

团 体 标 准

T/SZAS XXXX—XXXX

无创产前胎儿染色体非整倍体检测性能验证及室内质控规程

Performance validation and indoor quality control procedures for non-invasive prenatal fetal chromosomal aneuploidy detection

（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 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 缩略语 4

5 性能技术要求 4

6 性能验证方法 5

7 性能验证规则 6

8 质量控制要求 6

参考文献 8

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、天津华大医学检验所有限公司、哈尔滨医科大学附属第二医院、重庆市妇幼保健院、云南省第一人民医院、四川省妇幼保健院、武汉儿童医院、襄阳市中心医院、湖北省妇幼保健院、郴州市第一人民医院、长沙市妇幼保健院、郑州大学第一附属医院、惠州市第一妇幼保健院、海口市妇幼保健院、佛山市妇幼保健院、深圳市妇幼保健院、广州市花都区人民医院、广州市花都区妇幼保健院、厦门市妇幼保健院、浙江大学医学院附属妇产科医院、上海市第一妇婴保健院、济南市妇幼保健院、南京市妇幼保健院、安徽省立医院、西安交通大学第一附属医院、甘肃省妇幼保健院、山西医科大学第一医院、中国人民解放军总医院第一医学中心、内蒙古自治区妇幼保健院、天津市第一中心医院、河北省人民医院、武汉市中心医院、武汉大学中南医院、康圣序源生物科技（武汉）有限公司、阜阳市人民医院、温州市人民医院、武汉大学人民医院、深圳华大基因科技有限公司。

本文件主要起草人：吴亚、阳晶晶、吴平、许彩萍、刘晶娟、陈春兰、郑立丽、林婷、唐卫江、田志坚、李云、吴仁花、张美艳、王岩琦、刘梅梅、蒋燕、章锦曼、汪雪雁、何学莲、黄少军、宋婕萍、张昊晴、贺骏、郭艺红、陈剑虹、韩燕媚、刘娟、刘文兰、杜利军、林铿、周裕林、董旻岳、邹刚、金华、胡平、汪菁、白桂芹、郝胜菊、贺江梅、游艳琴、王晓华、徐凤琴、李亚丽、甘家骅、余丹、郑芳、夏琦、刘雷、宛杨、郑建琼、吴娟子、刘杨杨。

无创产前胎儿染色体非整倍体检测性能验证及室内质控规程

1 范围

本文件规定了无创产前胎儿染色体非整倍体检测的相关术语、检测质控要求、性能要求、参考品选用要求以及性能验证的方法。

本文件适用于基于高通量测序技术的无创产前胎儿染色体非整倍体检测，适用于该类型检测服务提供者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。

WS/T 416—2013 干扰实验指南

T/GDPMAA 0004—2020 基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术标准

T/SZGIA 2—2019 基因组从头组装质量指南

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

无创产前筛查 noninvasive prenatal screening

应用高通量测序等分子遗传技术检测孕期母体血浆中胎儿游离DNA片段，以此评估胎儿常见染色体非整倍体风险，主要目标疾病为21三体综合征、18三体综合征和13三体综合征。

3.2

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。

3.3

染色体三体综合征 trisomy syndrome

是染色体病的一种，指一个个体在1到22号染色体及性染色体上的某一条染色体数目额外增加了一条，使染色体数据从正常的46条变成47条，常染色体三体综合征是导致严重的出生缺陷及胚胎停育、早期流产、胎死宫内的重要遗传学原因。

[来源：T/GDPMAA 0004—2020, 定义3.7]

3.4

GC含量 GC content

是在所研究对象的DNA分子中，鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比例。

3.5

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, 定义3.8]

3.6

嵌合体 chimera

不同遗传性状嵌合或混杂表现的个体。

3.7

性能验证 performance verification

是一种通过提供客观证据来证明特定要求得到满足的过程，确保系统的分析性能或检验项目的方法学能够满足检测及临床要求。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
T21: 21-三体综合征 (Trisomy 21 Syndrome)
T18: 18-三体综合征 (Trisomy 18 Syndrome)
T13: 13-三体综合征 (Trisomy 13 Syndrome)
DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)
PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

5 性能技术要求

5.1 性能验证样本来源

性能验证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稳定数据支撑，即使用金标准方法（如核型分析）、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）。
性能验证还可使用性能稳定的第三方参考品。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。

5.2 性能验证样本类型

5.2.1 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，变异类型应覆盖检测范围内的全部变异类型，即产品包装范围内的全部变异类型。检测范围内未包含的变异类型，在选取阳性参考品时无需包含。
注：根据产品包装所包含的变异类型进行性能验证时应使用经验证过的准确可信的阳性参考品或临床阳性样本，产品包装所包含的变异类型简称目标变异。

5.2.2 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。

5.3 准确度

选择不含目标变异的阴性参考品或临床阴性样本至少5例，选择T21、T18、T13及其他含目标变异的染色体非整倍体的阳性参考品或临床阳性样本至少10例，按照无创产前胎儿染色体非整倍体实验流程进行测试，重复不低于3次。主要考察此产品检测系统的准确性，包括但不限于测序深度、上机测序及数据分析系统的准确性。最终结果根据表1的计算公式：准确度=(A+D)/(A+B+C+D)*100%，其准确度应符合试剂盒厂家要求。

表 1 检测结果与已知结果的比较

检测结果	真阳性	真阴性	合计
检测阳性	A	B	A+B
检测阴性	C	D	C+D
合计	A+C	B+D	A+B+C+D

5.4 阳性符合率

5.4.1 T21/T18/T13 阳性参考品符合率

选择T21、T18、T13的阳性参考品至少10例，检测时重复不低于3次。最终结果根据表1的计算公式：阳性符合率=A/(A+C)*100%，其阳性符合率应达到100%。

5.4.2 嵌合体参考品符合率

选择嵌合体参考品每种类型至少5例进行检测,最终检测结果70%异常嵌合体参考品应全部检出,30%异常嵌合体参考品应可检出或未检出。

5.5 阴性符合率

选择阴性参考品或临床阴性样本20例进行检测,重复不低于3次。最终结果根据表1的计算公式:阴性符合率= $D/(B+D)*100\%$,其阴性符合率应达到100%。

5.6 检出限

以试剂盒说明书内的检测限为参考,选择在检测限临界值的阳性参考品(T21、T18、T13)各1例,同时选择高于和低于试剂盒检测限的阳性参考品各1例,共9例参考品进行检测,每例重复不低于20次。参考品阳性检出率结果应不低于厂家规定范围。

注:例如其检测限为3.5%浓度的DNA,则可选择游离DNA终浓度分别为5%、3.5%、2%的阳性DNA与非孕期健康女性血浆混合物进行检测。最终5%浓度检测限参考品阳性检出率结果应为100%,3.5%浓度检测限参考品阳性检出率结果应不低于厂家规定范围。

5.7 精密度

根据检测通量选择一定数量的阳性参考品或临床阳性样本(至少包含T21、T18、T13)各3例,在同一批检测中进行至少3次重复,考察其批内重复性,在其他条件相同情况下,选择不同批次(例如选择人员或时间或设备或环境)进行至少3次重复检测,考察其批间重复性。最终批内重复和批间重复性应符合厂家规定范围。

5.8 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和WS/T 416—2013中的方法,按照不同梯度向基础血浆样本中分别加入潜在干扰物质,例如血红素、甘油三酯和胆红素可作为干扰物质。按照CNAS-GL039中推荐的试验测试浓度,可选择不同浓度的干扰物分别进行干扰物质测试,检测结果应满足厂家所规定的范围。

6 性能验证方法

6.1 准确度检测

选择不含目标变异的阴性参考品或临床阴性样本至少5例,选择T21、T18、T13及其他含目标变异的染色体非整倍体的阳性参考品或临床阳性样本至少10例,按照无创产前胎儿染色体非整倍体实验流程进行测试,重复不低于3次。最终结果根据表1的计算公式:准确度= $(A+D)/(A+B+C+D)*100\%$,结果应符合5.3的要求。

6.2 阳性符合率/敏感度检测

6.2.1 T21/T18/T13 阳性参考品符合率

选择T21、T18、T13的阳性参考品至少10例。所有参考品进行检测,重复不低于3次。最终结果根据表1的计算公式:阳性符合率= $A/(A+C)*100\%$,结果应符合5.4.1的要求。

6.2.2 嵌合体参考品符合率

选择嵌合体参考品每种类型至少5例进行检测,最终检测结果结果应符合5.4.2的要求。

6.3 阴性符合率

选择阴性参考品或临床阴性样本20例,按照无创产前胎儿染色体非整倍体实验流程进行测试,重复不低于3次。最终结果根据表1的计算公式:阴性符合率= $D/(B+D)*100\%$,结果应符合5.5的要求。

6.4 检出限检测

以试剂盒说明书内的检测限为参考，选择在检测限临界值的阳性参考品（T21、T18、T13）各1例，同时选择高于和低于试剂盒检测限的阳性参考品各1例，共9例参考品进行检测，重复不低于3次。结果应符合5.6的要求。

注：例如其检测限为3.5%浓度的DNA，则可选择游离DNA终浓度分别为5%、3.5%、2%的T21阳性DNA与非孕期健康女性血浆混合物进行检测。结果应符合5.6的要求。

6.5 精密度检测

根据检测通量选择一定数量的阳性参考品（至少包含T21、T18、T13）或临床样本各3例，在同一批检测中进行至少3次重复，考察其批内重复性，在不同批次（例如人员、时间、设备、环境等）进行至少3次重复检测，考察其批间重复性，其检测结果应符合5.7的要求。

6.6 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。干扰物质的检测可参考CNAS-GL039中的方法，按照建议浓度向基础血浆样本中分别加入潜在干扰物质，例如血红素、甘油三酯和胆红素可作为干扰物质。检测结果应符合5.8的要求。

注：按照CNAS-GL039中推荐的试验测试浓度，可选择20mg/dL的血红蛋白浓度、选择200mg/dL的甘油三酯、选择20mg/dL的胆红素分别进行干扰物质测试。

7 性能验证规则

7.1 检测程序应用前

新的检测系统在投入使用前需要对各项性能进行全面的验证。验证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。

7.2 检测程序应用中

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对受影响的性能进行完整性能验证。影响检测系统分析性能的情况包含以下要素：

- a) 试剂升级或品牌替换：试剂直接涉及到检测系统的分析性能；
- b) 实验流程变更：任何实验步骤的变更都可能影响结果。

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度、阴性符合率、阳性符合率和检测限，准确度评估必须覆盖全流程检测程序。以上提及的变更包含：

- a) 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，需要对其操作的特定部分进行性能确认；
- b) 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，需要对相关功能进行性能确认；
- c) 分析参数调整：调整关键指标参数，且在已验证的范围内，需要对调整后的参数进行性能确认；
- d) 实验室环境变更：如果环境变化在控制范围内，需要对环境敏感步骤进行性能确认。

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验证的程度。

8 质量控制要求

8.1 室内质控品要求

室内质控品应满足以下要求：

- a) 使用经性能验证的检测系统期间，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、检测结果应符合厂家规定的最低要求；
- b) 质控品可使用试剂生产厂商、第三方企业质控品或实验室自制质控品。建议使用第三方企业质控品，质控品建议从DNA提取开始到上机测序数据分析进行全流程覆盖的质量控制，质控品应包含阴性质控、阳性质控和空白质控。

8.2 方法学验证

在建立无创产前胎儿染色体非整倍体检测系统前，应经过严格的方法学评估和临床性能验证，确保检测方法和质量指标满足相应检测要求。

8.3 人员要求

开展此项技术的实验室对每个员工建立相应的人员档案，并建立健全人员培训与评估体系。每个工作人员均接受相应的生物安全、检测技术、工作能力的专门培训，并定期对每个员工进行工作能力的评估，对不合格工作人员进行再培训和再评估，确保检测工作人员资质和能力满足所从事的检测项目。

8.4 仪器要求

实验室在实验过程中使用的仪器均有相应的标准操作流程指导书，贵重或精密仪器操作人员需经过相应的培训，获得上岗证并授权后方可操作，每台仪器均有维护计划和相应的档案。

8.5 物料要求

选择合格的供应商，并定期对供应商进行评价。建立供应品的检验、接收和保存的程序及标准。对所有影响检测质量的服务和供应品进行管理，验证合格后方可用于检测活动。

8.6 环境要求

实验室设置需要严格遵照卫生部对临床基因扩增实验室的要求以及生物安全管理要求，实行严格分区单一流向，对温、湿度以及气溶胶等环境要素进行实时跟踪，定期监控，以保证实验活动在合格的环境中进行。

参 考 文 献

- [1]国家卫生健康委临床检验中心产前筛查与诊断专家委员会,王维鹏,李卉,等.孕妇外周血胎儿游离DNA产前筛查实验室技术专家共识[J].中华检验医学杂志,2019,42(5):6.DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2019.05.005.
- [2]ISO 15189《医学实验室质量和能力的专用要求》