组环境等测定目标，未能检测某些大于一定尺寸的重排、插入和缺失，或与检测的使用适应证有关的特定基因）。

○ 如果可能，检测可能提供受影响群体的比例的相关结果，例如，如果检测产品仅检测到导致特定疾病或条件的所有变体的子集。

• 识别基因组部位，在该部位，通过基于NGS的检测产品，可以生成符合预先规定性能规格的序列。

• 使用广泛认可的术语报告变体。

*•* 对于NGS靶向实验对象，使用广泛认可的术语列出实验对象中包含的基因。

• 对于基于全外显子组测序的检测，描述如何定义外显子组的已知临床相关部位，以及这些部位的相关度量（例如覆盖度）。

• 在性能概要信息中，包括以下内容：

○ 以表格形式呈现检测准确性和精密度/再现性的结果，在通过检测进行查询的部位中，按变体类型和尺寸（例如，包括按尺寸、分别用于删除和插入、按多态和非多态部位划分的结果分布的尺寸），分别针对阳性和阴性结果，总结为与参考序列一致和不一致的平均百分比和95%置信区间，并根据结果是否来自临床试样、人工样品、细胞系或参考样品集进行细分。

○ 对于再现性研究的结果，列出每个变体/变体类型的重复次数和检测条件（例如，运行次数、天数、仪器、试剂批次、地点、操作人员、试样/类型等）。

○ 说明平均覆盖度深度和最小覆盖度深度所覆盖的靶向部位的百分比。

• 根据性能数据提供有关检测失败概率的信息（例如，质量控制失败）。描述检测可能失败的情况（例如，低样本含量、低DNA浓度）、检测中包含或推荐的任何对照材料，以及检测失败时要采取的后续措施。

• 描述纳入使用适应证的任何其他规程、方法和实践，包括应进行的验证检测。说明亲子或家庭性检测是否是检测的必要部分。

*应提供以下关于检测设计的信息：*

*•* 指定检测的要素，包括测序平台和相关技术（例如，长读数）以及辅助试剂、仪表和设备。

• 描述检测设计、开发和确认的所有步骤（例如，DNA提取、库制备、变体识别）以及与每个步骤有关的检测规程和要素。

• 提供有关试样类型（例如，唾液、全血）、基质（例如，防腐剂、抗凝剂）以及适合检测的最小含量和最大含量的详细信息。指定样品采集、预处理（例如核酸提取方法）、储存和任何更多分析前样品制备步骤（如适用）。

• 说明获得适合检测准确性所需的最低DNA数量和质量。

• 说明测序用处理DNA的方法（例如，扩增、捕获）以及评估最终处理材料的数量和质量的方法。

• 说明复用级别（如适用）。

• 指定所有内部开发的或从第三方获得的软件部件。说明所有软件部件的名称和版本，并提供说明，包括测序仪器和测序后数据分析和处理（即生物信息学渠道）所需的软件部件。记录对开源软件进行的任何修改。有关软件确认的更多信息，请参见题为“软件确认的一般原则”的指南文件  
[（https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm085281.htm）](file:///\\\\192.168.2.1\\pc186\\2022\\20220315\\BD\\校对完毕\\tracking\\（https:\\www.fda.gov\\MedicalDevices\\DeviceRegulationandGuidance\\GuidanceDocuments\\ucm085281.htm）)。

• 说明数据分析用数据库和版本，并描述如何将现有数据库的新版本或新数据库纳入检测并进行验证。说明序列是否与完整的人类参考程序集或靶向序列进行比对，并记录用于比对的完整的人类参考程序集的登录号和版本号。

• 描述变体标注和筛选用标准。

H. 检测报告

*在符合21 CFR 809.10的合规说明书的检测报告中纳入以下信息（如适用）：*

*•* 报告的变体与临床表现（体征和症状）之间的关系（如适用），以及信息来源（例如，包括该信息是否由FDA认可的人类遗传变体数据库中的信息支持[[14]](#footnote-13)）。

• 通过检测产品而检测的基因组和染色体部位的描述。对于实验对象，应说明所有靶向基因。

*•* 根据第VI.D条进行的性能研究的结果摘要。

• 在检测验报告的第一页，突出显示的致病性变体或可操作变体的列表。在适用情况下，报告的变体可能包含已知或预测的影响（包括致病性、外显率），有些可能具有不确定意义。如果将报告具有未知意义的变体，则应在检测验报告中，明确区分这些变体与致病性变体或可操作变体，并声明其临床相关性尚不清楚。说明检测验报告中未包含的变体类别（如良性变体）。还包括以下信息：

○ 使用广泛认可的术语报告变体。

○ 提供支持评价报告变体的临床证据描述。

○ 提供与患者表型有关的基因摘要，以及变体评价所依赖的所有数据库（如果相关）。

○ 说明是否需要附加信息，例如，来自家庭成员的检测结果，以最终评价变体。

• 说明检测限制，包括测序失败的测定部位、任何干扰物质和变体评价限制。

• 指定风险缓解要素，包括纳入使用适应证或建议作为后续措施的任何其他规程、方法和实践的基本原理和说明，以缓解与检测有关的风险。

• 在整个报告中，使用清晰、一致、易于理解的语言。

VII. 修改

对基于NGS的检测产品的修改，可能在类型、范围和影响方面存在很大差异。该修改可能包括从新试剂供应商和软件更新到新平台、化学变化或新增测序目标。虽然这些变更需要确认，但需要进行的研究类型将取决于修改的类型和程度。对于已获得FDA上市前授权的检测的某些修改，需进行FDA上市前审评。

如本指南文件第IV部分所述，根据法律规定，具有一般预期用途（例如协助诊断疑似种系疾病）的基于NGS的检测产品目前自动归入第III类，因此，目前须遵守上市前批准要求。[[15]](#footnote-14)此外，如本指南文件第IV部分所述，FDA认为，通过综合使用一般和特殊控制措施，此类基于NGS的检测产品的相关风险可能会得到充分缓解，因此，此类检测可能适合初始分类过程。如果FDA批准了一项旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的初始请求，并将此类检测分类为第II类，则该检测将被授权上市，并可作为未来其他旨在帮助诊断疑似种系疾病的基于NGS的检测产品的510（k）书面申请。本条剩余部分讨论了适用于需遵循510（k）（“510（k）器械”）的体外诊断修改的监管标准。

根据FDA的规定，当修改构成“器械预期用途的重大变更或修改”，或当修改“可能显著影响器械的安全性或有效性” 时，需针对修改后的510（k）器械提供新的510（k）。[[16]](#footnote-15) “可能显著影响器械的安全性或有效性”的体外诊断修改包括对体外诊断的技术、工程、性能和材料变更。题为“决定何时针对现有器械变更提交510（k）”[（https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/device regulationandguidance/guidancedocu](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/downloads/medicaldevices/device%20regulationandguidance/guidancedocu) [ments/ucm514771.pdf）](https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm514771.pdf)（510（k）修改指南）提供了信息，以帮助体外诊断制造商在决定对510（k）许可器械（或器械组）或其他受限于510（k）要求的器械（例如通过初始分类过程获得上市许可的器械）进行修改时，考虑是否需要新的510（k）。

此处的讨论旨在与510（k）修改指南保持一致，并通过强调该指南第V.D3条和第D4条中，关于旨在帮助诊断疑似种系疾病的NGS的检测的某些方面，对该修改指南进行补充。如果根据510（k）将这些检测产品归入第II类，FDA将建议在修改其检测之前，检测开发机构进行适当的基于风险评估，以确定修改是否会显著改变其检测分析或临床性能或安全规格。如果检测开发机构基于风险的评估确定修改，可能会显著改变分析或临床性能或安全规格，则对检测进行的变更，可能会显著影响检测的安全性或有效性，并且可能需要提交新的510（k）。如果基于风险的评估确定，修改不太可能显著改变这些属性，检测开发机构应执行适当的分析或临床验证和确认活动，以便更全面地描述修改的范围和影响。使用为评价特定器械而制定的标准方法和性能标准（例如，用于支持原始510（k）的协议和标准，或原始510（k）中建立的协议和标准（描述了如何评价预期变更））进行验证和确认的结果表明（a）修改后的检测系统性能在标准范围内，（b）修改后的检测系统性能相对于先前许可的申请要求没有显著变化，（c）没有其他新的风险或现有风险的重大变更，则该变更可能不会显著影响安全性或有效性，且可能无需510（k）。

在提交原始510（k）时，可能会预计一些可能会显著影响性能或安全规格的检测修改。在可行的情况下，检测开发机构可在原始书面意见中纳入适当的预期变更协议，以及特定规程和验收标准。如果FDA批准了此类变更协议（该协议概述了预计变更的具体类型、实施这些变更所遵循的规程，以及作为510（k）的一部分在实施前需满足的验收标准），根据变更协议中概述的特定规程和验收标准进行的未来修改一般不需要新的510（k）。检测开发机构将负责记录必要的修改，但无需向FDA提交文件。[[17]](#footnote-16)然而，如果在先前510（k）许可变更协议的规程或验收标准，进行了修改，则可能需要提交新的上市前书面意见。

如果修改扩大了基于NGS的检测产品的使用适应证范围（超出了对疑似种系疾病或其他病症的有症状个体的诊断），则由此产生的检测不在本指南的范围内。

VIII. 审评器械设计和生产变更的建议

无论变更是否需要FDA进行上市前审评，医疗器械成品制造商均须按照FDA的质量体系（QS）法规要求，对器械设计和生产的变更进行审评和批准（21 CFR 820.30和21 CFR 820.70），并在器械主记录中记录变更和批准（21 CFR 820.181）。对检测进行修改后，应始终重新评估检测性能。在审评、批准和记录此类修改时，FDA建议如下：

• 记录检测的所有修改，包括检测方案。其中应包括软件更新和生物信息渠道的其他修改。

• 在实施预期的检测修改（包括对软件的修改）后，制定详细的标准操作规程进行重新确认。该标准操作规程应说明预期修改和实施这些修改应遵循的程序，包括待实施确认研究的类型，以及引入修改时必须达到的性能度量和阈值。

• 对足够数量的具有良好特征的样品进行重新确认，以保证达到规定的检测性能。应记录样品编号和类型，并对所选样品编号和类型进行说明。

• 记录修改后将进行的确认研究类型，并记录检测的修改后性能。

• 在适当情况下，根据基于风险的评估结果，应进行端到端的重新确认检测，而不仅仅是修改，并记录性能。如有可能，当仅对生物信息渠道进行修改时，可使用在检测使用指示中具有代表性，且具有良好特征的现有序列数据文件，其中包含已知变体。通过比较新渠道和现有检测渠道的结果，可以确认渠道是否经过微小修改。始终记录性能。

• 如果随着时间的推移，对一项检测进行了多次修改，则应单独评估每次修改以及进行总体评估，并记录性能。

• 向现有试剂盒添加新基因时，应进行端到端的检测性能评价，并记录性能。如果更改后的检测不符合性能要求，则可能需要重新设计。对于检测性能被证明为初始确认一部分且可以对基因进行标记或取消标记的软件，根据该软件所做的变更，可能需要重新确认软件的确认状态。

• 采用程序对内部和外部遗传变体数据库的更新，及其对变体评估的潜在影响进行说明。记录任何更新，包括但不限于数据库的名称、位置或新版本。

IX. 附加资源

• FDA指南文件《在医疗器械上市前批准和重新分类期间进行获益风险确定时应考虑的因素》  
[（https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm517504.pdf）](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm517504.pdf）).

• FDA指南文件《医疗器械申请的反馈请求：预申请计划和与美国食品药品监督管理局工作人员的会议》  
[（https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm311176.pdf）](https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm311176.pdf).

• FDA指南文件《第二类器械豁免上市前通知的程序》  
[（https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Gui](https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm080199.pdf) [danceDocuments/ucm080199.pdf](https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm080199.pdf)）.

• Gargis A.S. et al, “Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice,” Nat Biotechnol. 2012 30(11):1033-6.

• 《分子病理检查表》，美国病理学家协会（2014年4月21日）。

• Rehm H.L.等人，“下一代测序的美国医学遗传学与基因组学学会临床实验室标准”，《Genet Med》。 2013 15(9):733-47.

• Schrijver I.等人，“基于方法的分子遗传病理学能力验证”，《分子诊断学杂志》（2014年）， 16(3):283-7.

• 《全面基因组图谱分析性能规范》（M00118，V1）。  
[（https://www.palmettogba.com/palmetto/MolDX.nsf/DocsCat/MolDx%20Website~MolDx~Browse%20By%20Topic~Technical%20Assessment~9WRHPN3576?open&navmenu=Browse%5eBy%5eTopic）](https://www.palmettogba.com/palmetto/MolDX.nsf/DocsCat/MolDx%20Website%7EMolDx%7EBrowse%20By%20Topic%7ETechnical%20Assessment%7E9WRHPN3576?open&navmenu=Browse%5eBy%5eTopic).

• 《CLSI MM09-A2，诊断实验室医学中的核酸测序方法；批准指南—第二版》，美国临床和实验室标准协会（2014年2月）.

Aziz N.等人，“美国病理学家协会的下一代测序临床试验实验室标准”，《Arch Pathol Lab Med》（2015年），139:481-93。

*•* 《体细胞遗传变体检测的下一代测序（NGS）指南》，纽约州卫生署（2015年3月）.

• 《针对基于纽约州基因检测类别的下一代测序（NGS）分析检测提交书面确认意见的指南—分子生物学》，纽约州卫生署（2015年7月）.

• Matthijs G.等人，“诊断性下一代测序指南”，《欧洲人类遗传学杂志》（2016年）24, 2-5。

Jennings, L.J.等人，“下一代测序验证指南—基于分子病理学学会和美国病理学家协会肿瘤学小组的联合共识建议”，《分子诊断学杂志》（2017年），19(3):341-365。

X. 附录A

本附录提供了一个纯粹的例证性简化示例，其中使用的数字和术语并不可用于表示证明试验安全性和有效性的实际样品或性能。试验开发机构应在可检测到变体的试验中，计算每种变体类型的准确性，以及临床相关变体的准确性。考虑在每个区域内对单一变体的6个测定区域进行试验准确性研究，其中包括以下7个样品：

• 5个具有识别变体的样品（基于比较器方法）

• 2个在待观察变体位置的野生型（wt）基因样品（基于比较方法）。

准确性研究结果的说明见下表A.1，其中单元格颜色表示真实值（深灰色单元格表示基于对照方法，存在待观察真实变体的区域，浅灰色单元格表示基于比较器方法，存在真实野生型基因的区域），而单元格中的文字代表试验结果。

表A.1

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 区域1 | 区域2 | 区域3 | 区域4 | 区域5 | 区域6 |
| 样品1 | 变体正确 | wt | 变体不正确 | wt | 变体： | wt |
| 样品2 | wt | 变体正确 | 变体： | wt | Wt | wt |
| 样品3 | wt | wt | 变体正确 | wt | 变体正确 | wt |
| 样品4 | wt | wt | wt | 变体正确 | Wt | wt |
| 样品5 | 变体正确 | wt | wt | wt | Wt | 变体正确 |
| 样品6 | wt | wt | wt | wt | Wt | wt |
| 样品7 | 变体： | wt | wt | wt | Wt | wt |

在此例中：

• 样品1、2、3和5中有2个区域存在变体，4个区域存在野生型基因；

• 样品4中有1个区域存在变体，5个区域存在野生型基因；

• 样品6和7中没有区域存在变体，但有6个区域存在野生型基因。

I） 在所有测定区域*分别*测量*每个样品*的阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值，以估算准确性，如表A.2所示。此外，还提供了每个样品的“无识别或无效识别”结果的百分比。

表A.2

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 样品 | 试验组 | 变体正确 | A1 | B | A1+A2+B | A1 /  （A1+A2+C） | D / （B+D） | A1 /  （A1+A2+B） |  |
| 变体不正确 | A2 |
| wt | C | D | C+D |
|  | 总计 | | A1+A2+C | B+D | A1+A2+B+C+D |

对于样品6和7，不适用阳性符合率的计算。

表A.3和A.4给出了样品1和2的计算示例：

表A.3

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 样品  1 | 检测组 | 变体正确 | 1 | 1 | 3 | 50.0%  （1/2） | 75.0%（  3/4） | 33.3%  （1/3） | 0%  （0/6） |
| 变体不正确 | 1 |
| wt | 0 | 3 | 3 |
|  | 总计 | | 2 | 4 | 6 |

表A.4

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 样品  2 | 检测组 | 变体正确 | 1 | 1 | 2 | 50.0%  （1/2） | 75.0%  （3/4） | 50.0%  （1/2） | 0%  （0/6） |
| 变体不正确 | 0 |
| wt | 1 | 3 | 4 |
|  | 总计 | | 2 | 4 | 6 |

检查所有7个样品的阳性符合率和阴性符合率是否相似。

II） *分别*测量所有样品中*每个变体*的阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值，以估算准确性，如表A.5所示。此外，还提供了每个变体的“检测无识别或无效识别”结果的百分比。

表A.5

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 变体： | 检测组 | 变体正确 | A1 | B | A1+A2+B | A1 /  （A1+A2+C） | D / （B+D） | A1 /  （A1+A2+B） |  |
| 变体不正确 | A2 |
| wt | C | D | C+D |
|  | 总计 | | A1+A2+C | B+D | A1+A2+B+C+D |

如果基于不准确变体检测结果的临床行动与基于准确变体检测结果的临床行动相同，则另行计算阳性符合率=（A1+A2）/（A1+A2+C）和技术阳性预测值=（A1+A2）/（A1+A2+B）。

在设置了6个测定区域的准确性研究示例中：

• 变体1、3和5中有2个样品存在变体，5个样品存在野生型基因；

• 变体2、4和6中有1个样品存在变体，6个样品存在野生型基因；

表A.6和A.7给出了变体1（区域1）和变体2（区域2）的计算示例：

表A.6

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 变体：  1 | 检测组 | 变体正确 | 2 | 1 | 3 | 100%  （2/2） | 80.0%  （4/5） | 66.7%  （2/3） | 0%  （0/6） |
| 变体不正确 | 0 |
| wt | 0 | 4 | 4 |
|  | 总计 | | 2 | 5 | 7 |

表A.7

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 变体：  2 | 检测组 | 变体正确 | 1 | 0 | 1 | 100%  （1/1） | 100%  （6/6） | 100%  （1/1） | 0%  （0/6） |
| 变体不正确 | 0 |
| wt | 0 | 6 | 6 |
|  | 总计 | | 1 | 6 | 7 |

检查所有7个区域（变体）的阳性符合率和阴性符合率是否相似。

III） 测量所有样品和变体的阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值，以估算准确性，如表A.8所示。此外，还提供了所有样品和变体的“无识别或无效识别”结果的百分比。

表A.8给出了计算示例：

表A.8

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 对照方法 | |  |  | PPA | NPA | TPPV | %inv. |
|  |  |  | 变体： | wt | 总计 |
| 变体： | 检测组 | 变体正确 | 7 | 3 | 11 | 77.8%  （7/9） | 90.9%  （30/33） | 63.6%  （7/11） | 0%  （0/42） |
| 变体不正确 | 1 |
| wt | 1 | 30 | 31 |
|  | 总计 | | 9 | 33 | 42 |

阳性符合率=77.8%（7/9），置信区间为95%：（50.4%; 92.4%）;

阴性符合率=90.9%（30/33），置信区间为95%：（79.3%; 96.3%）。

技术阳性预测值取决于阳性符合率、阴性符合率以及准确性研究中样品所有测定区域中存在野生型基因区域的百分比（在本例中，该百分比是78.6%（33/42））；因此，在说明该指标时，应考虑到这一点。

备注：所有样品和变体的数量以及阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值均作为基本计算的极简示例，而不应视为阳性符合率、阴性符合率和技术阳性预测值可接受水平的示例。如第VI.B.1条所述，可接受的数量主要取决于检测使用的标示及其性能特征。



1. 根据FD&C法案第523条，某些器械的510（k）计划可能由FDA认可的第三方进行审评，该等第三方负责向FDA提出关于实质等同性的建议。 [↑](#footnote-ref-0)
2. 公开研讨会 - 优化FDA对下一代测序诊断检测的监管监督公开研讨会，日期为2015年2月20日， [http://wayback.archive-it.ore/7993/20170111165845/http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm427296.htm.](http://wayback.archive-it.org/7993/20170111165845/http:/www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm427296.htm) [↑](#footnote-ref-1)
3. 公开研讨会 - 基于标准的下一代测序体外诊断检测的分析性能评估方法，日期为2015年11月12日， [http://wayback.archive-it.org/7993/20170111165845/http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm459449.htm.](http://wayback.archive-it.org/7993/20170111165845/http:/www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm459449.htm) [↑](#footnote-ref-2)
4. 公开研讨会 - 使用数据库确定人类遗传变异的临床相关性，日期为2015年11月13日， [http://wayback.archive-it.ore/7993/20170111165844/http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm459450.htm.](http://wayback.archive-it.org/7993/20170111165844/http:/www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm459450.htm) [↑](#footnote-ref-3)
5. 公开研讨会 - 患者和医疗专业人员对基因检测结果反馈的看法，2016年3月2日， [http://wayback.archive-it.org/7993/20171115050724/https://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm478841.htm.](http://wayback.archive-it.org/7993/20171115050724/https:/www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm478841.htm) [↑](#footnote-ref-4)
6. *见*FD&C法案第513（f）（1）条和第515（a）（2）条（21 U.S.C. 360c(f)(1)和360e(a)(2)）。 [↑](#footnote-ref-5)
7. 见FD&C法案第513（f）（2）条（21 U.S.C. 360c(f)(2)）。关于初始过程的更多信息，请访问FDA网站  
   [（https://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDRH/CDRHTransparency/ucm232269.htm）](https://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDRH/CDRHTransparency/ucm232269.htm)。 [↑](#footnote-ref-6)
8. 行业和FDA工作人员指南 - 公认标准的认可和使用  
   [（https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm077274.htm）](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm077274.htm）) [↑](#footnote-ref-7)
9. 改编自JCGM 200:2012（计量指导联合委员会）。 [↑](#footnote-ref-8)
10. 有关下一代基因测序，参见Gargis AS et al., Standardization of Clinical Testing （Nex-StoCT） Workgroup. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol.2012 30（11）:1033-6. [↑](#footnote-ref-9)
11. 见CLSI统一术语数据库<http://htd.clsi.org/>- “阴性符合率（NPA） - 检测方法获得阴性结果的能力与通过比较方法获得的阴性结果一致的百分比”（CLSI MM17-A，复用核酸分析的验证和确认；经批准的指南）。 [↑](#footnote-ref-10)
12. 对于95%置信区间的计算，需遵循CLSI EP12-A2用户协议，定性检测性能评价用户协议；经批准的指南 - 第二版。 [↑](#footnote-ref-11)
13. Jennings等人（2017年）将覆盖度的深度定义为“...包含特定核苷酸位置的对应读数的数量...”。Gargis等人（2012年）将平均覆盖度的深度定义为“总测序部位内重叠读数的平均数量”，将覆盖度的均匀性定义为“将发生变体识别的特定靶向部位内的覆盖度分布”。 [↑](#footnote-ref-12)
14. 见FDA指南《使用人类遗传变体公共数据库支持遗传和基于基因组的体外诊断的临床有效性》  
    [（https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM509837.pdf）](../../AppData/Local/Temp/BNZ.6237efe248a5b31b/（https:/www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM509837.pdf）). [↑](#footnote-ref-13)
15. 关于何时提交上市前批准补充材料以更改上市前批准的器械的一般信息，请参考21 CFR 814.39和FDA指南“需经上市前批准（PMA）的器械修改 - 上市前批准补充材料的决策过程”  
    [（https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM089360.pdf）](https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM089360.pdf). [↑](#footnote-ref-14)
16. *见*21 CFR 807.81(a)(3) [↑](#footnote-ref-15)
17. 每当实施器械设计和生产变更时，制造商必须采取某些措施，以符合21 CFR 820《质量体系（QS）规则》的要求，除非该规则免除器械遵守这些要求。质量体系规则要求制造商保存记录，且这些记录必须提供给FDA检查员（见21 CFR第820条第M子条；《联邦食品、药品和化妆品法案》第704（e）条，21 U.S.C. 374(e)）。 [↑](#footnote-ref-16)