

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

T/

中国输血协会团体标准

T/××× ××××—××××

红细胞血型基因分型技术指南

Technical guideline for genotyping of erythrocyte blood group

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期: 2020/03/31)

×××× - ×× - ××发布

×××× - ×× - ××实施

中国输血协会 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 检测前技术要求	2
5 检测中技术要求	3
6 检测后技术要求	5
7 质量控制	7
附录 A（资料性附录） 红细胞血型基因分型参考 DNA 的目标核苷酸情况	9
附录 B（资料性附录） 定性检测试剂主要性能指标的验证方法	11
参考文献	12

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准起草单位：浙江省血液中心、上海市血液中心、广州血液中心、北京医院、深圳市第二人民医院、辽宁省血液中心、空军军医大学第二附属医院

本标准主要起草人：朱发明、朱自严、许先国、姬艳丽、宫济武、邵超鹏、叶璐夷、李剑平、穆士杰、何吉、应燕玲

红细胞血型基因分型技术指南

1 范围

本标准规定了红细胞血型基因分型的技术要求，覆盖检测前、中、后过程和质量控制等要素。本标准适用于血站和医疗机构开展红细胞血型基因分型工作。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》

WS/T-420《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1 人类红细胞血型抗原 Human erythrocyte blood group antigen

人类红细胞表面的一种化学物质，能够刺激缺少相应抗原的个体发生免疫应答，产生对应抗体。血型抗原主要成分为蛋白质或者碳水化合物。

3.2 红细胞血型系统 blood group system

根据红细胞表面抗原的遗传关系所划分的类别。由1个基因座或相同功能的多个基因座控制的不同等位基因所编码或决定的血型抗原，归属于同一血型系统。一些血型系统的基因直接编码血型抗原决定簇所在蛋白；另外一些血型系统的抗原是碳水化合物，血型基因编码糖基转移酶，催化这些抗原的形成。

3.3 表型 phenotype

个体能被观察到的生化、生理、免疫和/或形态特征，由个体的基因型和表达环境决定。红细胞血型表型是血型抗体检测到的红细胞免疫特征。

3.4 基因型 genotype

生物体或一组生物体的遗传组成，涉及单个性状、一组性状或整个性状复合体；在DNA水平上，由一个基因或一组基因的特定等位基因组成。

3.5 红细胞血型数据库 RBC blood group database

根据国际输血协会（ISBT）红细胞免疫遗传和血型命名委员会（Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party）制定的命名规则，对红细胞血型系统的数据进行收集归类和命名的数据库。

T/××× ××××—××××

3.6 等位基因 allele

位于一对同源染色体相同位置上控制同一性状不同形态的基因。

3.7 基因分型 genotyping

通过对核酸碱基序列的分析，以确定血型等位基因。

3.8 多态性 polymorphism

由于一个基因中发生核苷酸的突变、插入、缺失，从而形成了2个或多个等位基因的现象。

3.9 基因座位 locus

基因在染色体上的位置，同一位点可能有不同类型的等位基因；或一段DNA序列在染色体上的位置。

3.10 亚型 subgroup

同一血型抗原，但抗原结构和性能或抗原位点数存在一定的差异。

3.11 血站 blood service

不以营利为目的，采集、提供临床用血的公益性卫生机构或医疗机构，分为一般血站和特殊血站。

4 检测前技术要求

4.1 标本的检测申请

4.1.1 检测申请单信息至少包括但不限于以下内容：分型目的、一般资料（唯一性编号、姓名、性别、种族/民族、年龄、联系电话等）、临床资料（临床诊断、既往史、输血史、孕产史、用药史、干细胞移植史等）、血清学检测情况（血清学检测结果或反应格局）、其他信息（标本采集日期或时间、标本类型、家系关系等）。依据分型目的设定申请单内容和格式，应准确详细填写检测申请单。

4.1.2 检测标本应遵循知情同意原则。

4.2 标本的采集和标识

4.2.1 标本类型

血型基因分型标本一般使用抗凝全血标本，特殊情况可使用羊水、口腔拭子、毛发等其他类型标本。血液标本使用乙二胺四乙酸（EDTA）或枸橼酸（ACD）盐作为抗凝剂，不宜采用肝素抗凝。应充分考虑近期输血史、用药史、干细胞移植等对个体血型基因分型的影响，遇到此情形必要时可采集口腔拭子、毛发等标本。

4.2.2 标本采集与标识

应制定标本采集规程，明确采集前准备、待检者身份识别、采集消毒和穿刺、标本留取和保存等过程的要求以及对标本质量影响的因素。严格执行既定的采集规程，标本应具有唯一性标识，与待检者信息一一对应，具有可追溯性。

4.3 标本运输

标本包装规范，应能防渗漏和污染；标本的运输条件和时间参照分型试剂的要求。当分型试剂和方法无明确要求时，待测核酸为DNA的标本可在室温运输，在采集后24小时内运输到达实验室。待测核酸

T/××× ××××—××××

为RNA的标本，预计15分钟内到达实验室可室温运输；当运输时间较长，则将标本置于干冰中运输到实验室；当标本中添加了RNA稳定剂，运输条件参照稳定剂的有关说明要求。标本、检测申请单一一对应，宜同步运输；标本的运输应符合生物安全要求。

4.4 标本接收和验收

制定并实施标本交接和验收规程，做好交接和验收记录，包括标本来源、标本类型、运输方式、标本数量和质量等，并与检测申请单核对。验收不符合的，应通知重新送样或者补充完善信息资料，必要时可终止申请项目。

4.5 标本的保存

应有保存标本的规定和设施，避免标本在检测前发生变质、遗失或损坏。当分型方法中存在独立的核酸提取步骤时，则标本应尽快提取核酸，避免长期保存及反复冻融原始标本。用于DNA分型时，全血标本可在2-8℃保存72小时；用于RNA分型时采用抑制RNase措施和无RNase材料，标本应立即抽提或者置于-70℃及以下保存。当选择含特定添加剂试管或基因分型方法无需独立核酸提取步骤，则参照试管说明书或方法的要求保存。

5 检测中技术要求

5.1 实验场地、人员和仪器设备管理

应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》的要求。

5.2 核酸提取和质量要求

5.2.1 核酸提取

核酸提取方法应经过确认和评估。严格按照建立的操作规程或试剂说明书提取核酸。

5.2.2 核酸标本标识和保存

提取过程中标本标识清楚，确保核酸标本与原始标本标识相对应。应留取适量原始标本，以备实验复核。用于核酸标本保存的缓冲液、核酸标本保存条件和时间参照分型试剂和方法的要求。当分型试剂和方法无明确要求时，Tris-EDTA缓冲液内的DNA标本，2-8℃保存最长不超过1年，超过1年则置于-20℃及以下保存；RNA标本直接于-70℃及以下保存或者逆转录为cDNA后按照DNA保存。

5.2.3 核酸标本的质量要求

标本核酸的提取效率应能满足分型试剂和方法的要求，可使用分型试剂盒配套或推荐的核酸提取试剂。提取核酸质量的评价指标宜包括核酸浓度、纯度及完整性。核酸浓度和纯度符合分型试剂的要求或实验室制定的标准，不应影响后续的基因分型实验。当分型试剂和方法无明确核酸浓度和纯度要求，则待测物质为DNA时，A260/A280比值一般在1.6-1.8之间；待测物质为RNA时，A260/A280比值一般在1.8-2.0之间。核酸完整性要求是在目的核酸分子量对应位置上可观察到清晰或弥散的条带，无明显降解。

5.2.4 核酸提取记录

T/××× ××××—××××

应填写核酸提取记录，包括标本标识、提取时间、提取操作人、提取方式、标本浓度、纯度和体积、原始标本留样量等。

5.3 分型方法及其选择

5.3.1 选择分型的血型基因和核苷酸位点或区域

红细胞血型系统基因参考序列、等位基因描述格式参照国际输血协会（ISBT）公布的最新数据。首先根据血清学特性、基因分型目的或者所属血型系统，确定合适的血型基因。然后根据分型目的和鉴别区分的要求，确定所需分析血型基因的特定核苷酸位点或基因区域；必要时，可选择基因全序列、基因全编码区、全基因组或转录组等区域进行分析。

5.3.2 常用的红细胞血型基因分型方法

各种分子生物学技术均可应用于红细胞血型基因分型，但不同技术和方法特性存在区别。可分为定性和定量方法，红细胞基因分型大多为定性方法，部分方法同时具有定性和定量能力。

定性方法主要包括：聚合酶链反应-序列特异性引物（PCR-SSP）、聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸杂交（PCR-SSO）、荧光定量PCR（qPCR）、高分辨率熔解分析（HRM）、多重连接探针扩增技术（MLPA）、直接测序分型法（PCR-SBT）、新一代测序（NGS）、飞行时间质谱、微阵列基因芯片等方法。

定量方法主要包括qPCR、数字PCR（dPCR）、MLPA、NGS等。

5.3.3 分型方法的选择

应根据不同的基因分型要求和待分型基因的特征，选择不同的基因分型方法或方法组合。

5.3.3.1 根据血型基因特性选择分型方法

5.3.3.1.1 分析血型基因的单个核苷酸位点变异情况，宜选择 PCR-SSP、qPCR、PCR-RFLP、HRM、PCR-SBT 等方法。

5.3.3.1.2 分析血型基因的多个核苷酸位点变异情况，宜选择 PCR-SSP、PCR-SSO、qPCR、MLPA、PCR-SBT、飞行时间质谱、微阵列基因芯片、NGS 等方法。

5.3.3.1.3 基因可能存在大片段缺失、重组、拷贝数变异等情况时，在采用上述分型方法基础上，按照特性可考虑增加定量方法进行分析。

5.3.3.2 根据基因分型目的选择分型方法

5.3.3.2.1 红细胞血型的筛选与鉴定、待检标本的血清学表型为常见表型或未知表型，需要以基因分型获取其基因型或预测表型。如近期输血患者的血型鉴定、血型抗体缺乏时的血型鉴定、新鲜红细胞标本缺乏时的血型鉴定、胎儿血型鉴定、血型纯合子和杂合子区分等。可选用所有适合的基因分型方法。

5.3.3.2.2 基因分型初步结果与血清学表型不符的标本，需要进一步明确基因型结果以预测该血型系统的血清学变异型或表型。如 ABO 血型系统亚型的基因分型、Rh 血型系统弱 D 和部分 D 的基因分型等，宜选择 PCR-SSP、MLPA、PCR-SBT、NGS 等方法进行血型基因分型。

5.3.3.2.3 对疑为新等位基因、一些罕见等位基因或部分疑难标本的分析或确认，宜选用 PCR-SBT、NGS 技术；必要时可采用克隆技术、单链扩增等方法进行单体型分析。

5.3.3.2.4 需要进行红细胞血型大数据分析，宜使用具有高通量检测能力的方法。如 PCR-SSO、飞行时间质谱、微阵列基因芯片、NGS、多重或多孔 PCR-SSP 等。

5.4 分型试剂

T/××× ××××—××××

应建立和实施试剂管理程序，规范试剂和耗材的接收、储存、验收和库存管理。

5.4.1 分型试剂选择

5.4.1.1 可选择商品化试剂或实验室自制试剂。实验室自制试剂应制定试剂制备的操作规程。

5.4.1.2 试剂的性能应满足分型目的需求，依据不同分型目的和要求选择相应的试剂。

5.4.1.3 试剂说明书应明确检测碱基的范围。PCR-SSP、PCR-SSO、MLPA 等基于某些序列特性而设计并建立的分型方法，应有说明阐述选择引物或探针能检测的碱基情况。基于扩增全部或部分片段进行序列分析的测序方法，应明确扩增和测序分析的片段范围。

5.4.2 试剂储存

所用试剂的储存条件应与制造商提供的说明书或自制试剂操作规程要求相一致。任何试剂超过使用期限、性质改变或质量下降时，均不可使用。

5.4.3 试剂性能验证

5.4.3.1 试剂应进行性能验证。定量分型试剂，选择验证的性能指标宜包括测量正确度、测量精密性、测量不确定度、分析特异性、分析灵敏度、检出限和定量限、线性区间（可报告区间）、抗干扰能力等。基于 PCR 技术的定性分型试剂，选择验证的性能指标宜包括方法符合率、检出限、抗干扰能力、交叉反应等。Sanger 测序和 NGS 试剂，选择验证的性能指标宜包括方法符合率和检出限等。

5.4.3.2 性能验证时所使用的标准品或参考物质可为各种突变型和野生型质粒或细胞株。常见红细胞血型基因分型 DNA 参考品见附录 A。

5.4.3.3 干扰物考虑外源性和内源性物质，至少包括但不限于：抗凝剂、核酸提取试剂的残留物、标本保存液、血红蛋白、甘油三酯、胆红素、药物等。实验室可根据实际需求、厂家声明和标本特点（实际可能存在的干扰物质及达到的浓度）选择需要验证的干扰物质。

5.4.3.4 实验室可根据实际情况选择验证方案或方法。基于 PCR 技术的定性试剂性能验证方法见附录 B，该方法也可用于 Sanger 测序和 NGS 试剂的验证。定量分型试剂验证可参照 WS/T 420《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》。

5.4.4 批间试剂的比较

使用新批号试剂前，应进行新、旧批号试剂的比对；宜选用覆盖该位点所有基因型的不同标本或者不同基因型的3-5个标本，两批号间试剂应具有同等性能。

5.5 基因分型程序的确认

应制定覆盖整个基因分型的操作规程，经确认后投入使用。严格按照既定方法和规程进行操作。

6 检测后技术要求

6.1 基因分型数据分析和结果判断

6.1.1 基本要求

结果分析和判定的人员应经过培训和评估可以胜任并得到授权。分型的数据质量需符合所使用技术的特定要求，方可对待检标本进行结果分析；当分型的数据质量不符合要求，则应重新检测标本。涉及的判定指标类型有质控品、内对照、反应曲线、荧光值、反应珠子数、测序质量、测序覆盖度等，但不同的技术平台和方法所选择的判断指标类型和要求有所不同，需依据方法说明而定。

T/××× ××××—××××

6.1.2 基因型的命名

基因型和等位基因的描述应遵循ISBT红细胞免疫遗传和血型命名委员会的命名原则，等位基因以基因*数字（或字母、小数点等表示），可参见ISBT网站红细胞免疫遗传和血型命名委员会更新的血型等位基因列表。

6.1.3 基因型的判断

6.1.3.1 分型结果符合基因型唯一组合，且基因型符合已知的血清学表型，可直接判定基因型。

6.1.3.2 分型结果符合多种基因型组合，应根据待检标本已知的血清学表型或其种族/民族等位基因频率特征，综合判定其基因型。

6.1.3.3 按照分型结果无法判定待检标本基因型，或判定的基因型与血清学表型不符合，应进一步分型区分或者在报告中描述。

6.2 基因分型报告

6.2.1 报告应完整、明晰。报告至少应有唯一性标识，实验室名称、标本信息、标本送检日期、分型项目、分型日期、分型方法、分型结果、分型结论、分型方法或结论的局限性、分型者、复核者的签名和日期。分型报告中可注明“仅供临床参考”字样。

6.2.2 分型结果应对检测的红细胞血型系统等位基因多态性信息进行描述，主要包括核苷酸在参考序列的位置和变化、突变种类，并注明其可能的曾用名。针对检出的变异核苷酸，实验室应尽可能完整描述。

6.2.3 对分型结果进行适当注释或解读，包括红细胞抗原或表型预测、结论解释性描述，输血策略、临床应用的可能风险等。

6.2.4 分析结果应充分考虑到基因分型的局限性，对基因分型方法的局限性有清楚的解释和描述。

6.2.5 基因分型局限性至少包括但不限于以下内容：

6.2.5.1 基因分型依据碱基特性预测出红细胞抗原表型，存在一定偏差风险。血型抗原的鉴定应以血清学结果为主。

6.2.5.2 部分情形下基因分型结果存在潜在的假阳性或假阴性情况以及无法通过基因分型确定的情况，如甲基化异常导致的血型抗原变异等。

6.2.6 对发现的血型基因遗传新变异，宜进一步验证后才出具基因分型报告。

6.2.6.1 对于孟德尔遗传所导致的血型基因遗传变异可进行正交法进行验证。具体方法包括但不限于以下几种：重新采样和检测、分析父母的变异情况、限制性内切酶消化、对目标区域重新测序或使用另一种基因分型技术。

6.2.6.2 若为体细胞变异，则需要通过对标本胚系DNA序列分析来证实。

6.3 报告的签发、修改和收回

6.3.1 报告的签发

分型报告应经授权人的审核和认可后签发，以保证分型报告正确和完整。签发者应签署姓名和日期。

6.3.2 报告的修改和收回

已发放分型报告需要进行实质性修改，应对原报告进行收回。新发放的分型报告，应标注唯一性标识，并注明所替代的原件。

6.4 分型数据的存储与安全

应当严格保护受检者隐私，严禁泄露受检者信息，分型数据应当进行安全备份，并与互联网有效隔离。实验室应规定其分型报告的保存时间、文件目录和文件类型。

6.5 分型后的标本和资料保存

完成分型后的DNA标本保存期限应不少于1年，信息和资料的保存期限应不少于3年。废弃的标本应作为医疗废物进行处置。

7 质量控制

7.1 室内质控

7.1.1 应建立和实施与分型项目相适应的室内质量控制程序，覆盖红细胞基因分型的全过程，以保证基因分型结果达到预期的质量标准。

7.1.2 质控品

在基因分型过程中尽可能使用适当的质控品进行质量控制。质控品的种类包括阴性质控、阳性质控、内对照和空白对照。单次分型中质控品的设置依据分型系统与试剂的稳定性、罕见突变质控品的可获得性、分型标本的数目而定。阴性质控品可为无相关突变的同类标本，阳性质控品为既往分型已知基因型标本、特定突变的细胞株或重组质粒等。

7.1.3 日常室内质控

一般情况可按照以下原则设定：(1)如果只分析基因的单个碱基突变点，可选择1个阴性质控、1个阳性质控标本。(2)当分析多个碱基突变点时，可以根据实验室自身的条件，设立能敏感反应分型问题的2个或3个突变点的阴、阳性质控，下次分型改用跟上次不同碱基突变的阴性、阳性对照，依次类推，循环往复。

7.1.4 阶段性质控

可根据需要，有计划地采用留样抽检复测、相同标本的人员比对、不同方法相同标本比对、标准DNA分型等方式进行阶段性质控。建议每半年选择一种方式进行一次阶段性质控，对每次质控数据进行汇总统计和室内质控评价。如采用分型后抽样方式，比例不低于2%，基因分型符合率100%。同类仪器和同类项目的测定每年至少进行1次比对试验，以保证分型结果的准确性和一致性。

7.1.5 失控处理

出现室内质控失控时应逐项分析原因，并采取相应措施予以纠正。阳性质控品失控常见的原因包括模板问题、引物或探针问题、仪器问题或试剂问题等。阴性质控品呈阳性提示核酸“污染”，污染来源可能是扩增产物和（或）核酸提取过程中的交叉污染等。

7.2 室间质评

7.2.1 实验室开展的基因分型项目应参加至少一项能力验证/室间质评（PT/EQA）项目。如果没有PT/EQA组织能够提供对该项目的室间质量评价，实验室可与其他实验室建立平行分型比较，至少每6个月一次。

7.2.2 质控品分型操作与常规标本一致。

T/××× ××××—××××

7.2.3 在 EQA 项目中出现不满意结果时，应分析原因进行纠正，包括对整个基因分型技术过程相关要素的控制、技术能力的分析等。

附 录 A
(资料性附录)

红细胞血型基因分型参考 DNA 的目标核苷酸情况

ISBT血型系统名称 (系统编号)	基因*	目标核苷酸 [^]	预测抗原或表型	选择注释
ABO 001	ABO	c. 467C>T	A	可根据需要选择1个或多个目标核苷酸突变位点； 对于亚型，需要多个目标核苷酸或测序才能准确定型
		c. 297A>G c. 526C>G c. 657C>T c. 703G>A c. 796C>A c. 803G>C c. 930G>A	B	
		c. 261delG c. 802G>A	O	
MNS 002	<i>GYP A</i>	c. 59C>T c. 71G>A c. 72T>G	M/N	根据实验设计进行选择，所使用的参考DNA不一定都必须都包含三个突变
	<i>GYP B</i>	c. 143T>C c. 230C>T c. 270+5G>T(内含子)	S/s U+ ^W	
RH 004	<i>RHD</i>	Exon 4 & 7	D+/D-	更多弱D和部分D类型的预测需要分析其他目标核苷酸
	<i>RHD</i>	c. 845G>A	Weak partial type 15	
		c. 1227G>A	Del	
	<i>RHCE</i>	内含子 2 插入 109bp c. 307T>C	C/c	
		c. 676C>G	E/e	
		c. 122A>G	C ^W -/C ^W +	如有可能使用稀有纯合子
		c. 106G>A	C ^X -/C ^X +	如有可能使用稀有纯合子
c. 733C>G	V-VS-/V+VS+	如有可能使用稀有纯合子		
c. 1006G>T	V+/V- (VS+ 情况下)	如有可能使用稀有纯合子		
LU	<i>LU</i>	c. 230A>G	Lu ^a /Lu ^b	

T/XXXX XXXX-XXXX

005				
KEL 006	<i>KEL</i>	c. 578T>C	K/k	
		c. 841T>C	Kp ^a /Kp ^b	
		c. 1790C>T	Js ^a /Js ^b	
FY 008	<i>FY</i>	c. 125G>A	Fy ^a /Fy ^b	
		c. -67t>c (GATA)	Fy(a-b-)	
		c. 265C>T	Fy ^x	Fy(b+W) 如有可能使用稀有纯合子
JK 009	<i>JK</i>	c. 838G>A	Jk ^a /Jk ^b	
DI 010	<i>DI</i>	c. 2561T>C	Di ^a /Di ^b	如有可能使用稀有纯合子
YT 011	<i>YT</i>	c. 1057C>A	Yt ^a /Yt ^b	
SC 013	<i>SC</i>	c. 169G>A	Sc1/Sc2	不需要使用稀有纯合子
DO 014	<i>DO</i>	c. 793A>G	Do ^a /Do ^b	
		c. 323G>T	Hy+/Hy-	不需要使用稀有纯合子
		c. 350C>T	Jo(a+)/Jo(a-)	不需要使用稀有纯合子
CO 015	<i>CO</i>	c. 134C>T	Co ^a /Co ^b	不需要使用稀有纯合子
LW 016	<i>LW</i>	c. 299A>G	LW ^a /LW ^b	不需要使用稀有纯合子
CROM 021	<i>CR</i>	c. 679G>C	Cr(a+)/Cr(a-)	
KN 022	<i>KN</i>	c. 4681G>A	Kn ^a /Kn ^b	不需要使用稀有纯合子
		c. 4768A>G	McC ^a /McC ^b	
		c. 4801A>G	S1:1, 2, 3	
		c. 4843A>G	KCAM+/KCAM-	
		c. 4223C>T	Yk(a-)	
IN 023	<i>IN</i>	c. 137C>G	In ^a /In ^b	不需要使用稀有纯合子
OK 024	<i>OK</i>	c. 274G>A	Ok(a+)/Ok(a-)	不需要使用稀有纯合子

*表中列出了红细胞血型基因分型DNA参考品应考虑的目标核苷酸,实验室应尽可能选择目标核苷酸的纯合子和杂合子。部分目标核苷酸的纯合子标本为稀有情形,可参照表中注释选择。

附 录 B

(资料性附录)

定性检测试剂主要性能指标的验证方法

B.1 方法符合率验证

方法1: 至少选择3例红细胞血型基因型参考标准品进行检测, 检测结果与参考品预期值应一致。

方法2: 用待评估方法与标准方法(或参考方法)对同一批次标本(尽可能覆盖所需的基因型标本, 阴性标本至少5例、阳性标本不少于10例)进行分析, 然后将不同方法得到的结果进行对比分析, 判断结果是否可以接受。阳性标本如为罕见或少见情形可酌情减少标本例数, 尽可能不少于3例。

B.2 检出限验证

将一份已知定值的标准品稀释至厂家声明的检出限浓度检测5次, 5次检测应全部阳性。

B.3 抗干扰能力验证

方案 1: 实验组为在弱阳性标本中加入干扰物质溶液(对照组加入等量的溶剂), 使得干扰物质的终浓度与厂家声明的浓度相同, 与常规标本一样处理, 至少重复测定 3 次以上。弱阳性标本检测仍为弱阳性结果, 则验证通过。

方案 2: 选取含待验证的高浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的标本作为实验组, 选取含低浓度水平干扰物质且经确认不含被测物的标本作为对照组。分别在实验组和对照组中加入弱阳性标本(量小于 10%), 与常规标本一样处理, 每组至少重复检测 3 次。如果对照组和实验组结果均为弱阳性, 说明在验证浓度下, 干扰物质对测定无显著影响。如果对照组结果为弱阳性, 实验组结果为阴性, 说明在验证浓度下, 干扰物质对测定有显著影响。

B.4 交叉反应验证

验证与检测对象可能存在交叉反应的核酸物质对检测的影响, 主要指与检测对象核酸序列具有同源性的基因序列(例如*RHD*和*RHCE*)或者是含目标等位基因对偶多态性的核酸标本(例如*ABO*基因261位缺失的方法, 应选择261位不缺失标本进行评估)。

取一定浓度经其它方法(如测序等)确认为其它基因型的标本, 与常规标本一样处理, 至少重复检测3次, 结果应为阴性。

参 考 文 献

- 1) Standards for Molecular Testing for Red Cell, Platelet, and Neutrophil Antigens, 4th edition. USA: AABB, October 2018.
 - 2) CNAS-GLO3《分子诊断检验程序性能验证指南》. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2019年4月.
 - 3) CNAS-GLO37《临床化学定量检验程序性能验证指南》. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2019年4月.
 - 4) 《感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南》. 北京:国家卫生计生委办公厅, 2017年12月(国卫办医函[2017]1190号).
 - 5) 《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)》. 北京:国家卫生计生委医政医管局, 2015年07月(国卫医医便函[2015]240号).
-