
基于孕妇游离DNA的胎儿染色体非整倍体检测试剂质量
控制技术评价指南（高通量测序法）

1.前言

对孕妇外周血中游离 DNA 进行高通量测序(High-Throughput Sequencing), 并分析孕妇外周血中携带的胎儿的染色体突变异常风险, 特别是染色体非整倍体变异的检测, 是近几年出现的无创产前筛查新技术。

本指南旨在规范申请人在胎儿染色体非整倍体检测试剂盒(高通量测序法)的产品设计开发、性能评价的指标和要求, 并为技术审评部门对注册申报资料的技术审评提供参考, 不代替注册申报资料的准备及撰写的指南和规范。

本指南主要是对企业研发、质检和产品应用相关质量控制和分析的指导性文件, 应在遵循相关法规的前提下使用本指南。

本指南仅作为技术指导性文件使用, 需根据技术的发展和实际需要进行适当的更新, 本指南不具有法律强制性。

2.适用范围

本指南所述的胎儿染色体非整倍体检测试剂(Noninvasive Prenatal Test, NIPT)是采用低深度全基因组的高通量测序法, 指的是直接通过对孕妇外周血中游离 DNA 进行文库构建、上机测序的第二代高通量测序方法, 并不完全适用于高深度的目标片段测序法, SNP 突变测序法和表观遗传学甲基化的测序法等其他高通量测序法。和本指南不相适应的其他高通量测序法, 可以参照本指南的性能评价、质量控制的要求, 并通过企业参考品, 证明和本指南的要求具有实质性的等效性。

对于第三代单分子测序或其他测序方法, 在文中并未涉及, 但高通量测序技术发展迅速, 第三代单分子测序方法在企业内部参考品设置、性能评估等, 如有适用的方面, 可以参照执行并证实实质等效性。

适用检测类型：胎儿染色体非整倍体 (fetal chromosome aneuploidies) 中的 21 三体、18 三体、13 三体 (Trisomies 21、18、13, 即 T21、T18、T13)。本指南也可适用于其它胎儿染色体非整倍体的检测, 如 XXX, XYY, XXY, T9 等。

适用人群：对孕周 12 周 (包含 12 周) 以上的孕妇进行产前筛查, 其结果不能代表对孕妇怀有三体胎儿的确认, 必须要经过产前诊断进行确认。

伦理学问题：终止妊娠应在遵守我国相关法律法规和行业规定的前提下选择, 该项检测不得作为终止妊娠的依据。

3. 诊断试剂的设计开发要求

基于游离 DNA 的胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 的设计和原理至少要考虑到以下几个方面：

3.1 预期用途

明确胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 的预期用途, 包括定性或定量检测、被测孕妇孕周特征、样本类型和被测物等。按照《体外诊断试剂说明书编写指导原则》进行, 介绍临床适应症及背景, 说明相关的临床或实验室诊断方法等, 应介绍产前诊断金标准。明确该产品作为产前辅助诊断用途, 其结果要由产前诊断金标准进行确认。

3.2 测试方法学

阐明胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 的设计原理和方法学, 需要重点指出设计原理和方法的关键点：(1) 详细说明母体胎儿游离 DNA 判断染色体数量和检测变量的相关性；(2) 详细说明实验过程如高通量测序的文库构建方法及原理；(3) 在实验过程中的质量控制和标准品的构建；(4) 数据分析和算法的详细说明等。

如低覆盖全基因组的胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 原理是：孕妇母体血浆中存在胎儿游离 DNA (cffDNA, cell-free fetal DNA), 片段长度主要为 ~160bp, 几

乎全部来源于胎盘的滋养层细胞,其浓度和孕周密切相关并以一定比例稳定存在于母体外周血浆中。取母体血浆提取包含正常母体和胎儿的血浆游离 DNA, 不经过处理或经过片段化选择, 通过文库构建, 最后进行上机测序, 再通过软件分析数据获得染色体数目评价结果。当对怀有 T21 胎儿的母体血浆游离 DNA 数据进行分析时, 其 21 号染色体游离 DNA 总数会有小比例的升高, 结合生物信息学分析方法, 对 21 号染色体所属的 DNA 片段数量进行统计, 与大量样本构成的参考集合相比较, 根据数理统计的原理和血浆 DNA 测序数量的结果、染色体数量的相对变化, 通过统计学算法区分这一微小差异来实现利用孕妇血液中胎儿游离 DNA 进行胎儿染色体非整倍体的产前筛查。

但高通量测序法不能对染色体结构异常进行检测, 不能代替传统筛查中的开放式神经管缺陷筛查等。

3.3 主要原材料

胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 的主要原料是指所有与预期用途相关原材料, 包括从 DNA 提取之后到测序文库装载入测序芯片之前的重要试剂。主要原材料一般由: 相应功能的酶 (末端修复酶、DNA 连接酶、缺口修复酶 DNA 聚合酶等)、核苷酸序列 (如引物、接头序列、标签序列等)、缓冲液及 dNTP 组成。

3.4 辅助试剂组成的要求

辅助试剂组分分为如下几个部分:

- (1) 采样时所需要的试剂或材料
- (2) 与采样得来的孕妇外周血或者血浆的保存、运输和储存相关的试剂或材料
- (3) 和血浆 DNA 提取相关的试剂或材料
- (4) 和特定的高通量测序仪相关的通用测序试剂及耗材
- (5) 在实验过程中使用的其它耗材和通用试剂

辅助试剂必须在说明书中说明而且在整个实验流程中得到充分验证的试剂，可以是检测试剂盒的一部分也可以分开申报，但是胎儿染色体非整倍体检测试剂和辅助试剂应该作为整体评估。

3.5 企业质量控制参考品

如采用低深度全基因组测序方法的胎儿染色体非整倍体检测试剂（NIPT），应满足国家标准品或经过标化的企业参考品的要求，企业参考品的设置应参照国家参考品进行；采用其他原理的胎儿染色体非整倍体检测试剂（NIPT），企业则需提供企业参考品，并且证明其实质性的等效性。

3.6 测试结果的解释

目前的报告内容，至少要有检测项目及项目设定阈值，样本编号，样本基本信息，采样时间地点，检测时间地点，采用的仪器设备、试剂、检测人员、检测结果、结果解释和建议。

（1）检测有效性

应建立检测有效性的评价指标。如采用阴、阳性质控品的方式进行同时检测，以阴、阳性质控品的结果反映检测的有效性。如阴性质控品结果必须为阴性，阳性质控品结果必须为阳性，说明此反应体系结果有效。

（2）结果判断

应给出目标疾病检测值、参考范围、低风险或高风险结果。

（3）结果描述与建议

建议阳性结果的受检者进一步向临床医生咨询，结合临床金标准方法染色体核型分析及其症状/体征、病史、其他实验室检查等情况综合考虑进行确诊。

3.7 测试方法的局限性

应注明测试方法存在的局限性。可从检测原理本身的局限性、受试者的生物学效应等方面进行分析汇总后给出，并注明其对结果造成的影响。

(1) 检测方法局限性

胎儿染色体非整倍体检测试剂 (NIPT) 一般采用统计学方式进行测试样本和大样本参考数据进行比较的方法进行结果判定，统计学方式本身存在一定概率的假阴性、假阳性。

(2) 受试者的个体化差异

鉴于当前医学检测技术水平的限制和孕妇个体差异，有下列情形的孕妇进行检测时，可能影响结果准确性。包括：1) 孕周 $<12+0$ 周、孕妇重度肥胖 (体重指数 >40) 等造成的胎儿游离 DNA 浓度低。2) 夫妇一方有明确染色体异常。3) 1年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等。4) 胎儿超声检查提示有结构异常须进行产前诊断。5) 有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患基因病高风险，胎儿染色体平衡异位、缺失微重复等。6) 孕期合并恶性肿瘤。7) 胎盘局限性嵌合。8) 通过体外受精-胚胎移植方式受孕。9) 双胎及多胎妊娠。10) 有染色体异常胎儿分娩史，但除外夫妇染色体异常的情形。11) 医师认为有明显影响结果准确性的其他情形。

但是检测方法的局限性可采取其他辅助的方式或其他有效手段增加检测的准确性来避免其相应的局限性。如体外受精-胚胎移植方式受孕受试者可以采取胚胎植入前染色体非整倍体的检测；1年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等受试者采取同时检测异体样本的方式提高其准确性。

4. 诊断试剂设计开发流程的质量控制要求

4.1 检测分析前质量控制

(1) 标本收集和处理

样本的采集和处理应经过验证。试剂需指出适应样本采集和处理过程，说明对采血管及抗凝剂的要求，适用样本和质量，要求应用的血液的采集配套试剂和耗材。注明样本的包装，保存和运输的流程。

需指出孕妇外周血样本的采集管，保存条件（温度、时间长度），运输条件，处理条件（如：必须规定多长时间内分离血浆）；已分离的血浆样本的保存管，保存条件（温度、时间长度），运输条件，处理条件（如：核酸提取前的预处理）；冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求；例如：使用 EDTA 抗凝采血管进行取样；颠倒混匀时动作应轻柔，防止溶血；全血离体后必须在 8 小时内进行血浆分离；血浆分离过程中注意不要吸到中间层的白细胞；血浆样本反复冻融次数应不超过 2 次；禁止将普通 EDTA 抗凝管采集样本和血浆样本在室温状态下放置等（注：随着技术的进步，采血管的发展也日新月异，使用其他特殊的 NIPT 检测采血管例如 Streck 和 K 管时，应经过充分的验证，不仅仅是对采血管，而且应该包括适用的血浆分离时间）。

血浆样本寄送采用干冰运输，并应监控运输条件；详细描述并记录合适的外周血采集量，如最少不得少于 5mL。

建立并记录当样本来源于外部样本提取的 DNA 是否适用于检测，并建立和记录外源样本需求标准。

样本应详细记录是否有测试局限性所规定样本类型，如：孕妇本人为染色体非整倍体疾病患者、其他染色体疾病患者或携带者；怀有双胎或者多胎（三胎及三胎以上）的孕妇；近期接受过移植手术、干细胞治疗；近期接受过免疫治疗或输注过异体血制品；孕妇本人为肿瘤患者；通过体外受精-胚胎移植（IVF-ET）方式受孕的孕妇；体重严重超重的孕妇等。

(2) 标本质量

建立并记录标本接收和拒收的关键标准，如是否有以下情况：1) 样本出现溶血的情况；2) 样本标签不清晰的情况；3) 样本信息与临床信息不符的情况；4) 血浆样本出现裂管、开盖、泄漏或样品外溢情况等；并保证在研究、检测过程中符合伦理和法律的要求。

4.2 检测分析中质量控制

应该对从检测样本到检测结果的检测周期给予说明，包括 DNA 提取，文库构建，测序，数据分析和报告的流程。

(1) DNA 的提取的流程

应说明 DNA 提取所用的试剂（盒），要求该核酸提取试剂（盒）获得批准并经过测试证明其适用性，使用在有效期内的核酸提取试剂盒。

应说明 DNA 提取的血浆样本起始量，说明可能会影响血浆提取效率的因素，比如蛋白酶 K，干扰物质等；对检测过程控制或检测体系监测的标准品、参考品和模拟样本的提取和制备过程也应进行说明。

血浆 DNA 提取应当在标本制备区进行，各项操作应当符合标准操作流程和说明书要求。

剩余的血浆样本应当在规定的条件下（如-20℃或-70℃以下）保存至规定的期限，避免反复冻融。

(2) DNA 质量及处理

应设立对用于建库的 DNA 质量控制标准，如规定建库的 DNA 量并设立最低起始量等，并采取合适的形式进行检测或验证。应记录样本提取的 DNA 浓度、体积，记录测试 DNA 浓度的方法（如荧光法、荧光 PCR 法等）。

(3) 文库制备

文库制备应当严格按照标准操作流程进行。确定并记录文库制备的方法；文库制备过程中的纯化试剂应有测试和优化的记录并经过验证；指出可能影响文库构建的因素；使用 **barcode** 对多个样本进行区分，每个样本应建立一个或一组唯一的 **barcode**；应对样本间 **barcode** 串扰进行评估并记录；多个样本的 **pooling** 的相应研究，可以是等体积或等量的，应建立流程并验证；考虑是否进行平衡文库的制备，质量和相关性的研究，其作用相当于一个流程质控品对测序质量和文库构建以后的流程进行监控，即使该平衡文库会占用一定的数据量，但是不应该对预期检测有影响。

当多个样本一同检测时所有扩增产物均可以得到准确和可重复的结果，每个独特的标签 **barcode** 只能用于一个标本，但当样本数量大于标签 **barcode** 数时，只要不在同一个反应池或者同一个 **pool**，标签 **barcode** 都是可以重复使用的。

(4) 文库质量控制

应建立文库质量控制的标准。建立文库检测浓度及文库片段分布范围的指标并验证。如有必要，文库的量应根据所使用的测序平台和芯片设立参考值，应规定装载测序芯片需要的测序文库使用量。DNA 文库和上机测序文库如有区别，应评价两者质量控制的相关性。如使用标签 **barcode** 对多个 **pooling** 文库进行区分，应评估并记录在 **pooling** 文库间标签 **barcode** 串扰。

应建立文库质量控制的方法。如采用荧光定量，2100 分析或酶标仪定量等方法进行检测。

根据不同测序平台之间的差异，应记录从 DNA 文库制备到加载芯片全过程的处理步骤和相应的质控参数，如需要多少 DNA 文库，产生多少测序文库，使用了多少测序文库来加载测序芯片，文库的质量是如何评估的等等。

(5) 测序流程质控

不同测序仪有不同的质控方法，需根据不同的测序仪器和方法，建立测序仪的主要质量控制参数。

1) 测序以及碱基识别

应对测序片段进行碱基识别和质量评分分析并记录，质量评分分析可以采用各种适用的方式，如 Q score（如 Q30）、聚类分析和 cluster 过滤比率、读长(例如读长的数量)、唯一比对序列的百分比（在去除重复的序列之前）、重复读长的百分比（能够反映出在同一位置开始的读长数量，同时也能显示库的复杂性）等。应建立合理的质量评分指标并验证。

2) 比对或组装

测序下机后的原始数据，首先，要去除一些低质量的序列（如根据 Q 值过滤），然后根据样本的标签进行拆分后的数据才能进行序列比对。

应详细说明并记录所使用的数据库（如有使用），如数据库的来源，构建，设置，版本，如何维护其版本。在实践中通常是使用 NCBI 下载的人源公共数据库，特别说明下载后对数据库进行了如何处理。说明是否序列是针对人类参考基因组还是针对目标序列。如果使用云端分析软件，对人类参考基因组使用的文件登记号和版本号也需要指明。在数据分析中，应说明新版本的数据库或者新数据库是如何适用于试验中，否则应限定所使用的数据库版本。

应建立比对的质量控制标准，可以采用读长对比参考基因组的百分比、读长对比目标区域的百分比、读长正确率、目标覆盖率、对比到人类参考基因组序列（或目标序列）的偏差率、覆盖的深度等技术指标中一个或多个进行组合确定比对的质量控制标准。

3) 生物信息学分析

应详细说明并记录使用到的所有软件，包括软件源（如自主开发、第三方开发）及所有修改记录。描述并记录所有数据处理和分析过程，包括变异检测、过滤和注释过程。详细说明并记录软件是在本地运行还是远程运行（如基于云计算）。

生物信息分析应说明测序的原始数据处理过程，如重复序列过滤、唯一匹配序列的计算、GC 校正等原始数据均一化的处理过程。数据分析的流程可以部分使用模拟数据测试,但必须使用真实的实验结果对其进行校正。如：估算人的基因组被打断成 200bp 长的片段数据量时，可以得到 150M 的数据量，但是必须测序平台和实验条件验证，才可以内置在分析的参数中等。如果用外挂的数据库和校正的参数，生物信息分析应该说明是如何实现，使用和进行质量控制的。

4) 检测阈值或参考值的设定

检测风险值一般是根据在一个测序检测体系中的染色体的有效数量或者是染色体片段的有效数量的分布情况，和其他大样本实验统计的相对应的染色体的有效数量或者是染色体片段的有效数量的分布的比较来判定的。

由于目前胎儿染色体非整倍体 T13、T18、T21 的风险值测算存在多种计算方式，且更好的算法和数据处理方式仍在不断开发中。

应确定参考值的计算方式的算法，并详细阐述选择该算法作为依据的原因（如权威文献、行业共识等），详细阐述计算公式和各参数代表的意义并提交采用不少于规定数量的真实临床样本对参考值的试验验证资料。

鉴于并无 100% 阴、阳性分界点，应考虑是否设置参考值的灰区范围，灰区的设定应提交理论和实际试验结果的依据，并在说明书参考值和检验结果的解释项进行解释说明，如是否需要用产前诊断的方式进行最终确认，可能的原因，是否需要孕龄再大时进行再次抽血复测等。如果不进行灰区设置，需要使用临床数据统计结果进行验证说明。

Z 检验 (Z Test) 是一般用于大样本平均值差异性检验的方法。它是用标准正态分布的理论来推断差异发生的概率, 从而比较两个平均数的差异是否显著。Z-值的应用条件为大样本量以及数据符合正态分布。

以大样本常用的 Z-值 (Z-score) 算法来举例说明, 使用比对软件 (如 BWA、SOAP 等) 将测序获得的数据比对到人类参考基因组 (如 NCBI build37), 使用不容错比对模式并且不允许空碱基间隙 (gap); 去除比对不上的序列、比对到多个位置的序列、重复比对的序列后, 采用唯一比对的序列进行后续统计。获得大样本样品的总有效数据 (*Total mapped reads_n*) 以及比对各个染色体有效数据 (*Mapped to chromosome_{nm}*), 为了消除不同样本的测序数据量差异对检测结果的影响, 分别将各个染色体的有效数据除以总有效数据即获得有效数据百分比 (Unique Reads ratio, UR%), 计算公式如下:

$$UR_{nm} = \frac{\text{Mapped to chromosome}_{nm}}{\text{Total mapped reads}_n} \times 100\%$$

其中 m 为染色体编号, $m \in (1..22, X, Y)$, n 为大样本样品数。影响唯一比对序列的因素包括 GC 含量、覆盖度等, 应计算并统计检验覆盖度是否在正常范围内。计算大样本样品的 UR 均值及方差, 计算公式如下:

$$UR_mean_m = \frac{\sum_{k=1}^n UR_{km}}{n}$$

$$SD_m = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (UR_{km} - UR_mean_m)^2}{n}}$$

其中 m 为染色体编号, $m \in (1..22, X, Y)$, n 为大样本样品数。

计算每个样品各个染色体的 Z 值, 计算公式如下:

$$Z_{nm} = \frac{UR_{nm} - UR_mean_m}{SD_m}$$

其中 m 为染色体编号, $m \in (1..22, X, Y)$, n 为样品数。

根据统计学原理, 出现在 Z-值为正负 3 以外的数值, 则有 99.9% 的可能为阳性, 因此, 通常将 Z-值=3 定为参考值分界点。|Z-值|>3 则判断为胎儿染色体非整倍体阳性。

如果某个样品的染色体 chr21 的 Z 值大于 3,则认为该样品的 chr21 的 UR 显著($\alpha < 0.005$) 离群,即 chr21-三体。

根据实验数据的正态性,为达到一定可信度,需规定和使用一定数量的真实的大样本的测量结果来设定合理的阈值或参考值。如在诊断试剂开发过程中,至少应采用 2000-5000 例样本来设定 Z 值计算的相关参数,从而 Z 值设定可信,也可以加灰区来帮助设定可信度,再用一定数量的样本对设定的 Z 值进行验证。

5) 数据存储要求

检测数据应当进行安全备份,并与互联网物理隔离。可追溯原始序列的核心数据保存规定的期限。详细说明并记录数据存储路径,如有本地存储,应该说明本地存储所需要具备能力,和存储备份的时间表和建议。应说明数据库是否为云端存储,和数据库更新的流程和管理模式。

4.3 检测分析后质量控制

1) 报告的输出和系统链接

报告的输出应该可以溯源到原始数据,如果报告输出是可以通过网络链接的,确认和批准的流程应该建立。

2) 结果的报告和解释

应建立标准化的结果报告格式,目前的报告内容,至少要有检测项目及项目设定阈值,样本编号,样本基本信息,采样时间地点,检测时间地点,采用的仪器设备、试剂、检测人员、检测结果、结果解释建议和发报告的流程及信息。

注明本检测结果不作为唯一的确定性诊断,但应该指明病人在不同情况下应该和医生进行的沟通和咨询,以及可能的或辅助的确诊方式。

4.4 检测过程中的质控品

流程中使用的质控品是指在检测流程中加入的质控品，其目的是用于控制实验流程的重复性或效率，保证检测的有效性等。例如：

阴阳性质控品：应设置过程控制阴阳性质控品，须能够监控从样本 DNA 片段到最终测序结果全过程。阴性质控品、阳性质控品的浓度根据不同的测序平台的需求确定。建议每个检测 run 或测序都要进行阴阳性质控品的检测。

根据开发的需要，可以选择性的使用其他质控品，用于部分流程的监控，例如：

(1) 检测扩增效率的质控品：建库中末端修复加完接头后，在扩增前加入已知的序列来确认扩增的好坏；(2) 样本混合前的标签：加的样本 barcode 或标签用以区分不同样本或混合的不同的文库；(3) 平衡文库：在测序前或 pooling 前后加入的标准测序文库来平衡测序文库中的碱基分布，可以用于确认从测序文库到测序芯片的操作的稳定性和重复性等。

5. 诊断试剂产品质量控制的要求

体外诊断试剂检验结果的准确性、不同厂家同类产品检验结果的一致性是产品质量的重要议题。产品的质量评价一般要考虑与产品性能密切相关的准确度、特异性、重复性、检测限等指标。

5.1 测序平台的适用性

目前商业上常用的第二代测序平台根据测序原理可分为光学技术 (Illumina 公司、华大基因公司为代表)和半导体技术 (Thermo 公司为代表)。每个测序平台都有各自的特异性参数，包括仪器大小、通量、读长、运行时间及测序成本等，企业应结合具体的临床应用需求选择合适的测序平台并进行评估。

5.2 文库构建和测序策略

不同的测序平台要求的测序检测方法和文库构建方法也有所不同，与测序检测方法相对应的文库构建方法应该给予充分的考虑，特别是要求和预期用途匹配。

尽管在给予其它的高通量测序方法的企业参考品一定的考虑和设计以后，本指南也可能适应于其他的染色体非整倍体的无创产前筛查，但是这里主要针对低覆盖度全基因组的高通量测序方法。文库构建的方法学应阐明其相应的变量和测序策略的结合，如：测序类型（如单末端测序 SE 或双末端测序 PE）；测序的序列组成，大小，长度和方向；测序的样本标签，组合标签或者其他有用的拆分标签；样本或者文库的混合方法（Pooling）；文库的扩增和纯化；文库接头是否加标签；样本 DNA 是否有预扩增和处理等。

鉴于目前高通量测序技术的复杂程度，在文库构建、测序等技术过程中发生认为错误或意外的情况不能完全避免，应针对文库构建失败率进行限定，国家参考品中的文库构建失败率应不高于 1%。

5.3 检测的数据量控制

在母体血液中胎儿的游离 DNA 片段是随机的序列而不是一个固定的序列，尽管其浓度随着孕周增加而增加，但是其序列则每次采样都会有不同。按照统计学基本原理要求进行正态分布的评估，reads 数是否属于正态分布与数据量具有直接的关联。染色体数量变异检测对数据覆盖度有一定要求，通常来讲，覆盖度越高，检测精度越高越准确。而当总体数据覆盖度和待检验对象（如 21 号染色体）覆盖度达到一定水平时（如不低于 1%），方能代表染色体总体变异情况。通过综合考虑其他因素，如实验间波动、人员操作系统差异等，设定合理的质控标准。

在现行的国家参考品中，考虑到降低数据量可能导致假阴性和假阳性发生，单个样本数据量的要求是不低于 3.5M。

在现有的技术改进中，部分企业采用片段化选择的方式对样本提取的游离 DNA 或文库构建后的产物等过程中进行片段筛选，以提高胎儿游离 DNA 和母体游离 DNA 的相对比例，其数据量控制要求应进行验证后提供合理的有效数据量控制指标。

5.4 检测的阴阳性符合率

采用全基因高通量测序法在检测血液中的游离 DNA 的时候可以检测到的 DNA 片段有许多种类，如：胎儿的游离 DNA、母体的游离 DNA、病原体的游离 DNA、试剂中污染物种的 DNA、来自环境的 DNA 等。

应通过样本检测分析样本中游离的胎儿 DNA 的量、片段大小等理化特性，根据理化特性合理的设置参考品考核试剂的阴阳性符合率。模拟真实样本的参考品中加入的 DNA 片段应与正常孕妇游离 DNA 的片段长度等物理性能指标近似，如 DNA 片段为打断后经过片段选择的 150-200bp 的 DNA 片段。

阴性参考品应包括采用染色体数目正样本 DNA 片段按一定比例与正常女性血浆混合的模拟样本，以及采用其他染色体异常样本 DNA 片段按一定比例与正常女性血浆混合的模拟样本。应设置一定数量的阴性参考品，其他染色体异常尽可能涵盖每条染色体。

在现行国家参考品中，阴性参考品（其他类型染色体非整倍体和其他染色体正常阴性样本）应不得检出 T21、T18 和 T13 阳性。而阳性参考品采用 T21、T18、T13 胎儿 DNA 片段按一定比例与正常女性血浆混合的模拟样本，T21、T18、T13 胎儿 DNA 片段可由流产组织或羊水细胞等来源制备。根据报道平均的胎儿游离 DNA 浓度为 10%，阳性参考品包括 10%浓度的 T21、T18 和 T13 样本，要求检出率达到 100%。

5.5 嵌合和微缺失微重复检出率

临床中除了典型的 21 三体综合征患者，约有 1% 案例胎儿为嵌合型 21 三体，嵌合比例从低到高，嵌合比例越高，临床表型越明显，当嵌合比例达到 50% 以上时，胎儿各

项生理指标与完整性 21 三体综合征患者几乎相似,因此嵌合型 21 三体的检测准确性需要作为参考品进行考虑和设置。除了嵌合型三体以外,染色体亚显微结构上的缺失重复同样会导致与完整性 21 三体综合征相似的临床表型,因此同样需要在参考品中考虑和设置。

为了检测胎儿微缺失微重复对染色体非整倍体检测结果的影响,现行国家参考品采用微缺失微重复细胞系配制了微缺失重复参考品,其中含有 T18 染色体微重复参考品,其中 18 号染色体中 20Mb 以上微重复样本应全部检出 T18,其余微缺失微重复参考品应不得检出 T21、T18 和 T13 阳性。

为了检测胎盘嵌合比例对染色体非整倍体检测结果的影响,现行国家参考品中设置了嵌合参考品,分别设置 70%和 30%嵌合比例 T21、T18 和 T13 样本。70%异常嵌合体应全部检出,30%异常嵌合体可为检出或未检出。

5.6 检测限

根据临床统计结果,约 92%临床检测样本胎儿浓度高于 5%,超过 96%临床样本胎儿浓度高于 4%。考虑到不同定量方法的差异,故此,设置了检测限参考品的浓度一般为 5%到 3.5%。

同时应对干扰物和残留污染物在实验步骤中携带率的影响进行评估。应包括整个流程的评估,包括样品制备和文库制备。应评估干扰物如胆红素、高 GC、甘油三酯等因素对检测的影响。

现行国家参考品中设置检测限参考品浓度为 5%和 3.5%。检测限参考品包含以下几个部分:5%浓度的 T21、T18 和 T13 流产组织样本;5%浓度的高 GC PCR 产物和 T21、T18 和 T13 流产组织样本混合;5%浓度的胆红素干扰样本;5%浓度的 T21、T18、T13 细胞系样本;3.5%浓度的 T21、T18 和 T13 流产组织样本。

现行国家参考品要求 5%浓度检测限参考品（包括流产组织、高 GC、胆红素和细胞系样本）应全部检出，3.5%浓度检测限参考品应准确检出不低于 50%。

5.7 重复性

为考察试剂的重复性，应建立重复性考核指标。应对指标的评价标准做出合理要求，如一致性、标准差或变异系数的范围等。现行国家参考品要求全参考盘重复。

6.参与起草单位和人员

中国食品药品检定研究院 黄杰 曲守方 李丽莉 于婷 孙楠 白东亭

深圳国家基因库 陈芳

华大基因研究院 张艳艳

广州市达瑞生物技术股份有限公司 吴英松

北京贝瑞和康生物技术股份有限公司 张建光