

# 团 体 标 准

T/SZAS XXXX—XXXX

## 地中海贫血基因检测性能验证及室内质控 规程

Performance verification and internal quality control protocol for thalassemia genetic testing

(征求意见稿)

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

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 .....	2
5 检验过程要求 .....	2
6 性能验证要求 .....	4
7 室内质控规程 .....	5
8 室间质量评价 .....	6
附录 A（资料性） 推荐参考品变异位点 .....	7

## 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。

本文件由深圳华大医学检验实验室提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：深圳华大医学检验实验室、广西壮族自治区临床检验中心、武汉华大医学检验所有限公司、浙江省人民医院、深圳市宝安区妇幼保健院、深圳市龙华区妇幼保健院、温州市中心医院、武汉市中心医院。

本文件主要起草人：吴平、唐娟、吴亚、牟丹、唐少华、张锐、李艳雯、江蓓蕾、刘文、孙利、徐雪琴、甘家骅、余丹、王岩琦、黄晓燕。

# 地中海贫血基因检测性能验证及室内质控规程

## 1 范围

本文件规定了地中海贫血基因检测的性能验证及室内质量控制（室内质控）的过程，涵盖检测性能和室内质控的要求、性能验证的过程、方法和评估要求等。

本文件适用于临床实验室在正式进行地中海贫血基因检测（所选方法学包括但不限于：荧光PCR法、荧光PCR熔解曲线法、裂口PCR（gap-PCR）法、高通量测序法）前对检测试剂进行性能验证。对正在使用的检测试剂检测结果有疑问、查找原因可能与检测试剂相关时，也可采用本文件对其进行性能验证。

## 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 42060—2022 医学实验室—样品采集、运送、接收和处理的要求

YY/T 1527—2017  $\alpha/\beta$ -地中海贫血基因分型检测试剂盒

CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南

CNAS-CLO2-A001：2023 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 地中海贫血 thalassemia

又称海洋性贫血。是一组遗传性小细胞低色素溶血性贫血，其共同特点是由于珠蛋白基因的缺陷使血红蛋白中的珠蛋白肽链有一种或几种合成减少或不能合成，导致血红蛋白组成成分改变，临床大多表现为慢性进行性溶血性贫血。

### 3.2

#### 参考品 reference material

在一项或多项特性上具有足够的均匀性和稳定性，用于校准、给其他物质赋值或提供质量保证的物质。

### 3.3

#### 高通量测序 high-throughput sequencing

一类现代DNA/RNA测序技术的总称。其核心特点是能够一次并行对几十万到数百万条DNA分子进行同步测序，从而实现了在极短时间内对整个基因组或转录组进行详尽、快速且低成本的分析。高通量测序包括：基于“边合成边测序”原理的二代测序、基于“半导体测序”原理的二代测序、基于“单分子实时测序”的三代测序、基于“纳米孔测序”的三代测序等。

### 3.4

#### Q30

测序数据中，碱基识别质量值大于30的碱基占所有碱基的比例。

### 3.5

#### 平均测序深度 average sequencing depth

测序得到的落在目标区域的碱基数与目标区域长度的比值。

### 3.6

#### 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捕获芯片范围总区域的百分比。

### 3.7

#### 性能验证 performance verification

通过提供客观证据证明已满足规定要求，确认达到测量系统性能规范，满足目标测量不确定度。

### 3.8

#### 符合率 coincidence rate

测量结果与被测量真值之间的一致程度。

### 3.9

#### 重复性 repeatability

在相同的测量条件下（同一操作者、同一仪器、同一实验室、短时间间隔内），对同一被测对象进行连续多次测量，其结果之间的一致程度。

### 3.10

#### 重现性 reproducibility

在改变了的测量条件下（不同操作者、不同仪器、不同实验室、不同时间），对同一被测对象进行测量，其结果之间的一致程度。

### 3.11

#### 交叉反应 cross reaction

检测试剂（如抗体）与非目标分析物发生反应，从而导致假阳性或信号干扰的现象。

### 3.12

#### 检出限 limit of detection

检测方法能够可靠地检出的被测物的最低浓度或量。

### 3.13

#### 生物信息学分析 bioinformatics analysis

运用生物学、计算机科学、数学和统计学的方法，对测序数据进行获取、存储、管理、加工、分析、模拟和解释，以揭示生物数据背后所蕴含的生物学意义。

### 3.14

#### 室内质控规程 internal quality control (IQC) procedures

实验室内为持续监测和评价分析过程的稳定性，以确保患者样本检测结果的质量和可靠性而建立并遵循的一套系统性的操作程序、规则和标准。

### 3.15

#### 室间质量评价 external quality assessment (EQA)

由外部权威机构（如临检中心、质控中心）组织，多个实验室对同一批标本进行检测，然后由组织者收集、统计、分析和评价各实验室的回报结果，以此衡量各实验室检测质量的持续性和一致性的活动。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

## 5 检验过程要求

### 5.1 检验前质量控制

#### 5.1.1 确定样本类型

各实验室应根据检测范围及目的，确定应包含的样本类型，如外周血、羊水、脐血、绒毛、流产组织及基因组DNA等。

#### 5.1.2 样本采集及运输要求

样本运输过程应符合GB/T 42060—2022中第16章的要求。

### 5.1.3 样本采样量质量控制要求

各样本类型的采样量均应不低于检测试剂盒要求的最低采样量。

### 5.2 DNA 提取质量控制

应使用试剂盒配套或推荐的核酸提取试剂，提取的样本类型应符合提取试剂盒的说明书规定范围，并确保其提取效率满足要求，提取后的DNA总量应至少满足一次检测的需要。

核酸提取效率评价包括核酸浓度、纯度及完整性。

### 5.3 检测过程质量控制

根据地中海贫血基因检测方法学的不同，也应在检测过程中遵循不同的质量控制要求。每次实验应设置试剂空白、野生型、常见或最具有临床价值的基因型质控物，质控物应参与提取、扩增、产物分析全过程。

#### 5.3.1 基于高通量测序方法检测过程中的质量控制

如采用高通量测序的方法（包括但不限于本文件提到的二代测序、三代测序方法）进行检测，需要对测序过程中的建库、上机测序以及信息分析过程分别进行质量控制。

临床样本文库构建后进行浓度检测和片段检测，判定样本是否符合检测要求；文库构建的质量控制要求包含以下内容：

- a) DNA 浓度  $\geq 3.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，A260/A280 比值宜在 1.8~2.0 之间；
- b) 小片段文库的片段分布在 200bp~600bp 之间，主峰出现在 300bp~500bp 处；
- c) 大片段文库的片段分布在 400bp~850bp 之间，主峰出现在  $>500\text{bp}$  处。

#### 5.3.2 基于 PCR 检测方法过程中的质量控制

如采用基于PCR的方法（包括但不限于荧光PCR、PCR熔解曲线、裂口PCR）进行检测，则需根据对应检测试剂的实际要求，从DNA提取到扩增、电泳、反向点杂交进行质量控制，包括但不限于：

- a) 内参及管家基因 Ct 值或  $\Delta\text{Ct}$  值；
- b) 扩增曲线的线型；
- c) 熔解峰的峰型；
- d) 扩增产物电泳条带；
- e) 杂交点位置等。

### 5.4 检测后质量控制

测序下机后的数据建议关注以下关键指标：

- a) 平均测序深度；
- b) 覆盖度；
- c) Q30；
- d) 污染比例。

这些指标的实测值应不低于各平台设置的最低要求。其中，目标区域的平均测序深度应根据检测策略对基因变异判定所需的数据深度的需求而定。

测序下机原始数据经过滤后，其余指标的建议合格标准为：

- a) Q30 应不低于 75%；
- b)  $20\times$ 覆盖度应不低于 97.5%；
- c) 生物信息学分析环节提示无污染。

#### 5.4.1 报告发放质量控制

报告环节接收到报告后应对报告进行预览审核，保证报告的完整性，报告模板及格式无错误，报告信息无缺失，检测结果与报告生成体现一致，如发现异常立即反馈上游环节进行核实并跟进处理。

报告审核后需对报告进行领取及复核工作，保证报告签章无缺失及其他异常，即将发出的报告数量与接收到的报告数量一致，报告接收人信息完整方可发出报告。

#### 5.4.2 样本存储和销毁

医学检测样本为确保检测结果可溯源性，不同类型样本留样储存时长和环境应符合相关法律法规要求。

外周血和DNA应储存于-20℃及以下温度中，保存年限应为3年。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，并留存销毁记录。

### 6 性能验证要求

#### 6.1 性能验证时机

6.1.1 实验室建立起地中海贫血基因检测程序后，检测患者样本前应先进行性能验证。开展检测的实验室可利用日常工作产生的检验和质控数据，定期对检验程序的分析性能进行评审。

6.1.2 任何可能影响检测程序性能的情况发生前，如发生试剂升级、试剂替换、实验流程变更、生物信息学分析流程变更、解读流程变更等情况，应在检测程序重新启用前进行性能验证。

6.1.3 影响检测系统的分析性能时，包括但不限于仪器主要部件故障、更换、仪器搬迁等。

#### 6.2 性能验证样本要求

##### 6.2.1 性能验证样本来源

按照以下原则选择用于地中海贫血基因检测性能验证的样本：

- a) 性能验证样本可使用已知临床样本，包括阴性（野生型）、阳性样本（基因变异位点）。该样本应采用已确认的检测程序来提供位点数据，如经国家卫生管理部门批准的体外诊断医疗器械使用说明书中规定的程序；
- b) 性能验证亦可使用第三方参考品，即不由检测系统厂商或试剂盒配套提供的参考品。该参考品不受配套的检测系统影响，性能足够均匀和稳定，和临床样本相近，且结果可信。

##### 6.2.2 性能验证样本种类

用于地中海贫血基因检测性能验证的样本应符合以下要求：

- a) 阳性参考品或临床阳性样本：选取的变异位点应在试剂盒检测范围内，并经验证、准确可信的阳性变异位点；
- b) 阴性参考品或临床阴性样本：选取两个及以上二代测序平台交叉验证，无目标变异的参考品或临床阴性样本。

#### 6.3 性能验证评估要求

##### 6.3.1 符合率

按照CNAS-GL039描述的方法进行测定，每种试剂盒声称的样本类型选取不少于10例阴性临床样本、不少于10例阳性临床样本（覆盖不少于10种常见突变位点）以及阴性、阳性参考品（推荐参考品及突变位点设置见附录A），使用待确认的检测系统进行检测，符合率评估合格要求为：

- a) 阳性参考品在检测系统覆盖范围内的位点应全部无阳性变异检出；
- b) 阴性临床样本，检测结果应均为阴性；
- c) 阳性参考品和阳性临床样本检测结果应均为阳性，且符合相应的基因型别。

##### 6.3.2 重复性

按照CNAS-GL039描述的方法进行测定，使用同一个批次的阴性参考品、阳性参考品或阴阳性临床样本（需覆盖检测试剂盒声称的突变类型和样本类型），在同一个检验批次内进行三次重复检测。合格要求为：

- a) 阴性参考品或阴性样本在检测系统覆盖范围内的位点，三次检测应全部无阳性变异检出；

- b) 阳性参考品或阳性样本在检测系统覆盖范围内的变异位点，三次检测应全部检出。

### 6.3.3 重现性

按照CNAS-GL039描述的方法进行测定,使用同一个批次的阴性参考品和阳性参考品或阴阳性临床样本(需覆盖检测试剂盒声称的突变类型和样本类型),分三个批次进行重复检测。合格要求为:

- a) 阴性参考品或阴性样本在检测系统覆盖范围内的位点,三次检测应全部无阳性变异检出;  
b) 阳性参考品或阳性样本在检测系统覆盖范围内的变异位点,三次检测应全部检出。

### 6.3.4 交叉反应

按照CNAS-GL039描述的方法进行测定,使用待确认的检测系统检测阳性参考品或阳性临床样本(需覆盖检测试剂盒声称的突变类型和样本类型),结果应满足:

- a) 各试剂盒检测范围内检出型别应与阳性参考品或阳性临床样本型别结果一致;  
b) 对于本检测系统包含范围外的型别,检测结果应为阴性。

### 6.3.5 检出限

按照CNAS-GL039描述的方法进行测定,将阳性参考品或阳性临床样本(需覆盖检测试剂盒声称的突变类型和样本类型)梯度稀释至厂家试剂使用说明书声称的检出限浓度,稀释液可选用阴性血清,使用待确认的检测系统进行5次或不同批内对该浓度样本进行20次重复测定(如测定5天,每天测定4份样本),结果应满足:

- a) 检测结果应均为阳性,且符合相应的基因型。

### 6.3.6 核酸提取效率

按照YY/T 1527—2017的要求,对至少4分试剂盒所规定的最小量外周全血、胎儿羊水细胞或模拟液进行提取,每个样本进行2个重复检测,检测结果应满足:核酸浓度应不低于10 ng/ $\mu$ L。

## 6.4 结果判定

符合率、重复性、重现性、交叉反应、检出限评估均合格,则该实验室的地中海贫血基因检测系统可被认定为性能符合。

## 6.5 不合格措施

如性能验证不符合,应排查实验及分析流程,修正检测程序后重新进行性能验证。

## 7 室内质控规程

### 7.1 室内质控时机与室内质控品选择

实验室应建立室内质控体系,长期监控检测系统的稳定性。室内质控推荐使用第三方参考品或临床阳性样本,与待检样本一同进行全流程检测实验与分析。室内质控品应满足空白、阴性及至少包含一种阳性参考品。阳性参考品建议每半年至一年进行一次更换(需更换与上一周期不同的型别),其余要求同6.2.2。

### 7.2 室内质控评估要求

#### 7.2.1 结果判定

室内质控品需与待检样本一并进行全部实验流程。应符合CNAS-CL02-A001:2023的规定,合格要求为:

- a) 各实验环节均应达到相应的质控指标,要求见5.2,5.3;  
b) 阴性参考品在检测系统覆盖范围内的位点应全部无阳性变异检出;  
c) 阳性参考品在检测系统覆盖范围内的变异位点应全部检出。

#### 7.2.2 不合格纠正措施

室内质控品不满足7.2.1的合格要求时，室内质控不合格，应查找失控原因、采取纠正措施、重新实验。

## 8 室间质量评价

实验室应制定室间质评计划和措施，计划性地定期参与外部质量控制活动，如国内外实验室认可机构组织的能力验证活动，实验室主管机构组织的比对活动，国际间、国内同行间的实验室比对试验等，并在实验结束后提交相应实验记录、实验结果等相关文件。根据室间质评结果评估实验室的检测准确性，并对不符合项目应分析原因、采取相应的纠正措施，持续改进。

附 录 A  
(资料性)  
推荐参考品变异位点

表 A.1 推荐参考品变异位点

序号	突变类型	变异位点
1	阴性	阴性
2	$\alpha$ 缺失+ $\beta$ 突变	复合杂合子 IVS-II-654 (c.316-197C>T) 及 CD71-72(+A); $\alpha\alpha$ /- $\alpha$ 3.7
3	$\alpha$ 缺失+ $\beta$ 突变	$\alpha\alpha$ /- $\alpha$ 3.7, Codon 5 (-CT) beta0 杂合
4	$\alpha$ 缺失	$\alpha\alpha$ /--FIL
5	$\alpha$ 缺失	$\alpha\alpha$ /--SEA
6	$\alpha$ 缺失	$\alpha\alpha$ /--THAI
7	$\alpha$ 突变	Hb Constant Spring 杂合
8	$\alpha$ 突变	Hb Amsterdam-A1 杂合
9	$\alpha$ 突变	Hb Quong Sze 杂合
10	$\alpha$ 突变	$\alpha$ : Fusion gene/ $\alpha\alpha$
11	$\beta$ 缺失	台湾型缺失杂合
12	$\beta$ 缺失	SEA-HPFH 缺失杂合
13	$\beta$ 突变	Codon 17 (A>T) beta0 杂合
14	$\beta$ 突变	Codons 71/72 (+A) beta0 杂合
15	$\beta$ 突变	Codons 41/42 (-TTCT) beta0 杂合
16	$\beta$ 突变	Hb E beta+ 杂合, IVS-I-1 (G>T) beta0 杂合, 复合杂合子
17	$\beta$ 突变	Codon 54-58 (- TATGGGCAACCCT)beta0 杂合
18	$\beta$ 突变	Hb E beta+ 杂合