

团 体 标 准

T/SZAS XXXX—XXXX

携带者筛查基因检测的性能确认方法

Performance verification method for carrier screening genetic testing

（征求意见稿）

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

深圳市标准化协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 3

5 样本要求 3

6 样本检测流程质控要求 4

7 性能技术要求 5

8 性能确认方法 6

9 性能确认规则 7

参考文献 9

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。

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。

本文件由武汉华大医学检验所有限公司提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：武汉华大医学检验所有限公司、深圳华大医学检验实验室、深圳中国计量科学研究院技术创新研究院、浙江省人民医院、复旦大学附属妇产科医院、中国福利会国际和平妇幼保健院、重庆医科大学附属第一医院、武汉大学中南医院、云南省第一人民医院、上海交通大学医学院附属仁济医院、贝瑞和康基因技术股份有限公司、北京福君基因生物科技有限公司

本文件主要起草人：阳晶晶、刘书情、王丽娜、杨倩倩、吴亚、吴平、唐卫江、纪婵媛、李翠翠、周舒君、唐少华、陈松长、徐晨明、李淑元、张华、郑芳、朱宝生、杜艳芝、颜楠楠、杨璐、唐美芳、田志坚、姜丹

携带者筛查基因检测的性能确认方法

1 范围

本文件规定了携带者筛查检测的相关术语、样本采集及检测质控要求、性能要求、参考品选用要求以及性能确认的方法。

本文件适用于基于高通量测序技术的单基因病的携带者筛查，适用于该类型检测服务提供商及提供相关检测实验的各类检测机构。

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。

GB/T 35890—2018 高通量测序数据序列格式规范
GB/T 37872—2019 目标基因区域捕获质量评价通则
WS/T 416—2013 干扰实验指南
T/SZGIA 2—2019 基因组从头组装质量指南
T/SZAS 13—2019 基因组学数据集
CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

单基因病 monogenic disease

单基因病是指由一对等位基因控制的疾病或病理性状，其传递方式遵循孟德尔遗传规律。

3.2

测序 sequencing

测定核苷酸序列的过程。

3.3

高通量测序技术 high-throughput sequencing

以一次并行几十万到几百万条核酸分子序列测定和一般读长较短等为标志，适用于DNA的测序技术。

3.4

携带者筛查 carrier screening

指针对没有明显遗传疾病表型及家族遗传病史的个体进行常见的常染色体隐性及X连锁隐性遗传性疾病的基因检测，以发现受检者是否携带目标疾病相关基因的致病性或可能致病性变异。

3.5

Q20

测序数据中，碱基识别质量值大于20的碱基占有所有碱基的比例。例如碱基识别质量值为20时，表示碱基的正确率为99%以上， $Q20 \geq 95\%$ ，则表示测序数据中95%以上的碱基质量值大于20。

[来源：T/SZAS 13—2019, 3.1.12]

3.6

Q30

测序数据中，碱基识别质量值大于30的碱基占有所有碱基的比例。例如碱基识别质量值为30时，表示碱基的正确率为99.9%以上， $Q30 \geq 85\%$ ，则表示测序数据中85%以上的碱基质量值大于30。

[来源：T/SZAS 13—2019, 3.1.13]

3.7

平均测序深度 average sequencing depth

测序得到的落在目标区域的总碱基数与目标区域长度的比值。

3.8

覆盖度 coverage ratio

将测序序列比对到参考序列上时，所有被比对到的区域占目标区域总区域的百分比。计算时需要去除参考序列上N碱基区域。

[来源：T/SZGIA 2—2019, 3.8]

3.9

插入缺失型变异 insertion and deletion, Indel

在基因组的某个位置上所发生的小片段序列的插入或者缺失，插入或缺失片段的长度在20 bp以下。

3.10

目标基因区域捕获 target region capture

对一个或多个基因的核苷酸序列定制目标基因区域特异性探针，与基因组DNA进行杂交，并富集目标基因DNA片段的过程。

[来源：GB/T 37872—2019, 3.1.6]

3.11

文库混合 library pooling

指将带有不同标签(Barcode)的样本，按照一定比例混合后作为一个混合文库一起进行上机测序。

3.12

拷贝数变异 copy number variation, CNV

大片段缺失和大片段重复又叫拷贝数变异，即连续较长的序列发生了缺失或者重复，与插入缺失型变异的区别在于变异的长度更长。

3.13

单核苷酸多态性/单核苷酸变异 Single Nucleotide Polymorphism/Variation, SNP/SNV

在基因组水平，由单个核苷酸位点的变异(替代、插入或缺失)所引起的脱氧核糖核苷酸序列多态性或单核苷酸变异。

[来源：T/SZAS 13—2019, 3.1.2]

3.14

性能确认 performance Validation

性能确认是指对未经确认或自建的检验程序，以及明显修改过的检验程序，应按相关要求进行分析性能确认。临床实验室应根据相应临床需要和目前技术水平制定检验程序分析性能标准(可接受的性能指标限值)，作为验证结果解释的主要依据。

3.15

杂合率 heterozygosity rate

通常指的是在基因组中杂合位点的比例，这里指ratio为0.25~0.75的位点占比。其中“ratio”是变异等位基因(mutant allele)与野生型等位基因(wild-type allele)在测序数据中的比例。

3.16

参考序列 reference sequence

测序片段对应的物种基因组序列。

[来源：GB/T 35890—2018, 3.11]

3.17

GC含量 GC content

是在所研究对象的DNA分子中，鸟嘌呤(Guanine)和胞嘧啶(Cytosine)所占的比例。

3.18

虚拟样本 virtual samples

在生物信息学分析中使用的模拟或合成的数据集，这些数据集模拟了通过高通量测序得到的测序数据或中间文件。

3.19

Lane

测序芯片上的一条流通槽，含有测序文库与测序试剂。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

VCF: 用于描述SNV (单个碱基上的变异), Indel (插入缺失变异) 结果的文本文件

DMD: 杜氏肌营养不良症 (Duchenne Muscular Dystrophy)

SMA: 脊髓性肌萎缩症 (Spinal Muscular Atrophy)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ACMG: 美国医学遗传学和基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics)

AMP: 分子病理学协会 (Association for Molecular Pathology)

HGVS: 人类基因组变异协会 (Human Genome Variation Society)

ClinGen: Clinical Genome Resource

5 样本要求

5.1 样本采集要求

5.1.1 外周血样本

采用EDTA或枸橼酸钠抗凝采血管，禁止使用肝素采血管，成人外周血静脉采血量应在2 mL~5 mL之间，且无明显凝血现象。

5.1.2 唾液样本

采用专用唾液采集器，唾液量应不低于2 mL，保存液体积无损失。

5.1.3 羊水样本

采用15 mL灭菌离心管，抽取的羊水体积应不低于10 mL，样本呈无色透明或淡黄色液体，无明显血液污染。

5.1.4 DNA 样本

全血及唾液基因组DNA浓度应不低于30 ng/ μ L，总量应不低于1.5 μ g；羊水基因组DNA浓度应不低于3 ng/ μ L，总量应不低于30 ng；所有DNA样本类型的OD (A260/A280) 值应在1.8~2.0之间，无明显降解且无RNA污染。

5.2 样本运输及保存要求

5.2.1 外周血样本

样本采集后如即刻寄送，可常温运输 (需保证3天内送达实验室)；如有条件建议冰袋或干冰运输，以避免DNA降解。新鲜外周血寄送前可短期保存在4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C，长期应保存于-20 $^{\circ}$ C。冻存的外周血，需在-20 $^{\circ}$ C保存，保存时间不超过3年，反复冻融不超过5次，需冰袋或干冰运输。

5.2.2 唾液样本

采集唾液后常温保存，并于7天内常温寄送样本送检。

5.2.3 羊水样本

羊水样本管封口后使用干冰运输，冻存的羊水，需在-20 $^{\circ}$ C保存，保存时间不超过2年，反复冻融不超过5次，需干冰运输。

5.2.4 DNA 样本

提取DNA后如即刻寄送，建议选择干冰运输；对于冻存的DNA样本，-20℃保存不超过3年，反复冻融不超过5次，建议优先运送新鲜DNA样本。

5.3 样本入库

样本质控不合格拒收标准应包括以下内容：

- a) 样本采集管上的标签信息和送检单信息不一致、字迹模糊难以辨认或信息不完整；
- b) 没有签署知情同意书，或送检单必填项填写不完整；
- c) 样本保存管存在污染、破裂、开盖或其他样本外溢情况；
- d) 样本量或样本体积没有达到最低要求；
- e) 样本运输温控不合格，如干冰运输样本出现干冰无剩余的情况；
- f) 样本采样使用非规定的样本采集器；
- g) 样本状态异常，如羊水样本存在明显血色或褐色、全血样本有明显凝血现象等。

5.4 样本存储和销毁

医学检测样本为确保检测结果可溯源性，留样储存时长应参考相关法律法规要求。因携带者筛查基因检测程序涉及环节多、实验周期长，为降低检测失败时的重复实验成本、压缩重复实验周期，可依据实验室情况增设中间产物（如提取后DNA、DNA文库）储存，并建立针对性的中间产物存储及销毁时限要求和记录。

质控合格的样本应录入样本入库系统后储存在对应的保存环境中。外周血、DNA及羊水样本需储存于-20℃及以下环境中，推荐保存年限为3年。唾液样本建议常温保存不超过1周。实验室可视实验周期综合考虑，决定是否暂存中间产物，中间产物如提取后DNA及DNA文库，均应存储于-20℃及以下环境中，推荐保存时限为3个月。保存时限到达即可进行销毁，并填写销毁记录。

6 样本检测流程质控要求

6.1 样本 DNA 提取

提取试剂的批号、名称、外观、有效期应符合说明书规定范围内，提取后的DNA总量应为文库构建环节DNA投入量的2倍以上，电泳检测DNA主带明显，无明显降解。

6.2 文库构建

文库构建前所使用的试剂批号、名称及有效期应符合说明书规定范围内，不同测序平台、不同建库方法和不同捕获芯片，对于文库浓度的质控要求存在差异。杂交捕获前应对文库进行浓度定量，浓度及体积要求应参考杂交捕获环节的文库DNA投入量要求，建议文库DNA总量应为杂交捕获环节文库投入量的2倍以上。

6.3 杂交捕获

不同测序平台、不同建库方法和不同捕获芯片，对于杂交后文库浓度的质控要求存在差异，浓度及体积要求应参考测序平台的杂交后文库DNA投入量要求，建议杂交后文库DNA总量应为上机测序环节DNA投入量的2倍以上。上机前应对文库进行浓度定量和片段大小分析，保证文库质量能满足上机要求。混合文库理论与实际比相差应不大于20%，每条lane至少应包含1个质控品。

6.4 测序

根据实验室条件综合选择合适的测序平台，测序时根据检测样本量和质量要求确定适当的芯片，以保证测序质量和靶区覆盖深度。测序的Q30应不低于85%。

6.5 信息分析

测序下机后的测序平均深度应不低于100X（除线粒体测序深度外），30X覆盖度应不低于95%，Q20应不低于95%，Q30应不低于85%，GC含量应小于48.5%，生信提示杂合率应不低于85%，非胎儿样本性别应与受检者提供一致。

6.6 遗传解读

携带者筛查变异命名参照人类基因组变异协会（HGVS）的序列变异描述进行命名，变异的致病性分类参考ACMG/AMP序列变异分类标准和ClinGen的更新建议。

但因高通量测序的技术局限性，遗传分析人员在进行解读时，应针对筛选出的致病性/可能致病性变异位点，参考产品包装范围及检测意义，确认报告的致病性/可能致病性位点是否需要额外的金标准方法学验证（如Sanger和MLPA）。实验室可持续积累经过 Sanger、MLPA、qPCR等技术平台验证的位点数据，开发适用于本实验室技术方案和数据特点的免验证质控流程，并充分验证其性能后，执行免验证程序。变异位点验证阈值及验证方法参考表1。

表1 变异位点验证阈值及验证方法

变异类型	位点验证阈值判断标准	验证方法学
SNV	测序深度<40X或突变率<40%	Sanger
Indel	测序深度<60X或突变率<45%	
CNV	高通量测序结果提示阳性	PCR

7 性能技术要求

7.1 性能确认样本来源

性能确认样本可使用已检测的临床样本或第三方参考品。

选择的临床样本应有可靠的参比方法提供的位点数据，即使用金标准方法（如Sanger或MLPA）、行业公认方法或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）。

性能确认还可使用位点准确可靠的第三方参考品。参考品应足够均匀和稳定，且能证明测量系统处于统计控制下时，能提供期望的可信结果。

7.2 性能确认样本类型

7.2.1 参考序列参考品

参考序列参考品应使用有公开参考序列信息的通用质控品（如NA12878或中华家系1号），或经多个二代测序平台交叉验证过，有可信携带者筛查数据可供参考比对的参考品。

7.2.2 阳性参考品或临床阳性样本

阳性参考品或临床阳性样本选取时，突变类型应覆盖检测范围内的全部突变类型，包括SNV、Indel和CNV。

注1：检测范围内未包含的突变类型，在选取阳性参考品时无需包含。

注2：根据产品包装所包含的位点进行性能确认时应使用经验证过的准确可信的阳性突变位点，产品包装所包含的位点简称目标变异位点。

7.2.3 阴性参考品或临床阴性样本

应选取经多个二代测序平台交叉验证或金标准方法验证过，无目标变异的参考品或临床阴性样本。

7.2.4 虚拟样本

使用产品包装范围内的所有位点，模拟成VCF文件，用于测试信息分析流程过库注释的准确性，可避免在检测过程中检出的变异，因注释过库而遗漏位点报出。

7.3 准确度

采用参考序列参考品至少1例、阴性参考品或临床阴性样本至少10例、阳性参考品或临床阳性样本至少每种突变类型各1例,且总数不少于10例、虚拟样本1例。其中虚拟样本经信息分析流程过库注释后,所有位点均应正确输出到解读环节,其致病性、疾病详情等相关信息应与数据库记录一致。所有参考品按照携带者筛查基因检测高通量测序实验流程进行测试,最终检测的阳性位点应与已知参考品或临床阳性样本目标变异位点一致,检测出的阴性结果应与已知参考品或临床阴性样本不含目标变异位点一致。

7.4 阳性符合率

采用阳性参考品或临床阳性样本10例进行检测,结果应与已知阳性参考品或临床阳性样本目标变异位点结果一致,即阳性参考品符合率应达到100%。

7.5 阴性符合率

采用阴性参考品或临床阴性样本10例进行检测,结果应与已知阴性参考品或临床阴性样本不含目标变异位点结果一致,即阴性参考品符合率应达到100%。

7.6 检出限

选择阳性参考品或临床阳性样本,每将样本设置为高于、等于及低于该突变的检出限。根据CNAS-GL039中的规定,检出限及以上的样本应不低于95%检测到可靠变异。

7.7 精密度

选取参考序列参考品1例,阳性参考品至少每种突变类型各1例,使用同一批次参考品,3个不同实验员在相同条件下重复检测3次,针对不同产品包装,SNV及Indel一致性比值应设置合理范围,例如产品包装所包含的位点约1万,则最终批内检测的SNV及Indel一致性比值应为100%,批间检测的SNV及Indel一致性比值应为100%。

7.8 干扰物质

实验室可根据厂家声明、临床需求和样本特点选择需要检测的干扰物质。干扰物质的检测可参考CNAS-GL039中的方法,例如评估外周血样本中血红蛋白浓度对检测结果的影响,选择高血红蛋白浓度且经确认不含被测物的阴性参考品作为实验组,选择低浓度血红蛋白且经确认不含被测物的阴性参考品作为对照组。分别在实验组和对照组中加入含目标变异的阳性参考品,与常规样本一起检测,每组重复3次,两组结果均可检测出目标变异位点,血红蛋白浓度对测定无显著影响。

8 性能确认方法

8.1 准确度检测

采用参考序列参考品至少1例、阴性参考品或临床阴性样本至少10例、阳性参考品或临床阳性样本至少每种突变类型各1例,且总数不少于10例、虚拟样本1例。其中虚拟样本经信息分析流程过库注释后,结果应符合7.3的要求,所有参考品按照携带者筛查基因检测高通量测序实验流程进行检测,其中质控应符合6的要求,检测结果应符合7.3的要求。

8.2 阳性符合率检测

采用阳性参考品或临床阳性样本10例进行检测,重复3次,其中质控应符合6的要求,其检测结果再根据公式:阳性参考品符合率=检出阳性位点数/所有阳性位点总数,计算结果应符合7.4的要求。

8.3 阴性符合率检测

采用阴性参考品或临床阴性样本10例进行检测,重复3次,其中质控应符合6的要求,其检测结果再根据公式:阴性参考品符合率=检测一致的参考品数量/检测参考品总数,计算结果应符合7.5的要求

8.4 检出限检测

选择阳性参考品或临床阳性样本，将样本设置为高于、等于及低于该突变的检出限。例如样本DNA投入量达300 ng才能检出目标变异位点，则DNA投入量分别设置为900 ng、300 ng和100 ng，每个梯度的样本至少5例，按照检测流程重复检测3次，其中质控应符合6的要求，其检测结果应符合7.6的要求。

8.5 精密度检测

采用参考序列参考品1例，阳性参考品或临床阳性样本至少每种突变类型各1例，使用同一批次参考品，3个不同实验员在相同条件下重复检测3次，其中质控应符合6的要求，其检测结果应符合7.7的要求。

8.6 干扰物质检测

实验室可根据厂家声明、临床需求和样本特点选择需要检测的干扰物质。例如评估外周血样本中血红蛋白浓度对检测结果的影响，选择200 g/L血红蛋白浓度（参考WS/T 416—2013 干扰实验指附录B）且经确认不含被测物的阴性参考品作为实验组，选择100 g/L浓度血红蛋白且经确认不含被测物的阴性参考品作为对照组。分别在实验组和对照组中加入含目标变异的阳性参考品，与常规样本一起检测，每组重复3次，检测结果应符合7.8的要求。

9 性能确认规则

9.1 临床应用质控要求

实验室建立携带者筛查检测程序后，检测程序正式应用前应先进行性能确认。

使用期间，实验室应建立室内质控体系，实时监控检测程序的稳定性，确保检测流程稳定、检测结果真实可信。

任何可能严重影响检测程序性能的情况，应在检测程序重新启用前对受影响的性能进行部分性能确认。

9.2 检测程序要求

9.2.1 检测程序应用前

检测程序正式应用前应先进行完整的性能确认。携带者筛查性能确认检测的参数应至少包括准确度、精密度和检出限，确认检测程序可以达到方法学建立时的预期性能，以及适用于预期临床用途。

9.2.2 检测程序应用中

当现有检测程序的以下要素发生变更，应按照新检测程序重新进行完整的性能确认，即性能确认检测的参数应至少包括准确度、精密度和检出限。

- 试剂升级或品牌替换：试剂直接涉及检测反应的特异性和灵敏度；
- 实验流程变更：任何实验步骤的变更都可能影响结果；
- 生信流程变更：生信数据分析的变化可能会影响变异检测的准确性；
- 标准操作程序（SOPs）的修订：SOPs的变更可能会影响整个检测流程。

当现有检测程序中以下要素发生变更，但未影响实验流程，应在检测程序重新启用前进行部分性能确认。部分性能确认实验应至少包含准确性和精密度，精密度可仅针对发生要素变更的实验环节，但准确性评估必须覆盖全流程检测程序。

- 操作人员变更：如果新加入的技术人员或分析师已经接受了相应的培训并通过了能力验证，可能只需要对其操作的特定部分进行性能确认；
- 解读流程变更：解读标准的变化可能会影响诊断结果；
- 质控标准变更：如果质控标准的变更不影响检测流程的核心部分，可能只需要对质控步骤进行性能确认；
- 数据分析软件更新：如果软件更新只涉及非关键功能的改进，可能只需要对相关功能进行性能确认；
- 分析参数调整：如果参数调整是微调，且在先前验证的范围内，可能只需要对调整后的参数进行性能确认；
- 实验室环境变更：如果环境变化在控制范围内，可能只需要对环境敏感步骤进行性能确认；

g) 法规和认证要求的变更：变更仅涉及文档和记录要求。

具体是否需要进行完整或部分性能确认，应遵循相应的法规、指南和实验室的质量管理体系的要求。在进行任何变更之前，应进行风险评估，并根据评估结果来确定所需的验证或确认的程度。

参 考 文 献

- [1] 谢晓媛, 李阔韬, 吴芳, 等. 孕前和孕早期155种单基因病扩展型携带者筛查的应用研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(11):2253-2257.
- [2] 中国遗传学会遗传诊断分会, 上海市遗传学会临床遗传与遗传咨询专委会. 综合性携带者筛查关键问题专家共识(2024版)[J]. 国际遗传学杂志, 2024, 47(01):1-11. DOI:10.3760/cma.j.cn231536-20231110-00047.
- [3] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会产前筛查和诊断学组. 孕前及孕早期常见隐性单基因遗传病携带者筛查临床应用专家共识[J]. 中华围产医学杂志, 2024, 27(1): 3-12. DOI:10.3760/cma.j.cn113903-20230922-00228.
- [4] 中国妇幼保健协会生育保健分会. 针对生育人群的携带者筛查实验室和临床实践专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2024, 44(2): 109-115. DOI:10.3760/cma.j.cn101441-20230829-00094.
-