

ICS 11.020

CCS 005

T/CSBT

中国输血协会团体标准

T/CSBT 009—2021

红细胞血型基因分型技术指南

Technical guideline for genotyping of erythrocyte blood group

2021-11-10发布

2021-11-10 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.....	1
5 检测中技术要求.....	2
6 检测后技术要求.....	5
7 质量控制.....	6
附录 A（资料性） 红细胞血型基因分型参考 DNA 的目标核苷酸情况.....	8
附录 B（资料性） 定性检测试剂主要性能指标的验证方法.....	10
参考文献.....	11

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某些内容专利的责任。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：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

本文件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。本文件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 203 输血医学术语

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

WS/T 203界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血型 blood group

在血液中所检测出的任何遗传多态性可称之为血型，但血型通常被限定为血细胞表面抗原的多态性，包括红细胞、血小板和中性粒细胞血型。在非特指的情况下，血型一般是指红细胞血型。

[来源：WS/T 203-2020，3.1.1]

3.2

红细胞血型系统 red cell 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2~3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。

[来源：WS/T 203-2020，3.1.7]

3.3

室内质控 internal quality control

实验室为控制检验数据的精密度所采取的管理或技术活动。

[来源：WS/T 203-2020，5.3.13]

3.4

室间质量评价 external quality assessment; EQA

多家实验室分析同一样本或参考样本盘并由外部独立机构收集和反馈实验室上报的结果以此评价实验室的操作过程。开展EQA项目能评估实验室的检测能力以及对检测质量进行持续监控的能力。其中，按照预先规定的条件，由两个和多个实验室对相同或类似的物品进行测量或检测的组织、实施和评价的过程称为实验室间比对（inter-laboratory comparison）；由权威机构发放样本或参考样本盘，利用实验室间比对，按照预先制定的准则评价参加实验室的能力，称为实验室能力验证（proficiency testing; PT）。

[来源：WS/T 203-2020，5.3.14]

4 检测前技术要求

4.1 红细胞血型基因分型应用范畴

红细胞血型基因分型与血清学方法互相补充，两者具有不同的特点。基因分型应用范畴包括但不限于以下内容所列项：红细胞疑难血型的鉴定、红细胞直接抗球蛋白实验阳性和多次输血患者的血型鉴定、罕见表型的筛选和鉴定、产前血型的诊断、解决复杂的血型血清学问题。分型中应根据不同的应用情形，选择不同的分型方法和试剂。

4.2 标本的检测申请

4.2.1 检测申请信息至少包括但不限于以下内容所列项：分型目的、一般资料（唯一性标识码、姓名、性别、种族/民族、年龄、联系电话）、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）、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）。依据分型目的设定申请单的具体内容和格式，应准确详细填写检测申请单。

4.2.2 检测标本应遵循知情同意原则。

4.2.3 申请单上宜有不同检测标本申请和/或采集时有关要求的内容。

4.3 标本的采集和标识

4.3.1 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盐或枸橼酸盐作为抗凝剂，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，遇到此情形宜采集口腔拭子、毛发等标本。

4.3.2 标本采集与标识

应制定标本采集程序，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，应根据分型目的和分型方法的要求采集足量标本。标本应具有唯一性标识，与待检者信息具有一致性和可追溯性。

4.4 标本运输

4.4.1 标本包装规范，应能防渗漏和污染；标本的运输条件和时间应参照分型试剂的要求

4.4.2 当分型试剂和方法无明确要求时，标本运输时间宜控制在 24 小时内。待测核酸为 DNA 的标本可在室温运输。待测核酸为 RNA 的标本，预计 1 小时内到达实验室可室温运输；当运输时间>1 小时，则将标本-20℃以下运输到实验室；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。

4.4.3 标本、检测申请单信息应具有一致性，宜同步运输；标本的运输应符合生物安全要求。

4.5 标本接收和验收

4.5.1 制定并实施标本交接和验收程序，做好交接和验收记录。标本应标识清楚、运输方式正确、容量满足实验要求、血液标本应抗凝充分，并能满足不同试剂和方法所规定的其他要求。羊水、口腔拭子、毛发中应含有一定数量的细胞，具体依据选用试剂的要求。

4.5.2 接收时应至少核查标本与检测申请单信息对应性和完整性，标本类型、来源、数量，运输方式，标本采集管使用正确与否。

4.5.3 标本验收不合格的情形包括检测申请单信息缺失或不符，标本管标识不清或者不正确，标本管选用错误，不符合试剂说明书要求以及其他影响实验结果的情形。

4.5.4 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。

4.6 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 一般要求

开展红细胞基因分型应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》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一致。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，实验室应根据分型方法的要求评估DNA质量来确定保存时间，原则上Tris-EDTA缓冲液内的DNA样本，不超过1年保存可在2-8℃，超过1年则宜置于-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

标本的核酸提取效率应能满足分型试剂和方法的要求，宜使用分型试剂盒配套或推荐的核酸提取试剂。提取的核酸质量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，应不影响后续的基因分型实验。当分型试剂和方法无明确核酸纯度要求，则待测物质为DNA时，A260/A280比值一般宜在1.6-1.8之间；待测物质为RNA时，A260/A280比值一般宜在1.8-2.0之间。核酸完整性要求是在目的核酸分子量通过凝胶电泳在对应位置上应观察到清晰的条带，无明显降解。对于RNA可通过电泳观察28S、18S条带进行判断。

5.2.4 核酸提取记录

应填写核酸提取记录，包括标本标识、提取时间、提取操作人员、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

5.3.2.1 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。

5.3.2.2 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-SSOP）、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）、实时荧光定量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）、飞行时间质谱和微阵列基因芯片等方法。

5.3.2.3 定量方法主要包括 qPCR、数字 PCR（dPCR）、MLPA 和 NGS 等。

5.3.3 分型方法的选择

5.3.3.1 红细胞血型基因分型方法选择的一般原则

根据不同的应用情形选择合适的分型方法。宜结合血型基因特性、基因分型目的，选择不同的基因分型方法或方法组合。

5.3.3.2 根据血型基因特性选择分型方法

5.3.3.2.1 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 和 PCR-SBT

等方法。

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

5.3.3.2.3 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。

5.3.3.3 根据基因分型目的选择分型方法

5.3.3.3.1 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、血型基因纯合子和杂合子区分等。可选用所有适合的基因分型方法。

5.3.3.3.2 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 和 NGS 等方法进行血型基因分型。

5.3.3.3.3 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和单链扩增等方法进行单体型分析。

5.3.3.3.4 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-SSOP、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

5.4.1 基本要求

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。

5.4.2 分型试剂选择

5.4.2.1 可选择商品化试剂或实验室自制试剂。

5.4.2.2 应制定有商品化试剂接收验收的流程和要求,明确试剂性能的可接受范围。

5.4.2.3 自制试剂应制定试剂制备的操作规程,包括试剂均一性和稳定性等指标的评估程序,以及相应的质量评价记录。

5.4.2.4 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。

5.4.2.5 不同的方法检测碱基范围存在差异。应明确分型试剂可检测碱基的范围,商品化试剂应在说明书中体现,自制试剂宜在操作规程中体现。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。

5.4.3 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。

5.4.4 试剂性能验证

5.4.4.1 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、测量精密度、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、重复性等。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。

5.4.4.2 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。

5.4.4.3 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、胆红素和某些药物等。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。

5.4.4.4 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》。

5.4.5 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程序，经确认后投入使用。严格按照既定方法和规程进行操作。

5.6 基因分型检测记录

应具有整个实验过程的完整记录，包括采用的实验方法、试剂信息、仪器设备、实验结果、实验时间、操作人员及复核人员等。

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。分型的数据质量应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、测序质量和测序覆盖度等，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，应依据方法说明而定。

6.1.2 基因分型局限性

分析判定结果前应考虑到基因分型局限性，至少包括但不限于以下内容：

- 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；
- 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。

6.1.3 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，具体网址见参考文献7。

6.1.4 基因型的判断

6.1.4.1 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，宜直接判定基因型。

6.1.4.2 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。

6.1.4.3 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，应在报告中进行结果描述。

6.2 基因分型报告

6.2.1 报告应完整、明晰。报告至少应包括但不限于标本唯一性标识、送检单位名称、分型实验室名称、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（含分型方法或结论的局限性）、检测人员签名和报告日期、复核人员的签名和复核日期。分型报告中应注明“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 分型结论应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 对发现的血型基因遗传新变异，宜进一步验证后方可出具基因分型报告，主要包括以下情况：
——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；
——若为体细胞变异，宜通过对标本胚系 DNA 序列分析或者其他已认可的检测方法进行证实。

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。签发人员应签署姓名和日期。

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标本保存期限在-20℃以下应不少于1年，信息和资料的保存期限应不少于10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 基本要求

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

在基因分型过程中应使用适当的质控品进行质量控制。质控品应考虑稳定性与可靠性，尽量使用具有代表性的商业化产品。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，阳性质控品可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、空白对照为反应体系中不加标本核酸物质。

7.1.3 日常室内质控

7.1.3.1 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。

7.1.3.2 当分析多个碱基突变点时，宜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。阳性质控品和阴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。空白对照呈阳性提示核酸“污染”，污染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分型比对，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。

7.2.3 在PT/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)

表A.1规定了红细胞血型基因分型参考DNA的目标核苷酸情况

表 A.1 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 ^a	核苷酸	抗原或表型
ABO (001)	<i>ABO</i>	c. 467C>T	A
		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
	<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-
	<i>RHD</i>	c. 845G>A	Weak partial type 15
		c. 1227G>A	“Asian type” 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 +
		c. 106G>A	C ^X -/C ^X +
		c. 733C>G	V-VS-/V+VS+
	c. 1006G>T	V+/V- (VS+情况下)	
LU (005)	<i>LU</i>	c. 230A>G	Lu ^b /Lu ^c
KEL (006)	<i>KEL</i>	c. 578T>C	K/k
		c. 841T>C	Kp ^b /Kp ^c
		c. 1790C>T	Js ^b /Js ^c
FY (008)	<i>FY</i>	c. 125G>A	Fy ^b /Fy ^c
		c. -67T>C (GATA)	Fy(a-b-)
		c. 265C>T	Fy ^x

JK (009)	<i>JK</i>	c. 838G>A	Jk ^b /Jk ^c
DI (010)	<i>DI</i>	c. 2561T>C	Di ^b /Di ^c
YT (011)	<i>YT</i>	c. 1057C>A	Yt ^b /Yt ^c
SC (013)	<i>SC</i>	c. 169G>A	Sc1/Sc2
DO (014)	<i>DO</i>	c. 793A>G	Do ^b /Do ^c
		c. 323G>T	Hy ⁺ /Hy ⁻
		c. 350C>T	Jo(a ⁺)/Jo(a ⁻)
CO (015)	<i>CO</i>	c. 134C>T	Co ^b /Co ^c
LW (016)	<i>LW</i>	c. 299A>G	LW ^b /LW ^c
CROM (021)	<i>CR</i>	c. 679G>C	Cr(a ⁺)/Cr(a ⁻)
KN (022)	<i>KN</i>	c. 4681G>A	Kn ^b /Kn ^c
		c. 4768A>G	McC ^b /McC ^c
		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 ^b /In ^c
OK (024)	<i>OK</i>	c. 274G>A	Ok(a ⁺)/Ok(a ⁻)
^a 表中列出了红细胞血型基因分型 DNA 参考品应考虑的核苷酸位点, 实验室应尽可能选择目标核苷酸的纯合子和杂合子。部分核苷酸的纯合子标本为稀有情形, 可根据实际情况自行选择。			

附录 B

(资料性)

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)确认为特定基因型的标本, 与常规标本一样处理, 至少重复检测3次, 结果应为阴性。

B.5 重复性

至少选择5例阴性和5例阳性标本(如适合, 增加临界浓度标本或各基因型标本), 每份标本重复检测3次。检测结果与实验室设定的允许范围进行比较, 原则上结果与标本预期值应一致。

参 考 文 献

- [1] CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南
 - [2] CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南
 - [3] Standards for Molecular Testing for Red Cell, Platelet, and Neutrophil Antigens, 4th edition. USA: AABB, October 2018
 - [4] 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法 国卫办医政发[2010]194号
 - [5] 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行) 国卫医便函[2015]240号
 - [6] 感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南 国卫办医函[2017]1190号
 - [7] Table of blood group systems: version 9.0[EB/OL]. [2021-02-03].
<http://www.isbt-web.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>.
-