
胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂的质量控制技术
评价指南（高通量测序法）

1.前言

随着人类辅助生殖技术的快速发展，人工授精（Artificial Insemination, AI）、体外受精-胚胎移植(In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, IVF-ET) 以及胞浆内单精子注射技术(Intra-Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) 已经进入了规模性的临床应用。在体外受精形成的胚胎中，约 50%存在染色体异常，可导致移植后早期胚胎丢失、自然流产和死产，是限制辅助生殖技术成功率和有效推广的重要原因之一。胚胎植入前遗传学筛查（Pre-implantation Genetic Screening, PGS）是在现有辅助生殖技术基础上对植入前的胚胎细胞进行染色体非整倍体以及染色体拷贝数变异（Copy Number Variants, CNV）检测，以选择染色体正常的胚胎进行植入从而提高辅助生殖的成功率，是近几年出现的胚胎植入前筛查新技术。

本指南旨在规范申请人在胚胎植入前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、性能评价的诊断试剂技术指标和要求，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

本指南所述的胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂是指采用胚胎细胞进行的低深度全基因组的高通量测序法，通过对获取的单个或有限的胚胎细胞的全基因组扩增产物进行全基因组高通量大规模并行基因组测序的试剂盒，并将全基因组测序结果进行统计学信息分析，从而判断胚胎的染色体是否为非整倍体，或是否含有拷贝数变异（CNV, Copy Number Variants）的片段。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 STR 位点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等效性。

针对胚胎植入前染色体非整倍体检测的方法主要有荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)技术、比较基因组杂交(Comparative Genomic Hybridization, CGH)技术、单核苷酸多态性微阵列(Single Nucleotide Polymorphism-Based Array, SNP array)技术和二代测序(Next Generation Sequencing, NGS)等技术。本指南并不适用于 NGS 以外的胚胎植入前检测方法学，但是参考品和对照品的设置对其它方法有一定的借鉴作用。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：染色体非整倍体（Chromosome Aneuploidies），包括常染色体和性染色体三体、单体、多体等，以及染色体拷贝数变异。本指南也适用于多条染色体复合非整倍体的检测，如 48,XN,+9,+11、46,XO,+7,+13,+19,-20,-22 等。

适用人群：对体外受精—胚胎移植周期中的胚胎细胞进行胚胎植入前 24 条染色体非整倍体检测，检测胚胎是否有非整倍体或部分染色体拷贝数变异，其结果仅供临床参考，不作为胚胎是否植入的唯一标准。

伦理学问题：禁止非医学目的的胚胎性别选择。检测结果报告不能显示胚胎性别，除非有性染色体异常时可根据实际情况针对性处理。

3. 诊断试剂的设计开发要求

胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒（高通量测序法）是指对体外培养胚胎中的一个或几个细胞进行全基因组测序的检测，用以判定该胚胎是否含有染色体非整倍体的变异或者是染色体拷贝数的变异的试剂盒。本指南所述试剂盒涵盖的试验流程为从胚胎细胞到 DNA 文库的构建，应该和相应的测序平台以及其相应的通用试剂和耗材联合使用，方能达到检测的预期目的。除了测序平台的控制检测软件以外，还应当开发和本指南所述的试剂盒预期目标联合使用的软件，作为一个整体和系统

来实现这里描述的检测目的。胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒（高通量测序法）设计和原理至少要考虑到以下几个方面：

3.1 预期用途

明确胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂的预期用途，包括定性或定量检测、样本类型和被测物等。检测试剂盒的预期用途一般是对 ICSI 获得的胚胎细胞的所有染色体进行检测，以判断胚胎是否存在染色体非整倍性和拷贝数变异。参照《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。明确试剂盒检测结果不作为胚胎是否进行植入的唯一依据，仅供临床辅助诊断，对于植入胚胎需通过妊娠成功后的产前诊断金标准（核型分析）进行确诊。

3.2 测试方法学

本指南所述的胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂是基于低覆盖全基因组测序的方法学，其主要原理是：每个胚胎细胞含有一整套人的全基因组 DNA，含量约为 6.6pg，在进行全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)后获得较高起始 DNA 模板量，然后进行 DNA 片段化、文库构建、PCR 扩增及上机测序，获得样本的测序数据。运用生物统计学进行信息分析，根据各条染色体上不同窗口对应的拷贝率

（或其他类似技术指标）和与全基因组范围内的检验统计值，与正常样本获得的值或自身样本内比较找出变异区域，再根据变异区域的相对位置信息和长度判定非整倍体。具体过程大致可描述为：1) 胚胎细胞进行全基因组扩增获得微克级别 DNA；2) 取全基因组扩增后的 DNA，经过片段化（超声或酶切等）选择一定片段大小的 DNA 分子（如 150-250bp）；3) 通过文库构建流程，在上述 DNA 分子两端加上测序用接头；4) 上机测序获得一定长度的序列（reads）；5) 通过相应的软件对得到的测序数据进行统计分析，获得每条染色体的统计量。当胚胎出现染色体非整倍体时，在胚胎 DNA 数据进行分析中，相应染色体总数会有一定比例的升高或降低，结合生物信息学分析方法，对对应染色体所属的 DNA 片段数量进行统计，与一定量样本构

成的参考集合相比较或者自身样本内比较来设定参数，根据数理统计的原理和胚胎 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差异来实现胚胎染色体非整倍体的植入前筛查。但本指南所规定的高通量测序法并不能对染色体结构异常如易位、倒位等进行检测，且不能代替传统筛查中的胚胎形态学评级等。

3.3 主要原材料

胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂的主要原料是指所有与预期用途相关原材料。主要原材料一般由：单细胞扩增所需的裂解液、前扩增酶及其缓冲液、后扩增酶及其缓冲液、文库构建所需相应功能的酶（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，特别是采样的工具和耗材
- (2) 和采样得来的卵裂球或囊胚滋养层细胞保存液体，运输和储存相关的试剂或材料
- (3) 和 DNA 纯化相关的试剂或材料
- (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。辅助试剂可以是检测试剂盒的一部分也可以分开申报，但是胚胎植入前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

如采用全基因组低深度测序方法的胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒（高通量测序法），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；采用其他原理的胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒，企业则需提供企业参考品，并且证明其实质等效性。

3.6 测试结果的解释

检测应形成规范的正式报告，且报告应该在接收到待检物后规定的工作日内完成并发放。报告应包括以下信息：样本基本信息如胚胎父母鉴别号，年龄，样本编号、采用本项技术的适应症；胚胎的取样时间 D3 或 D5、采样日期和报告日期；检测的项目和检测方法，采用的仪器设备、试剂、检测人员、检测结果、结果解释建议、检测者、审核者等。必要时要求平行检测父母的核型信息，如对于胚胎父母有罗氏易位、平衡易位、倒位等异常核型患者。检测报告应对每个被检胚胎的检测结果以标准的专业方式描述，胚胎植入前染色体非整倍体检测以是否出现染色体非整倍体的改变来表示。必要时根据检测结果辅以其他的描述或说明；检测报告要反映有效序列数、覆盖度及染色体数目散点图或其他类型；检测中发现的拷贝数变异，如 10M bp 碱基以上的部分染色体拷贝数变异均认为有致病性，应全部报出。

(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。如阴性质控品必须为阴性，21 三体阳性质控品反应结果必须为 21 三体，此反应体系结果有效。

(2) 结果判断

应给出目标染色体片段检测值、参考范围、对应的染色体核型判断结果。

(3) 结果描述与建议

检测结果应对检测到的染色体异常如实描述，但是检测结果仅供临床医生参考，不作为胚胎是否植入的唯一标准。根据不断完善的行业标准，建议阳性结果的胚胎不进行植入，阴性结果的胚胎应结合其他临床检查结果如胚胎评级打分等情况综合考虑进行选择植入，同时可以要求妊娠成功后对产前诊断进行最终确诊。

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

胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂一般采用统计学方式进行测试样本和一定量参考样或自身样本内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。胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂仅统计人类参考基因组中的可比对序列区域，还存在其它“基因组结构异常”等序列区域不能检出。

(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辅助生殖夫妇个体差异，有下列情形的辅助生殖夫妇的胚胎进行检测时，可能影响结果准确性或该检测方法不适用。包括：1) 夫妻一方为平衡易位、染色体结构异常等造成的胚胎染色体结构变异；2) 胚胎嵌合；3) 单亲二倍体；4) 极体；5) 一代 IVF；6) 多原核合子、分裂异常及其他原因引起的染色体倍数无法确定的胚胎；7) 全套染色体三倍体或多倍体的胚胎，如 69,XXX。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。如夫妻一方平衡易位的患者胚胎可以采取荧光原位杂交探针 (FISH) 对特定染色体结构变异进行定向检测。

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。需说明对胚胎细胞获取和保存要求，适用样本和质量，要求应用合规的胚胎细胞采集仪器和耗材。注明样本的包装，保存和运输的流程。

应按照国家 IVF 的有关胚胎取样标准（如临床技术规范-辅助生殖技术和精子库分册等）来操作，对具备适应症的患者，夫妻双方签署知情同意书；建立病例

档案；按辅助生殖技术程序促排卵后阴道穿刺取卵；行胞浆内单精子注射，胚胎培养；择时行胚胎活检；一般为培养的第三天或第五天。

需指出胚胎细胞样本的采集方法，处理条件（如应规定多长时间内将细胞置于保存液中）；已置于保存液中的胚胎细胞样本的保存管，保存条件（体积、温度、时间），运输条件，处理条件（如核酸提取前的预处理）；冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求；如只可使用 PCR 管进行胚胎细胞样本保存（注：随着技术的进步，样本管的发展也日新月异，使用其他特殊的胚胎细胞保存管时，应经过充分的验证，不仅仅是对样本管，而且应该包括适用的保存液、放置时间、运输条件、以及处理方式等）。

样本应详细记录是否有测试局限性所规定样本类型，如：夫妻一方为平衡易位、胚胎嵌合、单亲二倍体等。

(2) 标本质量

建立标本接收和拒收的关键标准，并记录是否有以下情况：1) 样本管出现冻融的情况；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) 样本管出现裂管、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

应该对检测样本到检测结果的检测周期给予说明，包括胚胎细胞裂解与扩增、DNA 片段化、文库构建、测序、数据分析和报告的流程。

(1) DNA 的提取的流程

应说明细胞裂解所用的试剂，要求该细胞裂解试剂经过测试证明其适用性，使用在有效期内的试剂。

应说明可能会影响单细胞裂解、基因组释放效率的因素，比如裂解酶，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。

应建立相关操作规程，避免将单细胞或 DNA 吸出反应体系，防止假阴性结果。

应对细胞裂解缓冲体系对后续扩增（或预扩增）的影响进行评估。

细胞裂解、基因组释放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。

(2) 单细胞扩增及 DNA 质量

对胚胎细胞和它的保存液一起进行细胞裂解和全基因组扩增（WGA），一般将其扩增产物再进行 DNA 打断回收、末端修复、接头连接、PCR 扩增, 完成 DNA 测序文库的构建。

应建立单细胞扩增流程，选择合适的单细胞扩增试剂，采取适当的方式进行单细胞扩增循环次数、单细胞扩增产物的量、覆盖度、脱扣率、GC Bias、均一性等指标的评估。

应说明 DNA 片段化的方法，如超声法或酶切法等，比如超声法的功率、时间、参数，酶切法的酶活力单位，酶的使用量和反应时间，是否存在干扰物质等；应说明 DNA 片段化的 DNA 起始量，说明可能会影响 DNA 片段化效果，如片段分布、浓度、纯度等的因素，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制备过程也应进行说明。

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。应记录样本提取或细胞扩增后的 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。在测序文库制备时，根据测序平台的不同，其原理也不同，需要采用不同的测序文库构建流程。

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，每个独特的标签或 **barcode** 只能用于一个标本，但当样本数量大于标签或 **barcode** 数时，只要不在同一个反应池或者同一个 **pool**，标签或 **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信息分析建立阈值并进行记录；以每轮测序超过预定阈值的碱基百分比的方式，对碱基质量中位数进行记录并建立阈值。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、reads 数、唯一比对序列的百分比（在去除重复的序列之后）、重复 reads 的百分比（能够反映出在同一位置开始的 reads 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，要进行清理，除去一些质量不高的序列（如根据 Q 值清理），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。

检测片段/序列主要是在受精卵经过体外培育后的胚胎细胞的全部染色体的部分随机片段的序列。检测到的 DNA 片段有可能的来源如下，但是也不限于这些来源：胚胎细胞的基因组 DNA，母体的基因组 DNA，胚胎细胞线粒体的 DNA，试剂中污染物种的 DNA，来自环境的 DNA。

在序列比对时，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），使用经验证的相关过滤标准如不容错比对模式并且不允许空碱基间隙（gap）等过滤标准后，采用唯一比对的序列进行后续在窗口区的统计。

应详细说明并记录所使用的数据库，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全基因组组装还是针对目标序列。如果使用云端分析软件，对人类全基因组组装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。

应建立比对或组装的质量控制标准，对检测比对质量的指标建立和它们相关的阈值并进行记录。

可以采用指标有：reads 对比参考基因组的百分比，reads 对比目标区域的百分比，质量得分和 reads 正确率的比照，目标覆盖率，对比目标序列 reads 的偏差率，以及

对比人类全基因序列的偏差率，覆盖的深度，等技术指标中一个或多个进行组合确定比对或组装的质量控制标准。还应建立非特异性的对照，如由于插入缺失造成的未比对成功的 reads 或者 clipped reads，参考序列造成的对照错误等。

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。

应进行窗口区的校正，并进行评估。基因组上的不同区域存在不同类型的特殊序列，比如高 GC 含量区域，端粒附近重复率较高区域，N 碱基区域。这些异常会导致比对过程中各个区域的比对效率差异很大。为了避免基因组本身对比对造成的影响，应通过生成窗口文件进行窗口区的校正。应根据正态数据分布特点，将从参考样本的检测结果中得到由于系统误差导致的假阳性信号，作为检测样本的过滤库，过滤掉已知假阳性信号。还应过滤掉一般是 ENCODE 计划中列出(The ENCODE Project Consortium 2012)基因组上微卫星的区域，端粒酶和着丝粒区域重合的窗口。同时，过滤并去掉参考基因组上的窗口内比对率低的窗口。除了直接过滤外，也可用参考样本对待检样本进行矫正来降低基因组上述特殊区域的影响。

4) 检测阈值或参考值的设定

检测参数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。

由于目前胚胎染色体非整倍体的检测参数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 500 例阴、阳性临床样本对参考值的试验验证资料。

例如：CopyRatio（区域标准化后深度值）法是一种深度值与游程检验结合的判断方法。深度值是评价区域测序量的重要指标与基因组的变异情况成正比。游程检验是一种利用游程的总个数来判断样本随机性的统计检验方法。

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）。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。根据之前将参考基因组划分好的预定窗口区间，统计每个窗口内的有效序列数。为了减少误差可用经过矫正之后的窗口序列数代表该窗口的深度情况。

遍历所有窗口，针对每个窗口，选取左右两侧一定数据窗口组成的区间，用游程检验进行统计，确定此窗口两侧测序深度分布的 P 值，如果 P 值小于终止 P 值（通过对已知正常样本进行统计而确定）则判断此窗口为变异窗口。对每个断点与上下游断点组成区间进行统计检验，剔除 P 值最大的断点。对剩余的断点重复进行相邻断点间的检验直到所有断点 P 值小于终止 P 值。

R 为游程检验中的游程个数， $E(R)$ 值为游程的期望值；

$$E(R) = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} + 1$$

σ_R 为游程个数的方差值；

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{2n_1n_2(2n_1n_2 - n_1 - n_2)}{(n_1 + n_2)^2(n_1 + n_2 - 1)}}$$

检验统计量

$$Z = \frac{R - E(R)}{\sigma_R}$$

根据 Z 值查找对应的 P 值作为后续过滤依据。

将经过检验后划分的区域用对应的 CopyRatio 值（区域标准化后深度值）进行过滤得到染色体变异结果。

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。规定可追溯原始序列的核心数据保存期限，详细说明并记录数据存储路径，如有本地存储，应该说明本地存储应具备的能力，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，应建立确认和批准的流程。

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。

报告的输出要标准化，要明确检测的突变大小，4M 以上的 CNV 要 100% 检出（注：4M 以上的 CNV 检出和临床上 10M 进行报告有区别，一般认为 10M CNV 以上导致异常表型，具有致病性要考虑临床意义，此处的 4M 要求检出反映试剂的检出能力），1-4M 的 CNV 可以补充报告的形式输出；报告应该给出阳性参考区间，检

测结果的解释（包括质量控制品的检测结果和阳性的判定方法），和检测结果的局限性。

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、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）监测单细胞扩增的空白质控品：单细胞扩增对环境的要求很高，应确定扩增无外源性 DNA 污染（如其他人的基因组 DNA 污染）；
- （2）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；
- （3）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；
- （4）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，特别是和预期用途匹配。尽管在给予高通量测序方法的企业参考品一定的考虑和设计以后，本指南也可能适用于其他的染色体非整倍体和染色体拷贝数的植入前筛查，但是这里主要讨论的和适用的是从有限的胚胎细胞开始通过全基因组扩增来实现低覆盖度的全基因组高通量测序方法。

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。如果可能，需指出并记录检测中每一个操作步骤的局限性，包括对其他步骤造成的可能影响。

鉴于目前高通量测序技术的复杂程度，在单细胞扩增、文库构建、测序等技术过程中发生人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 3%。

5.3 检测的数据量控制

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，单个样本数据覆盖度不低于 4%，单个样本数据量的要求是不低于 1M。由于各测序平

台读长不一样，所以所需的 reads 可能会有差异，但应该满足上述覆盖度和有效数据的最低要求。

5.4 检测的阴阳性符合率

采用全基因组高通量测序法在检测胚胎细胞扩增产物 DNA 的时候可以检测到的 DNA 片段有许多种类，如：胚胎的 DNA、病原体的 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胚胎样本 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可以采用永生化的细胞和胚胎干细胞等多种类型细胞，要求与胚胎细胞的 DNA 量和片段等物理性能指标近似。

阴性参考品可以采用染色体数目正常样本细胞、正常男性和女性血液永生化的细胞系样本等，阳性参考品可以采用染色体异常永生化的细胞系样本和胚胎干细胞样本等多种类型细胞。应设置一定数量的阴性参考品，阳性参考品中染色体异常样本应该尽量涵盖 24 条染色体。

在现行国家参考品中，阴性参考品应不得检出 22 条常染色体和 2 条性染色体数目非整倍性异常，而异常片段大小大于 4M 的阳性参考品对应的染色体异常要求检出率达到 100%，异常片段大小小于等于 4M 的阳性参考品对应的染色体异常要求检出率达到 30% 以上。

5.5 嵌合检出率

临床实际工作中囊胚活检时通常取 3-10 个外滋养层细胞，由于外滋养层存在异质性，即嵌合现象，而高比例的嵌合异常不建议进行移植，因此嵌合型非整倍体的检测准确性需要通过参考品进行考虑和设置。

为了检测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% 嵌合比例样本。70% 异常嵌合体检出率应大于等于 60%，30% 异常嵌合体检出率应大于等于 30%。

5.6 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 孙楠 于婷 白东亭

中信湘雅生殖与遗传专科医院 林戈

山东大学生殖医学研究中心 高媛

深圳国家基因库 陈芳

华大基因研究院 刘萍 谭宏东

苏州贝康医疗器械有限公司 梁波