

## ctDNA 高通量测序临床实践专家共识(2022年版)

中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会

**【摘要】**循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)高通量测序在肿瘤临床诊疗中发挥越来越重要的作用,但其临床检测标准和应用范围尚缺乏统一认识。中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会组织相关专家,结合国内临床实践,参考国内外文献,从ctDNA生物学特征、检测影响因素,ctDNA高通量测序检测结果的临床应用价值和范围,以及ctDNA高通量测序检测体系的标准化建设等方面进行评述,提出专家意见,经专家组讨论并形成7条专家共识,为ctDNA高通量测序的临床应用和检测提供参考,以促进ctDNA高通量测序的健康规范发展。

**【关键词】**循环肿瘤DNA;高通量测序;液态活检;伴随诊断;检测规范化

**【中图分类号】**R730.4 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1674-5671(2022)03-0240-13

**DOI:**10.3969/j.issn.1674-5671.2022.03.02

随着液态活检的快速发展,采用体液对患者的分子特征进行分析成为可能,特别是基于循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的高通量测序(next generation sequencing, NGS)技术,因其无创或微创、检测时间短、能够反映瘤内和转移灶异质性、可动态监测治疗疗效等优势而在临床得到越来越广泛的应用。与肿瘤组织样本相比,采用ctDNA进行基因检测在样本收集和处理、检测技术要求、结果解读和临床应用等方面存在诸多不同,且目前国内尚缺少ctDNA基因检测标准,因此限制了其在临床上的规范应用。为此,中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会组织国内肿瘤临床、病理、检验、生物信息分析和高通量检测领域专家,参考国内外ctDNA临床应用共识、指南和最新文献,结合国内外现有的高通量测序技术要求和临床实践,从ctDNA的生物学特征、临床应用价值和范围、高通量检测的标准要求及其未来发展趋势等方面提出本共识,以促进ctDNA NGS的健康规范发展。

### 1 ctDNA概述

ctDNA通常由肿瘤细胞主动分泌或在肿瘤细胞凋亡或坏死过程中释放入循环系统中的DNA片段,长度132~145 bp,半衰期较短(一般<2 h)。ctDNA会携带来源于肿瘤细胞相关的遗传学特征,如基因突变、甲基化、扩增或重排等,可作为肿瘤筛查、伴随诊断、治疗疗效评估及预后风险分层的重要指标。

ctDNA水平一般呈动态变化,且受多种因素影响:(1)肿瘤病理组织类型、部位、分期、肿瘤负荷等因素可影响ctDNA的释放。在肿瘤负荷较轻、特定部位(如颅内肿瘤)和特定组织学(如胶质瘤),以及增殖、凋亡和/或血管化水平较低的肿瘤患者中,ctDNA水平通常较低<sup>[1]</sup>。(2)大量其他来源的DNA干扰。如其他正常细胞或白细胞来源的DNA,与ctDNA一起被称为游离DNA(cell free DNA, cfDNA)。多种生理和病理因素,如怀孕、剧烈运动、外伤、炎症、心肌梗死、自身免疫性疾病和急性中风等也会影响cfDNA的释放<sup>[2-3]</sup>。(3)克隆性造血细胞产生的cfDNA携带的基因突变信息可能会干扰ctDNA检测结果<sup>[4]</sup>。此外,其突变基因还受不同内外因素影响(包括年龄、吸烟、种族和肿瘤治疗等),如*ASXL1*突变在吸烟者中富集,DNA损伤应答(DNA-damaged response, DDR)基因(*TP53*、*PPM1D*、*CHEK2*)突变在接受放射、铂类药物和拓扑异构酶Ⅱ抑制剂治疗的肿瘤患者中更为常见<sup>[5]</sup>。(4)ctDNA半衰期较短(一般<2 h),不同采样时间可能影响ctDNA含量<sup>[6]</sup>。(5)药物治疗影响ctDNA含量。有研究显示,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者接受酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗后,ctDNA含量在24 h达到顶峰,随后快速降低,提示药物也会影响ctDNA含量<sup>[7]</sup>。

与组织学检测相比,ctDNA检测具有无创或微创,可反复取材,收集、处理和分析报告周转时间(turn-around

time, TAT)短等优势<sup>[8]</sup>。同时能克服肿瘤空间异质性,可相对全面地实时反映患者的肿瘤分子特征<sup>[9]</sup>。与单独组织活检相比,血浆ctDNA还可增加驱动基因突变检出率<sup>[10]</sup>。然而,与组织标本相比,外周血ctDNA含量较低,容易造成临床检测假阴性结果。由于胚系变异或克隆性造血突变的存在,若未用白细胞作为对照,也可能导致假阳性结果<sup>[11-12]</sup>。此外,不同肿瘤患者或同一患者不同时段释放入血的ctDNA量也存在差异,这也给ctDNA的临床检测和结果解读带来困难。一项对中国66家ctDNA NGS检测实验室质控的回顾分析显示,ctDNA检测报告书写质量相对满意的实验室仅占42.4%,其中74.2%的报告仅列了相应癌种与目前治疗药物最相关的基因变异结果,对检测方法细节和相应检测局限缺乏详细的描述<sup>[13]</sup>。

专家共识:ctDNA是由肿瘤细胞主动分泌或肿瘤细胞在凋亡或坏死过程中释放入循环系统的DNA片段;其丰度受多种因素影响,波动较大,在内外因素特别是治疗压力下,其携带的生物信息可能会发生演变,且受正常细胞胚系变异或克隆性造血细胞体系突变干扰,在临床检测和报告解读过程中应特别注意。

## 2 ctDNA NGS检测的临床应用

### 2.1 ctDNA NGS检测在肿瘤伴随诊断中的价值

伴随诊断(companion diagnostics, CDx)被认为是肿瘤个性化医疗中不可或缺的工具,其要求测试结果所提供的信息足以保证相应治疗药物的安全性和有效性,预期用途为指导用药,识别能够从特定治疗中受益的患者。ctDNA检测作为CDx在最早的临床实践应用是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变检测,主要用于识别可能从EGFR TKI获益的晚期NSCLC患者。在ENSURE研究中,ctDNA检测EGFR 19del和L858R突变的特异性为98.2%,敏感性为76.7%;而根据ctDNA检测结果接受厄洛替尼治疗的患者较化疗患者的PFS明显改善<sup>[14]</sup>。基于该研究结果,FDA于2016年批准首款液体活检CDx产品Cobas EGFR Mutation Test v2,随后国家药品监督管理局(NMPA)于2019年批准该款CDx产品在国内上市。在FLAURA研究中,ctDNA T790M阳性患者对奥希替尼的客观缓解率(objective response rate, ORR)与肿瘤组织活检阳性患者一致<sup>[15]</sup>。据此,2020年FDA

批准Guardant360 CDx用于血浆ctDNA检测以识别可获益于奥希替尼治疗的EGFR L858R/19del/T790M突变,埃万妥单抗(JNJ-6372)对应的EGFR 20ins突变以及索托拉西布对应的KRAS G12C突变的NSCLC患者<sup>[16]</sup>。随后又批准适用范围更广的一款CDx产品FoundationOne Liquid CDx,主要用于识别包括NSCLC EGFR敏感突变(L858R/19del)、ALK重排、MET 14号外显子跳跃,前列腺癌BRCA1/2及ATM突变,上皮性卵巢癌/输卵管癌或原发性腹膜癌BRCA1/2突变以及乳腺癌PIK3CA突变,以指导其药物<sup>[17]</sup>。

当前EGFR、ALK、ROS1、BRAF、MET、RET、NTRK及KRAS(G12C突变)等驱动基因阳性的晚期NSCLC一线靶向治疗药物相继获批,基于ctDNA检测结果的临床治疗选择日益获得注册临床试验与真实世界研究的证据支持。有研究显示,在转移性NSCLC中,对于指南推荐的生物标志物,ctDNA检测较仅采用组织活检的患者可额外增加48%的检出率,且可显著降低检测报告TAT(9 d vs 15 d,  $P<0.0001$ )<sup>[8]</sup>。NSCLC NCCN指南2022 V1版推荐不宜开展有创活检的晚期患者,或所获得的组织标本质量不佳,或标本量不足以开展必需的多基因变异检测时,可以开展包含EGFR、ALK、ROS1、BRAF、MET、RET和KRAS(G12C突变)等在内的ctDNA NGS检测,但也同时提醒ctDNA NGS检测存在30%左右的假阴性,以及相应分析会受到克隆性造血影响<sup>[18]</sup>。2021年,国际肺癌研究协会(IASLC)共识指出,ctDNA可作为初诊NSCLC晚期患者进行基因分型的有效工具,其结果通常可与组织分析结果互补,也可以作为诊断生物标志物评估和监测靶向治疗疗效的首选策略(其中血浆优先)<sup>[19]</sup>。

基于SOLAR-1研究<sup>[20]</sup>结果,FDA于2019年批准第二款液体活检CDx产品Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit。该产品主要通过血浆ctDNA检测识别受益于PIK3CA抑制剂阿培利司(与氟维司群联合)治疗的PIK3CA突变晚期HR+/HER2-乳腺癌患者<sup>[21]</sup>。一项关于乳腺癌的荟萃分析显示,ctDNA检测PIK3CA突变的敏感性和特异性分别为86%和98%<sup>[22]</sup>。乳腺癌NCCN指南2022 V1版推荐,复发不可切除或转移性HR+/HER2-乳腺癌应进行基于穿刺组织或ctDNA的PIK3CA突变分析,若首选ctDNA检测但结果呈阴性时,应再次进行组织检测确认<sup>[23]</sup>。

在胃食管腺癌中,原发肿瘤和转移灶往往存在异质性,ctDNA检测可全面反映全身肿瘤情况,从而更有效地指导精准治疗<sup>[24]</sup>。研究显示联合组织和血浆ctDNA *HER2*扩增检测可提高对食管癌及食管胃交界部癌患者抗*HER2*治疗的预测价值<sup>[25]</sup>。胃癌和食管癌及食管胃交界部癌NCCN指南2022 V1建议不适合组织活检的胃癌和食管癌患者可考虑进行血浆ctDNA NGS检测<sup>[26-27]</sup>,但同时强调ctDNA检测为阴性时并不排除经组织分析基因变异的存在。此外,由于尚缺乏有效的治疗手段,NCCN指南2022 V1建议转移性胰腺癌在无法经活检获得足够组织时可考虑进行ctDNA NGS检测,且至少应包括*ALK*、*NRG1*、*NTRK*、*ROS1*融合基因变异与*BRAF*、*BRCA1/2*、*HER2*、*KRAS*、*PALB2*基因突变分析<sup>[28]</sup>。皮肤恶性黑色素瘤NCCN指南2022 V1也提及ctDNA NGS检测可作为其分子分型的替代性方式<sup>[29]</sup>。

近期已有研究<sup>[30-32]</sup>初步显示,基于ctDNA NGS检测筛选参与临床试验患者具有足够的准确性,且在不影响疗效的情况下可提高试验入组率,缩短筛查时间。这些研究结果提示ctDNA NGS检测在临床试验中具有一定优势和应用前景。然而,除了已获批的伴随诊断产品,大多数ctDNA在其他靶向治疗指导的有效性和实用性证据依然不足,尚需大量实验结果和临床试验支撑,后续研究应尽可能纳入预期适用人群,通过严格设计的临床研究充分验证其临床意义<sup>[33]</sup>。针对不同癌种,血浆ctDNA肿瘤基因突变检测与肿瘤组织基因突变检测的一致性仍存在较大差异,对于检测结果差异较大的癌种,应综合考虑其临床应用风险,慎重考虑ctDNA NGS检测作为组织基因检测替代方式的可行性。

专家共识:目前已有临床证据支持ctDNA NGS检测可应用于肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等晚期实体肿瘤的伴随诊断,但涉及的驱动基因及其变异类型与相应分析体系均有严格限定,若超适应症应用时,建议与患者就检测必要性、检测费用以及局限性等内容进行充分知情。ctDNA NGS检测已被国内外专家共识或指南建议作为多种晚期恶性肿瘤组织基因检测的替代方式,但依据其分析结果实时制定临床治疗策略时仍需高级别循证证据支持。

## 2.2 ctDNA NGS检测对肿瘤治疗疗效评估及预后风险分层的价值

采用肿瘤标志物和影像学等传统方法评估分子靶向和免疫检查点抑制剂治疗疗效时无法动态反映肿瘤特征性的分子演化,ctDNA NGS检测可对肿瘤驱动基因相关ctDNA的丰度变化进行监测,判断肿瘤治疗应答,其中在NSCLC的EGFR靶向治疗中,EGFR敏感突变早期清除可用于预测EGFR TKI疗效<sup>[34]</sup>。一项动态监测ctDNA预测NSCLC临床治疗疗效的真实世界研究发现,基线ctDNA含量越高或变异数量越多,预示着OS越短(治疗后ctDNA清除的患者PFS和OS更长),而且ctDNA也是与治疗类型和评估时相点设置无关的独立预后因素<sup>[35]</sup>。接受免疫检查点抑制剂治疗的晚期NSCLC患者,ctDNA响应(降低>50%)与影像学评估的疗效吻合,且与更好的PFS和OS相关,其中治疗后5~9周早期影像评估为病灶稳定的患者,ctDNA评估为响应的患者中位OS显著延长(31.2个月 vs 18.4个月,  $HR=0.36$ )<sup>[36]</sup>。受体型蛋白酪氨酸磷酸酶D(protein tyrosine phosphatase, receptor type D, PTPRD)在多种肿瘤中表达失活<sup>[37]</sup>,在非鳞NSCLC中PTPRD磷酸酶结构域发生缺失性突变时,二线治疗能更多从阿特珠单抗中获益(中位OS: 24.04个月 vs 9.69个月,  $HR=0.16$ ,  $P=0.0273$ ),并且PTPRD是独立的预后因素<sup>[38]</sup>,且不依赖于TMB和PD-L1表达或(和)*TP53*、*EGFR*、*KRAS*基因突变状态。在转移性激素抵抗前列腺癌中,ctDNA水平降低与PSA降低超过30%相关<sup>[39]</sup>。TOPARP-A研究也发现,接受PARP抑制剂治疗的晚期前列腺癌患者ctDNA降低与OS相关<sup>[40]</sup>。但在近期一项黑色素瘤合并脑转移免疫检查点抑制剂治疗研究中发现血浆ctDNA分析并不能很好地监测颅内病灶疗效,这显示了血脑屏障对ctDNA检测的不利影响<sup>[41]</sup>。

微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)概念最早来自血液肿瘤。实体肿瘤的MRD概念更多被称为分子残留病灶(molecular residual disease, MRD),是指经过治疗后,传统影像学(包括PET/CT)或其他实验室方法不能发现,但通过液体活检发现的肿瘤来源分子异常,代表肿瘤持续存在和临床进展可能。TracerX研究证实了ctDNA作为MRD检测的可行性并评估了MRD检测对NSCLC术后复发的预测价值<sup>[42]</sup>。一项



回顾性研究纳入了22例接受新辅助治疗(大多为新辅助免疫治疗)的ⅠB~ⅢA期NSCLC患者,其ctDNA动态分析结果与术后病理学评价高度一致,敏感性为100.00%、准确性为91.67%,其中术后3~8 d ctDNA检测阳性的患者具有更高的复发风险( $HR=5.37$ ),且基于ctDNA NGS检测预测分子复发事件较影像学标准评估的中位时间提前了6.83个月<sup>[43]</sup>。2021年《非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识》将肺癌分子异常定义为在外周血可稳定检测出丰度 $\geq 0.02\%$ 的ctDNA,包括肺癌驱动基因或其他Ⅰ/Ⅱ类基因变异<sup>[44]</sup>。一项通过检测ctDNA监测MRD的临床研究纳入261例可手术根治切除的NSCLC患者,结果显示,术前ctDNA检测发现36.4%的患者为阳性,表明可能存在未发生ctDNA脱落的肿瘤(non-shedding tumor),但不影响术后MRD监测<sup>[45]</sup>。该研究还发现术后单个节点MRD检测阴性患者的预后显著优于阳性患者( $HR=0.08$ ,  $95\%CI: 0.02\sim 0.33$ ),说明动态监测可进一步提升预测准确性,这一结果首次定义了潜在治愈人群,且发现术后MRD阴性人群不能从辅助治疗获益;仅脑部复发的患者MRD检出比例显著降低(20%, 1/5)。在结肠癌患者中,术后ctDNA连续监测较影像学标准评估最多可提前16.5个月预测分子复发事件<sup>[46]</sup>。多项研究表明,结直肠癌术后及辅助治疗后ctDNA阳性与疾病复发之间呈强相关性,术后的ctDNA分析结果可作为预后预测依据<sup>[47-48]</sup>。近期,首项基于ctDNA的结肠癌术后辅助治疗随机对照试验DYNAMIC结果显示,ctDNA指导下的辅助化疗策略可以在不影响患者总体无复发生存期的前提下,降低接近50%(从28%降低至15%)的术后辅助化疗率,避免了部分患者的无效化疗<sup>[49]</sup>。该研究为Ⅱ期结肠癌患者的术后辅助治疗决策提供了直接依据。IMvigor010是一项高危肌层浸润性尿路上皮癌辅助免疫治疗的Ⅲ期临床研究,研究结果显示ctDNA阳性患者接受阿替利珠单抗的中位无病生存期和OS显著改善,复发风险降低42%,死亡风险降低41%<sup>[50]</sup>。目前,众多公司推出实体瘤MRD检测产品,但并无获批(FDA/NMPA)产品上市,亟待通过大样本、多中心、前瞻性临床试验验证这些产品的临床效用<sup>[51]</sup>。

专家共识:晚期实体肿瘤分子靶向或免疫检查点抑制剂治疗开始后,基于NGS检测的ctDNA水平定量

和动态变化分析,有望成为新兴的疗效评估途径。ctDNA MRD检测是全新的个性化技术应用领域,尚难以建立通用性技术标准,亟待通过大样本、多中心、前瞻性的临床试验验证其临床效用。ctDNA NGS检测在临床上用于靶向或免疫治疗评估和分层时,建议就检测价值、局限性和费用等进行充分知情。

### 2.3 ctDNA NGS检测用于肿瘤获得性耐药机制分析的价值

获得性耐药是影响肿瘤精准治疗疗效的重要因素,也是抗肿瘤药物临床应用全程管理面临的最大挑战。ctDNA NGS检测由于自身优势现已广泛应用于肿瘤获得性耐药分子机制分析及后续的用药指导。如接受奥希替尼治疗的晚期NSCLC患者发生耐药时,EGFR基因常检出新的突变,其中EGFR G796/C797突变占24.7%,EGFR L792突变占10.8%,EGFR L718/G719突变占9.7%<sup>[52]</sup>。基于ctDNA NGS检测发现ALK抑制剂耐药机制具有高度异质性,如克唑替尼耐药时常发生ALK L1196M、I1171T、D1203N、G1269A/F1174L等继发突变,可能存在旁路激活相关的NRAS G12V、EGFR R108K、PIK3CA E545K等突变;塞瑞替尼耐药时常发生ALK G1128A、G1202R、G1269A、I1171T/E1210K等继发突变,可能存在旁路激活相关KIT D820E、MET E1012\*、EGFR P265\_C291del等突变;阿来替尼耐药时常发生ALK G1202R、W1295C、G1202R/L1196M等继发突变,可能存在旁路激活相关EGFR P753S突变;洛拉替尼耐药时常发生ALK G1202R/G1269A继发突变,可能存在旁路激活BRAF V600E、MET D1246N等突变<sup>[53]</sup>。在接受抗EGFR单抗治疗的转移性结直肠癌患者中,RAS信号通路中蛋白编码基因的突变和/或EGFR胞外结构域(extra-cellular domain, ECD)改变可能是导致耐药的主要分子机制<sup>[54-57]</sup>。在胃癌治疗中,ctDNA监测发现HER2拷贝数改变提示曲妥珠单抗耐药性,因此认为ctDNA中的HER2拷贝数可作为监测曲妥珠单抗治疗进展期胃癌的疗效指标<sup>[58-59]</sup>。

肿瘤免疫检查点抑制剂治疗获得性耐药机制复杂,治疗选择压力下的肿瘤亚克隆演进仅为部分原因。在当前最活跃的肿瘤转化研究领域,ctDNA靶向测序、全外显子和(或)全基因组检测,乃至单细胞组学、宏基因组、空间基因组学等诸多新技术已开始被应用。在阿维鲁单抗(avelumab)联合EGFR单抗、

改良FOLFOX6方案治疗微卫星稳定、RAS/BRAF野生型转移性结肠癌的Ⅱ期临床试验中,基于ctDNA NGS检测发现选择性压力下会继发*PD-L1*突变亚克隆演化,少数患者可出现导致RNA衰减的*PD-L1* K162fs突变以及增强蛋白降解的*PD-L1* L88S亚克隆<sup>[60]</sup>。然而,尽管目前的研究显示基于ctDNA NGS检测在探索肿瘤耐药分子机制和用药指导中有一定优势,尤其可为疑难或复杂病例的临床诊断或治疗方案制定提供重要参考,但是作为一种新兴的技术手段,尚缺乏足够的临床数据支撑其在临床实践中常规应用。相信随着临床有效性和效用性研究的不断深入,ctDNA检测在肿瘤耐药方面将发挥更大的价值,从而使更多患者获益。

专家共识:在临床环境中,ctDNA NGS检测可用于识别分子靶向治疗的耐药机制,尤其对于疑难复杂的肿瘤患者,该结果有助于后续的治疗选择决策。免疫检查点抑制剂治疗获得性耐药机制复杂,治疗选择压力下的肿瘤亚克隆演进仅为其部分原因,ctDNA靶向测序、全外显子和(或)全基因组检测仅作为其转化研究工具之一。

### 3 ctDNA NGS检测的标准

#### 3.1 ctDNA NGS检测的实验室要求

3.1.1 场地要求 应严格遵循肿瘤二代测序实验室的总体设计与要求,强调“各区独立,注意风向,因地制宜,方便工作”原则,配备满足开展ctDNA NGS测序项目所需的仪器设备。若实验室同时开展基因组DNA和ctDNA检测,应设置不同的样本制备区、文库制备区,以避免高浓度组织核酸对低浓度ctDNA的污染。

3.1.2 试剂耗材要求 实验室应优先选择获得NMPA三类医疗器械证的检测试剂和配套耗材。若暂时没有,可用经过性能确认的临床实验室自建项目(laboratory developed test, LDT)试剂替代。LDT包括以下情况: FDA注册或批准但实验室进行了修改的试剂或检测系统;未经FDA注册或批准的试剂或检测系统;未提供性能指标的试剂或检测系统。所有LDT试剂耗材在用于检测前应进行性能确认,并形成试剂制备和使用的标准操作规范(standard operating procedure, SOP),报上级主管部门备案。实验室所建立的LDT试剂禁止在本实验室以外的实验室使用。每批试剂应进行质检,并保存相应记录。

#### 3.2 实验室体系构建

3.2.1 检测流程与质量控制 ctDNA NGS检测的建立与优化涉及分析前、分析中以及分析后的三个阶段多个步骤,实验室质量管理需贯穿ctDNA NGS检测的整个流程。分析前阶段包括样本采集、运输、保存等处理,每个步骤应制定与实验室实际操作相符合的SOP,并按照SOP执行。分析中阶段包括“湿实验”和“干实验”两个步骤,“湿实验”包括核酸提取、引物或探针设计合成、文库制备、上机测序等步骤,其中文库制备可选择杂交捕获或扩增子建库,该阶段的质控应对核酸提取中的核酸浓度、纯度和片段分布做出相应要求并遵照执行;“干实验”涵盖生物信息学分析流程各步骤,该阶段质控应对最低测序深度、平均测序深度、覆盖均一性、鸟嘌呤和胞嘧啶(guanine and cytosine, GC)含量、碱基识别质量值、比对质量值和靶率等作出相应要求并遵照执行。分析后阶段包括检测报告解读、分子肿瘤专家委员会(molecular tumor board, MTB)讨论和遗传咨询等,该阶段应制定结果报告及解读SOP,并遵循准确、及时和充分的原则。此外,实验室应根据实际情况,建立室内质量控制,室间质量评价以及室间比对等SOP,并遵照执行。

3.2.2 试剂性能验证或性能确认 实验室使用已获批的高通量测序试剂开展临床检测服务前,必须对试剂进行性能验证。如果实验室改变已批准试剂指定的预期用途、试剂组分、操作流程,则按照LDT试剂要求进行管理,临床检测前需对检测系统(包含人、机、料、法、环等)的分析性能进行确认。实验室应建立试剂性能确认检测操作全过程SOP,明确试剂的分析性能指标和检测局限性。分析性能评价指标至少应包括精密度、准确度、分析敏感性、分析特异性(包括干扰物质)、可报告范围。

#### 3.3 样本收集、处理原则

3.3.1 样本采集和前处理 建议采用含细胞稳定剂的抗凝管,如 Streck 采血管等游离核酸专用采血管,实验室也可根据实际情况选择合适的采血管。根据检测要求采集适量的外周血,一般为10 mL,采血后轻柔颠倒8~10次,使保存液和血液充分混合,避免凝血或溶血发生<sup>[61]</sup>。血液离体后应尽快送至检测实验室。实验室应根据实际情况制定保存运输时限及温度要求。建议采用两步离心法分离血浆,第一步:2~8℃,



1 600~1 900 g 离心 10 min, 将上清转移至新的离心管中; 第二步: 2~8 °C, 16 000~20 000 g 离心 10 min, 转移上清至新离心管。分离血浆可直接抽提 ctDNA, 或保存于 -80 °C 至使用时, 保存过程中应避免反复冻融<sup>[62]</sup>。

**3.3.2 样本制备与质控** 临床上目前常用的 cfDNA 提取方法有离心柱法和磁珠法, 应根据检测要求选择合适的方法。提取的核酸应在 2~8 °C 下储存且不超过 24 h; 若超过 24 h, 建议在 -30 °C 至 -15 °C 下储存, 并避免反复冻融。进行文库制备前, 建议采用合适的方法对获得的 cfDNA 总量和片段分布进行分析, 判断是否满足实验室制定的质控要求。若不满足后续检测需求, 应采取相应措施处理, 必要时重新采集样本。

专家共识: ctDNA NGS 检测实验室质量管理需贯穿全程, ctDNA 收集、样本处理和自动化过程应按照国家标准化和临床验证程序进行, 最大程度防范因操作差异而引发的假阴性可能。样本采集建议采用含细胞稳定剂的抗凝管, 尽快完成血浆分离, 提取的 cfDNA 建议在 24 h 内进行后续检测, 否则, 置于 -30 °C 至 -15 °C 下储存并避免反复冻融。

### 3.4 ctDNA NGS 检测技术要点

**3.4.1 文库构建策略** 采用 NGS 方法进行 ctDNA 检测的靶向测序策略主要分为两种: 基于杂交捕获的靶向 NGS (hybrid capture NGS) 和基于扩增子的靶向 NGS (amplification-based NGS)<sup>[63]</sup>。基于杂交捕获的靶向 NGS 方法是通过捕获探针与基因组中特定区域杂交, 从而获得目的区域的序列并进行分析的方法<sup>[64]</sup>。该方法操作步骤多, 过程相对复杂, 需要 1~2 d 完成建库上机, 可以检测点突变, 小片段的插入缺失和拷贝数变异, 以及 DNA 层面的基因重排, 且可以发现一些未知融合, 检测灵敏度可达 95% 以上。目标序列捕获法建库使用的探针设计有 DNA 探针和 RNA 探针, 主要对目标区域进行靶向富集, 确保样本目标序列完全富集, 提高富集效率和覆盖的均一性, 有效降低测序成本。基于扩增子的靶向 NGS 方法依赖多重 PCR 扩增步骤富集目标序列。实验过程中, 基于扩增的文库制备的实际操作时间通常比杂交捕获方法短。对于基因数目较少, 用药相关热点突变明确的 panel 可以采用靶向扩增子测序, 扩增均一性在引物设计时需要优化调试。两种测序策略各有优劣, 实验室可依据检测的靶向测序 panel 大小、基因

种类、突变类型及时效要求等选择不同测序策略, 并依据专利技术进行适当优化, 从而提升基因文库的构建质量和效率。不论采用何种方法, 每个检测项目都应设定明确的合格文库标准<sup>[65]</sup>, 上机测序前应对文库浓度和文库片段分布进行分析, **合格的文库标准应包括片段是否相对集中, 有无游离接头, 有无接头二聚体, 片段大小是否在推荐文库片段范围内等内容。**

**3.4.2 分子标签策略** 对于 cfDNA 样本的突变检测下限期望达到 0.1% 甚至更低时, 仅靠增加测序深度已不足以提升灵敏度, 建库过程 PCR 结果引入的错误和测序造成的系统误差都会增加假阳性结果。使用分子标签技术和优化对应的生物信息分析设置, 可以过滤由于测序平台随机误差导致的假阳性结果, 从而实现更高的灵敏度。其原理是在文库制备过程中, 通过添加一段 3~8 bp 随机序列作为分子标签 (unique molecular identifier, UMI), 该法可以灵敏地识别 PCR 重复片段并校正 PCR 扩增错误, 从而进行正确的 DNA 片段溯源, 提供更可靠的突变分析。

**3.4.3 参数确定策略** 对于大多数实体恶性肿瘤, 血浆中的 ctDNA 水平较低, 突变等位基因分数在晚期转移性疾病中通常低于 10%, 在局部晚期非转移性疾病中低于 1%<sup>[66]</sup>。ctDNA 水平在癌症早期和治愈性治疗后更低, 其突变等位基因频率通常小于 0.1%<sup>[67-68]</sup>。因此, 需要高度灵敏的方法检测血浆 ctDNA。中国肿瘤驱动基因分析联盟 (CAGC) 建议血浆 cfDNA 标本的 NGS 有效测序深度应达到 1 000× 以上, 并应在 80% 以上的目标区域达到这个深度, 而非所有区域的平均, 否则在区域间覆盖波动较大的情况下, 会有大量区域出现覆盖不够的情况<sup>[69]</sup>。肺癌微小病灶残留定义、检测与应用中国胸部肿瘤学专家共识中指出: 采用 NGS 靶向测序多基因检测 panel 进行 MRD 检测时, 基本技术标准是可稳定检出丰度 ≥ 0.02% 的 ctDNA。NCCN 指南推荐且应用相对成熟的 Signatera 扩增子 NGS 技术的平均测序深度高达 100 000× 以上<sup>[70]</sup>。这也提示早期癌症检测和微小病灶残留检测需要更高的测序深度。目前检测策略众多, 不同策略对测序深度和广度的标准也有待进一步的循证医学证据支持。

**3.4.4 测序平台选择** 目前使用较多的 NGS 测序平台是因美纳 (Illumina)、华大智造 (MGI) 和赛默飞

(Thermo fisher)平台。尽管技术性能相似,但平台之间DNA投入要求、试剂成本、运行时间和读取长度等均存在差异。Illumina平台高通用性和可扩展性高,可对不同大小靶向测序panel进行灵活分析。同时也需要更高的DNA和RNA投入,测序时间长,测序成本高,需要更全面的生物信息学支持。MGI平台在有高通用性和可扩展性的同时,还具有测序重复率低、有效数据利用率高、测序速度快、测序成本相对较低等优势,尤其适用于需要高数据量的ctDNA检测。Thermo fisher平台通量小、测序时间短、测序成本低,同时配备内置生物信息学分析流程,便于数据自动化分析<sup>[71]</sup>。总之,三大测序平台各有优劣,不同实验室可以依据样本量、测序数据量以及时效要求等选择相应的测序平台。

### 3.5 生信方法要求

**3.5.1 基于分子标签技术的数据质控和数据分析** ctDNA检测常出现PCR重复序列比例高(50%~90%)、PCR扩增和测序错误等引入的背景噪音高等问题。同时,血液中白细胞的克隆性造血突变也影响ctDNA变异的鉴定。基于分子标签技术的分析流程可帮助有效去除背景噪音,配对白细胞样本或背景库的建立可有效去除来自白细胞中克隆性造血突变引入的假阳性,提升ctDNA检测的准确性。UMI通过给每一条原始DNA片段加上一段特有的标签序列,经文库构建和PCR扩增后一同测序,根据不同的标签序列可以区分不同来源的DNA模板,分辨源于PCR扩增及测序过程中随机错误产生的假阳性突变,识别ctDNA中真正来源于肿瘤的突变,从而提高检测灵敏度和特异性,可达0.1%的检出限<sup>[71]</sup>。一般推荐1条UMI对应并至少3条reads。

**3.5.2 测序噪音控制** 建立背景库过滤噪音的大致思路是通过使用相同测序流程的样本估计基因组坐标对应区域或碱基的测序错误率,然后使用假设检验等统计方法比较目标样本对应坐标的突变频率是否显著高于估计得出的测序错误率。通过对患者肿瘤样本建立背景库过滤噪音的常用方法有SiNVICT和OutLyzer。SiNVICT使用肿瘤样本计算出一段基因组区域的噪音水平,通过计算信噪比的方法过滤潜在的假阳性结果<sup>[72]</sup>。OutLyzer通过计算目标突变附近200 bp内的每个坐标的测序错误率,并通过多次Thompson's Tau Test过滤离群噪音<sup>[73]</sup>。在可用样本

较为充足的情况下,使用多个患者的正常样本建立背景库能较准确地估计噪音水平。其中代表方法有Mutect1/Mutect2(GATK)<sup>[74]</sup>,该法使用不少于40个没有肿瘤细胞污染的正常样本构建背景库。在此基础上发展的基于不同算法的构建背景库算法,如基于二项分布的TNER、基于高斯分布模拟的IDES<sup>[75]</sup>、基于泊松分布的AmpliSolve<sup>[76]</sup>等,均可有效提升突变检出准确率和召回率,去除背景噪音。

**3.5.3 克隆性造血变异过滤** RAZAVI等<sup>[77]</sup>发现ctDNA存在大量未知来源的基因变异(variants of unknown source, VUSo),大部分VUSo突变丰度<1%,与样本测序深度、DNA起始量、位点的测序深度、样本染色体拷贝数无相关性,且有很好的重复性结果。在白细胞样本中也检测到大量的VUSo,且与年龄呈正相关,证实了ctDNA中的大部分VUSo来自白细胞,并非来源于测序背景噪音,这部分VUSo突变被定义为克隆性造血突变。因此,在不同ctDNA高通量测序临床应用场景,需要考虑ctDNA中包含有源于白细胞的克隆性造血突变。ctDNA检测时通过配对的白细胞样本,或者汇集整合检测到的克隆性造血突变,构建克隆性造血突变背景库,可有效帮助去除克隆性造血造成的假阳性。

**3.5.4 数据的储存与管理** 随着测序深度的增加,ctDNA下机数据有效安全的储存需要配备相应的基础设施。高通量测序会生成大量文件,下机的fastq或bam原始文件、vcf结果文件等需长期保存,同时应保存好测序过程中完整的日志文件,以便区分高通量测序分析软件版本信息、追溯异常结果。诊断实验室应保存相关数据至少3年,并在相关技术人员的支持下制定数据备份计划和恢复计划。

专家共识:ctDNA NGS检测应根据项目需求选择技术路线,可依据检测基因数量及覆盖范围大小选择不同测序策略。在进行基于ctDNA的超高灵敏度突变检测时,建议使用分子标签技术和优化对应的生物信息分析设置,以降低由于测序平台随机误差导致的假阳性结果;建议通过建立测序噪音和克隆性造血背景库的方法降低克隆性造血及背景噪音带来的影响。

### 3.6 报告要求

**3.6.1 专业团队建设** 实验室负责人应具有临床医学专业背景、分子生物学相关工作经历、副高级以上



专业技术职称。主要报告签发人员应具备临床医学、分子生物学和遗传学等多种专业背景,了解肿瘤的临床治疗指南以及临床试验最新进展,最好具有2年及以上肿瘤组织多基因NGS检测分析工作经历。报告如涉及基因胚系变异分类与临床意义阐释,建议结合临床遗传咨询同步开展。旨在进行ctDNA NGS检测全面分析与复杂临床场景应用的机构,鼓励建立由多学科专家组成的MTB。

**3.6.2 报告内容** ctDNA NGS检测的临床报告应包含以下内容:(1)受检者的基本信息。应明确包含受检者姓名、性别、出生日期或年龄、接受检测的日期、检测的目的(需要明确疾病发病状态或携带者状态)和受检者的临床指征(应至少包含疾病的诊断或初步诊断)等。(2)样本信息。每份样本应有唯一标识,注明样本类型、采集时间、采集部位、送检时间、检测报告时间和样本主要质控情况(如DNA质量评估以及测序质量评估等)。(3)实验室信息。包括实验室名称、实验操作人员、报告审核人员、联系方式。(4)检测项目。包括基因panel的检测位点及检测范围、检测仪器、检测试剂,是否为NMPA批准使用的检测试剂以及NMPA获批的基因位点信息,或LDT试剂、检测方法、检测下限等。(5)检测结果及变异解读。对基因变异的检测结果进行解读,如检出的基因型、变异结果、染色体变化情况、检测结果的致病性分级、药物信息及临床意义、变异解读引用的参考文献等;对于多次检测的患者,报告需要体现既往检测结果,并综合解读本次检测结果。(6)标注检测方法的实验室内验证结果,检测局限性及不确定性,以及进一步检测的建议<sup>[78]</sup>。

**3.6.3 变异结果的命名规则** 对基因变异的描述应遵循一定的原则和规范,推荐参考人类基因组变异协会命名指南([www.hgvs.org](http://www.hgvs.org),登录日期2022年6月22日),转录本的选择建议采用基因座参考基因组序列数据库(Locus reference genomic;[www.lrg-sequence.org](http://www.lrg-sequence.org),登录日期2022年6月22日)界定的转录本或多个国际数据库公认的主要转录本。对遗传性肿瘤相关基因变异的说明,建议以美国医学遗传学学院(American college of medical genetics and genomics)指南为标准,在检测结果中列出具体的变异位点信息,包括基因名称、所参考的人类基因组版本号、转录本参考序列版本号、

核苷酸变异、氨基酸变异、外显子/内含子序号、等位基因杂合性、染色体编号及坐标等<sup>[79]</sup>。

**3.6.4 指导用药的循证分级规范** 对于肿瘤体细胞突变的临床意义解读,建议依据伴随诊断、临床指南、数据库或文献证据进行分级,可以将肿瘤体细胞基因突变分为临床意义明确(I级)、有潜在临床意义(II级)、临床意义不明确(III级)和良性或可能良性突变(IV级)。实验室应建立突变临床意义分类及分级和报告的SOP,且SOP应至少包括以下两个方面:(1)对体细胞基因突变进行分级的流程;(2)明确报告中应包含哪一级或哪几级突变位点。分级的流程应有记录,包括证据来源的指南、文献、数据库、证据等级、分级结果等。临床证据决定突变位点分级,可参考AMP、ASCO、CAP联合发布的肿瘤样本测序突变解读共识<sup>[80]</sup>。

对胚系突变的临床意义解读,可参考中外诊疗指南及重要参考文献,Online mendelian inheritance in man (<https://omim.org>,登录日期2022年6月22日)和美国ACMG指南等资源。目前,对于胚系突变分级主要参考ACMG指南,其将变异位点致病性等级分为致病、疑似致病、临床意义未明、疑似良性和良性等5个等级。报告中应列出与遗传性肿瘤(如遗传性乳腺癌/卵巢癌综合征、Lynch综合征等)相关的致病以及疑似致病变异,并对变异的致病性进行分析解读<sup>[79]</sup>。对于意义不明位点的处理,实验室需制定相关政策,确定是否报告临床意义不明的位点,并附上说明和参考数据库,并且要在报告中注明本实验室出具临床报告的规则。

**3.6.5 其他检测方法的结果验证** 对血液样本进行高通量测序检测时如出现较低丰度的突变结果(通常血液样本低于检测下限)时,建议综合评估高通量测序实验平台性能、测序深度以及肿瘤细胞比例等因素。特别对于靶向治疗相关的基因,建议使用其他检测方法进一步验证确认,如数字PCR等方法。

**3.6.6 检测局限性声明** 外周血中ctDNA含量不足,由于受检者携带的突变可能没有包含在检测基因谱中等原因,检测可能存在假阴性结果。如果血浆检测结果为阴性,必要时仍需采用其他类型样本进行验证。另外,由于大多数基于ctDNA NGS未配对检测白细胞,如果存在胚系变异或由克隆性造血引起的体细



胞突变,也可能导致假阳性结果<sup>[81]</sup>,因此在结果报告中应对 ctDNA 的检测基因范围、检测方法和检测下限等重要性能指标进行说明。当通过 ctDNA NGS 检测进行靶向用药指导或遗传性肿瘤风险评估时,其评估标准应综合考虑驱动分子事件、临床治疗因素以及分析筛选策略。ctDNA NGS 临床检测报告的解读对肿瘤患者预后、复发监测、用药指导具有重要的参考价值。因此,报告应该明确、简洁、准确,并具有充分的解读、可信性和权威性。

专家共识:ctDNA NGS 临床检测报告应包含受检者基本信息、样本信息、实验室信息、检测项目、检测结果及变异解读、检测方法的实验室内部验证结果、检测局限性及不确定性以及进一步检测的建议等内容。实验室应建立报告 SOP,建议根据国内外文献、共识指南、临床试验证据和实践对检出的肿瘤基因突变进行分类或分级报告。

#### 4 ctDNA NGS 检测临床应用展望

目前已有部分基于基因变异信息的复合预测生物标志物用于预测免疫检查点抑制剂和分子靶向治疗疗效,从而对患者进行分层,如微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)和肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)。临床研究表明基于 ctDNA NGS 检测的 bMSI(blood MSI)和 bTMB(blood TMB)具有免疫检查点抑制剂疗效预测价值<sup>[35]</sup>。FDA 于 2020 年 8 月 26 日批准基于 ctDNA NGS 数据拟合 bMSI 和 bTMB 的试剂盒用于泛实体瘤多个靶向药物及免疫检查点抑制剂的伴随诊断。但 bMSI 和 bTMB 在临床应用中受多种因素影响,如样本采集时间、检测 panel 基因覆盖范围、panel 大小、测序深度、生信算法及阈值设定等,因此还需要更多的前瞻性临床研究证据支持 ctDNA NGS 数据拟合的 bMSI 和 bTMB 的临床应用前景。

同源重组修复缺陷(homologous recombination deficiency, HRD)检测在聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂和铂类药物敏感性预测及肿瘤易感性评估中具有重要的临床应用价值<sup>[82]</sup>。HRD 状态可通过同源重组相关基因突变(homologous recombination repair, HRR)检测和基因瘢痕(genomic scar, GS)检

测两种方式判断。目前仅有两种组织检测试剂 Myriad MyChoice® CDx 以及 Foundation Focus™ CDx BRCA LOH 获得 FDA 批准用于伴随诊断及补充诊断。两者均采用 HRR 联合 GS 检测策略评估 HRD 状态。由于基于 ctDNA NGS 对 GS 进行评估技术上具有巨大挑战,所以目前基于 ctDNA NGS 检测进行 HRD 评估主要集中在 HRR 信号通路基因 SNP 检测,但国内外对 HRR 基因的定义尚缺乏统一标准;另外,随着检测技术的进步,基于 ctDNA NGS 评估 GS 逐渐成为可能,但目前基于 ctDNA NGS 检测评估 HRD 尚有巨大的探索空间。

ctDNA 中包含核酸序列、位点突变、拷贝数、甲基化、MSI、序列长度、序列丰度、出现的时空模式、在基因组上的位置特征、起始位点和终止位点特征等丰富的生物信息,如肿瘤 ctDNA 片段的长度分布、核小体位置与正常细胞显著不同,这些信息可应用于肿瘤筛查和诊断中<sup>[83]</sup>。为了更好地整合多源异质信息,更全面描绘肿瘤生物特征,大幅提高 ctDNA 数据的效力,机器学习、深度学习等人工智能算法也被大量应用到肿瘤的筛查和诊断中。CancerSEEK 的癌症早筛项目通过监测 ctDNA 中 16 个基因的突变及血清 8 个蛋白质生物标志物水平,并构建 Logistic 回归模型,结果该模型在 8 种肿瘤共包含 1 005 例患者中的敏感性为 69%~98%,特异性为 99%<sup>[84]</sup>。最新的应用机器学习分类器辅助的深度甲基化测序能检测到 52%~81% 临床分期为 I A~III 期的患者,且检测限低至万分之一,显示了更高的敏感性和特异性(特异性为 96%, 95%CI: 93%~98%)<sup>[85]</sup>。

总之,基于 ctDNA NGS 检测的 bTMB 具有免疫检查点抑制剂疗效预测价值,但仍有诸多因素影响 bTMB 检测在临床中的应用,未来还需开展更多的前瞻性临床研究。机器学习等人工智能算法不仅能降低假阳性、提高灵敏度,还能有效整合多维度的异质信息进行全面分析,大幅提高 ctDNA 数据效力,是 ctDNA 数据分析的主要方向。

利益冲突声明:本共识由专家组内部成员针对性讨论得出,专家组编写过程中未接受生物医药公司任何形式的赞助,所有专家组成员均声明不存在利益冲突。

## 共识编写专家委员会

### 学术顾问(按姓氏拼音排列)

步 宏 四川大学华西医院  
邢金良 空军军医大学  
吴 斌 重庆市中医院

### 编写组长(按姓氏拼音排列)

犟伟奇 重庆市中医院  
于津浦 天津医科大学肿瘤医院  
袁响林 华中科技大学同济医学院附属同济医院  
张海伟 重庆大学附属肿瘤医院

### 主要执笔专家(按姓氏拼音排列)

蔡 明 华中科技大学同济医学院附属协和医院  
程 俊 重庆市中医院  
申 鹏 南方医科大学南方医院  
唐万燕 重庆大学附属肿瘤医院  
严令华 上海桐树生物科技有限公司  
尤 俊 厦门大学附属第一医院  
张 哲 广州燃石医学检验所有限公司  
赵伟鹏 天津医科大学肿瘤医院

### 编写组专家(按姓氏拼音排列)

白 莉 中国人民解放军总医院  
步 宏 四川大学华西医院  
蔡 明 华中科技大学同济医学院附属协和医院  
曹小飞 广州市第一人民医院  
程 俊 重庆市中医院  
陈 锐 重庆大学附属肿瘤医院  
陈 威 北京芯高地生物科技有限公司  
戴晓芳 华中科技大学同济医学院附属协和医院  
邓 昆 重庆医科大学附属第三医院  
高娅文 中南大学湘雅二医院  
郭 昊 南京先声医学检验实验室有限公司  
李忻正 山西省肿瘤医院  
梁志欣 解放军总医院第八医学中心  
林晓钢 重庆大学光电工程学院  
刘华文 重庆大学附属三峡医院  
刘 沛 北京起源聚禾生物科技有限公司  
吕 钢 重庆市中医院

马 杰 河南省肿瘤医院  
马 鑫 解放军总医院第一医学中心  
倪 梦 深圳华大基因股份有限公司  
犟伟奇 重庆市中医院  
聂广杰 南方医科大学顺德医院  
邱李辉 上海桐树生物科技有限公司  
全雪萍 上海桐树生物科技有限公司  
单光宇 北京优迅医疗器械有限公司  
申 鹏 南方医科大学南方医院  
苏春霞 同济大学附属上海市肺科医院  
孙建国 陆军军医大学第二附属医院  
唐万燕 重庆大学附属肿瘤医院  
唐雪峰 重庆市人民医院  
王晚萍 山西省长治市人民医院  
王宏伟 解放军总医院第四医学中心  
王怀碧 重庆市中医院  
王秋实 陆军特色医学中心  
吴 斌 重庆市中医院  
夏超然 浙江绍兴鼎晶生物医药科技股份公司  
邢金良 空军军医大学  
徐 华 重庆市中医院  
应斌武 四川大学华西医院  
严令华 上海桐树生物科技有限公司  
尤 俊 厦门大学附属第一医院  
于津浦 天津医科大学肿瘤医院  
余秋波 重庆医科大学  
袁响林 华中科技大学同济医学院附属同济医院  
袁 睿 重庆大学医学部  
张海伟 重庆大学附属肿瘤医院  
张 琼 重庆市中医院  
张 翼 北京优乐复生医学检验实验室有限公司  
张 哲 广州燃石医学检验所有限公司  
赵伟鹏 天津医科大学肿瘤医院  
赵雪琴 临汾市人民医院  
赵 征 陕西省肿瘤医院  
郑晓东 重庆大学附属肿瘤医院  
周 进 四川省肿瘤医院  
周一鸣 角井(北京)生物技术有限公司  
朱师达 深圳华大基因股份有限公司

## 参 考 文 献

- [1] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY R J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(224): 224ra224.
- [2] IGNATIADIS M, SLEDGE G W, JEFFREY S S. Liquid biopsy enters the clinic-implementation issues and future challenges[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(5): 297-312.
- [3] WANG Y H, SONG Z, HU X Y, et al. Circulating tumor DNA analysis for tumor diagnosis[J]. Talanta, 2021, 228: 122220.



- [4] JAISWAL S, EBERT B L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease [J]. *Science*, 2019, 366 (6465). DOI: 10.1126/science.aan4673.
- [5] BOLTON K L, PTASHKIN R N, GAO T, et al. Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hematopoiesis [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(11): 1219-1226.
- [6] ABBOSH C, BIRKBAK N J, WILSON G A, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution [J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 446-451.
- [7] RIEDIGER A L, DIETZ S, SCHIRMER U, et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33505.
- [8] LEIGHL N B, PAGE R D, RAYMOND V M, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4691-4700.
- [9] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future [J]. *Cell*, 2017, 168 (4): 613-628.
- [10] MACK P C, BANKS K C, ESPENSCHIED C R, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases [J]. *Cancer*, 2020, 126(14): 3219-3228.
- [11] STOUT L A, KASSEM N, HUNTER C, et al. Identification of germline cancer predisposition variants during clinical ctDNA testing [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13624.
- [12] SPOOR J, EYCK B M, ATMODIMEDJO P N, et al. Liquid biopsy in esophageal cancer: a case report of false-positive circulating tumor DNA detection due to clonal hematopoiesis [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(15): 1264.
- [13] PENG R, ZHANG R, HORAN M P, et al. From Somatic Variants Toward Precision Oncology: An Investigation of Reporting Practice for Next-Generation Sequencing-Based Circulating Tumor DNA Analysis [J]. *Oncologist*, 2020, 25(3): 218-228.
- [14] WU Y L, ZHOU C, LIAM C K, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(9): 1883-1889.
- [15] OXNARD G R, THRESS K S, ALDEN R S, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(28): 3375-3382.
- [16] US Food and Drug Administration. Guardant360® CDx. 2020 [EB/OL]. (2020-08-07) [2022-06-09]. [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf20/P200010A.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf20/P200010A.pdf).
- [17] US Food and Drug Administration. FoundationOne® Liquid CDx (F1 Liquid CDx). 2020 [EB/OL]. (2020-08-26) [2022-06-09]. [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf20/P200016A.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf20/P200016A.pdf).
- [18] National Comprehensive Cancer Network. NSCLC NCCN Guidelines Version 1.2022 [EB/OL]. (2021-08-09) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [19] ROLFO C, MACK P, SCAGLIOTTI G V, et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(10): 1647-1662.
- [20] ANDRE F, CIRUELOS E, RUBOVSKY G, et al. Alpelisib for PIK3CA - Mutated, Hormone Receptor - Positive Advanced Breast Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(20): 1929-1940.
- [21] US Food and Drug Administration. Therascreen PIK3CA RGQ PCR kit. 2019 [EB/OL]. (2019-05-24) [2022-06-09]. [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf19/P190004A.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190004A.pdf).
- [22] ZHOU Y, WANG C, ZHU H, et al. Diagnostic Accuracy of PIK3CA Mutation Detection by Circulating Free DNA in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (6): e0158143.
- [23] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Breast Cancer Version 1.2022 [EB/OL]. (2021-11-24) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [24] PECTASIDES E, STACHLER M D, DERKS S, et al. Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(1): 37-48.
- [25] MARON S B, CHASE L M, LOMNICKI S, et al. Circulating Tumor DNA Sequencing Analysis of Gastroesophageal Adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(23): 7098-7112.
- [26] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers Version 1.2022 [EB/OL]. (2021-12-21) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [27] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Gastric Cancer Version 1.2022 [EB/OL]. (2021-12-20) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [28] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Pancreatic Adenocarcinoma Version 1.2022 [EB/OL]. (2022-02-24) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [29] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Melanoma: Cutaneous Version 1.2022 [EB/OL]. (2021-12-03) [2022-06-09]. <http://www.nccn.org>.
- [30] ROTHWELL D G, AYUB M, COOK N, et al. Utility of ctDNA to support patient selection for early phase clinical trials: the TARGET study [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 738-743.
- [31] TURNER N C, KINGSTON B, KILBURN L S, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(10): 1296-1308.
- [32] NAKAMURA Y, TANIGUCHI H, IKEDA M, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies [J]. *Nat Med*, 2020, 26(12): 1859-1864.
- [33] MERKER J D, OXNARD G R, COMPTON C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16): 1631-1641.
- [34] ZHOU C, IMAMURA F, CHENG Y, et al. Early clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of response to osimertinib and com-

- parator EGFR-TKIs in the FLAURA trial[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37 (Suppl 15):9020-9020.
- [35] SONG Y, HU C, XIE Z, et al. Circulating tumor DNA clearance predicts prognosis across treatment regimen in a large real-world longitudinally monitored advanced non-small cell lung cancer cohort[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(2):269-279.
- [36] ZHANG Q, LUO J, WU S, et al. Prognostic and Predictive Impact of Circulating Tumor DNA in Patients with Advanced Cancers Treated with Immune Checkpoint Blockade [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10 (12):1842-1853.
- [37] WALIA V, PRICKETT T D, KIM J S, et al. Mutational and functional analysis of the tumor-suppressor PTPRD in human melanoma [J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(11):1301-1310.
- [38] SUN Y, DUAN J, FANG W, et al. Identification and validation of tissue or ctDNA PTPRD phosphatase domain deleterious mutations as prognostic and predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors in non-squamous NSCLC [J]. *BMC Med*, 2021, 19(1):239.
- [39] CHOUDHURY A D, WERNER L, FRANCINI E, et al. Tumor fraction in cell-free DNA as a biomarker in prostate cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(21):e122109.
- [40] GOODALL J, MATEO J, YUAN W, et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(9):1006-1017.
- [41] LEE J H, MENZIES A M, CARLINO M S, et al. Longitudinal Monitoring of ctDNA in Patients with Melanoma and Brain Metastases Treated with Immune Checkpoint Inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15):4064-4071.
- [42] ABBOSH C, FRANKELL A, GARNETT A, et al. Abstract CT023: Phylogenetic tracking and minimal residual disease detection using ctDNA in early-stage NSCLC: A lung TRACERx study [J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (Suppl 16):CT023.
- [43] YUE D, LIU W, CHEN C, et al. Circulating tumor DNA predicts neoadjuvant immunotherapy efficacy and recurrence-free survival in surgical non-small cell lung cancer patients [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11(2):263-276.
- [44] 吴一龙, 陆舜, 程颖, 等. 非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识 [J]. *循证医学*, 2021, 21(3):129-135.
- [45] ZHANG J T, LIU S Y, GAO W, et al. Longitudinal Undetectable Molecular Residual Disease Defines Potentially Cured Population in Localized Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Cancer Discov*, 2022;OF1-OF12.
- [46] REINERT T, HENRIKSEN T V, CHRISTENSEN E, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA By Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer (vol 5, pg 1124, 2019) [J]. *Jama Oncology*, 2019, 5(8):1232-1232.
- [47] TIE J, COHEN J D, WANG Y. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer (vol 66, pg 584, 2019) [J]. *Jama Oncology*, 2019, 5(12):1811-1811.
- [48] TIE J, WANG Y, TOMASETTI C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(346):346ra392.
- [49] TIE J, COHEN J D, LAHOUEL K, et al. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022. DOI:10.1056/NEJMoa2200075.
- [50] POWLES T, ASSAF Z J, DAVARPANAH N, et al. ctDNA guiding adjuvant immunotherapy in urothelial carcinoma [J]. *Nature*, 2021, 595(7867):432-437.
- [51] CHEN K, SHIELDS M D, CHAUHAN P S, et al. Commercial ctDNA Assays for Minimal Residual Disease Detection of Solid Tumors [J]. *Mol Diagn Ther*, 2021, 25(6):757-774.
- [52] YANG Z, YANG N, OU Q, et al. Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13):3097-3107.
- [53] LIN Y T, CHIANG C L, HUNG J Y, et al. Resistance profiles of anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer: a multicenter study using targeted next-generation sequencing [J]. *Eur J Cancer*, 2021, 156:1-11.
- [54] MONTAGUT C, TSUI D W, DIAZ L A, JR. Detection of somatic RAS mutations in circulating tumor DNA from metastatic colorectal cancer patients: are we ready for clinical use? [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(5):1083-1084.
- [55] MONTAGUT C, ARGILES G, CIARDIELLO F, et al. Efficacy of Sym004 in Patients With Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to Anti-EGFR Therapy and Molecularly Selected by Circulating Tumor DNA Analyses: A Phase 2 Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(4):e175245.
- [56] STRICKLER J H, LOREE J M, AHRONIAN L G, et al. Genomic Landscape of Cell-Free DNA in Patients with Colorectal Cancer [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(2):164-173.
- [57] ARENA S, BELLOSILLO B, SIRAVEGNA G, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(9):2157-2166.
- [58] WANG H, LI B, LIU Z, et al. HER2 copy number of circulating tumour DNA functions as a biomarker to predict and monitor trastuzumab efficacy in advanced gastric cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 88:92-100.
- [59] WANG D S, LIU Z X, LU Y X, et al. Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer [J]. *Gut*, 2019, 68(7):1152-1161.
- [60] STEIN A, SIMNICA D, SCHULTHEISS C, et al. PD-L1 targeting and subclonal immune escape mediated by PD-L1 mutations in metastatic colorectal cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7):e002844.
- [61] 中华医学会检验医学分会, 国家卫生健康委员会临床检验中心. 液体活检在临床肿瘤诊疗应用和医学检验实践中的专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(10):724-733.
- [62] UNGERER V, BRONKHORST A J, HOLDENRIEDER S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2020, 57(7):484-507.
- [63] DAWSON S J. Characterizing the Cancer Genome in Blood [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9(4):a026880.



- [64] JENNINGS L J, ARCILA M E, CORLESS C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(3): 341-365.
- [65] 李金明. 高通量测序技术[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 470-478.
- [66] GRAY J E, OKAMOTO I, SRIURANPONG V, et al. Tissue and Plasma EGFR Mutation Analysis in the FLAURA Trial: Osimertinib versus Comparator EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor as First-Line Treatment in Patients with EGFR-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(22): 6644-6652.
- [67] FIALA C, KULASINGAM V, DIAMANDIS E P. Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection [J]. *J Appl Lab Med*, 2018, 3(2): 300-313.
- [68] REMON J, CARAMELLA C, JOVELET C, et al. Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(4): 784-790.
- [69] TIE J, COHEN J D, WANG Y, et al. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(12): 1710-1717.
- [70] DIAZ L A, JR., WILLIAMS R T, WU J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers [J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 537-540.
- [71] AVANZINI S, KURTZ D M, CHABON J J, et al. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(50). DOI: 10.1126/sciadv.abc4308.
- [72] CROWLEY E, DI NICOLANTONIO F, LOUPAKIS F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(8): 472-484.
- [73] DAWSON S J, TSUI D W, MURTAZA M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13): 1199-1209.
- [74] DIAZ L A, JR., BARDELLI A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579-586.
- [75] LI B, PU K, GE L, et al. Diagnostic significance assessment of the circulating cell-free DNA in ovarian cancer: An updated meta-analysis [J]. *Gene*, 2019, 714: 143993.
- [76] KONG L, WANG L, WANG Z, et al. DNA methylation for cervical cancer screening: a training set in China [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 91.
- [77] RAZAVI P, LI B T, BROWN D N, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med* [J]. 2019, 25(12): 1928-1937.
- [78] 北京市临床检验中心, 北京医学会检验医学分会, 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京市医学检验质量控制和改进中心. 高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识(第一版肿瘤部分) [J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(9): 648-659.
- [79] 黄辉, 沈亦平, 顾卫红, 等. 临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(1): 1-8.
- [80] LI M M, DATTO M, DUNCAVAGE E J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(1): 4-23.
- [81] 中国临床肿瘤学会结直肠癌专业委员会, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组, 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2019, 34(5): 381-389.
- [82] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组, 中华医学会病理学分会分子病理学组. 同源重组修复缺陷临床检测与应用专家共识(2021版) [J]. *中国癌症防治杂志*, 2021, 13(4): 329-338.
- [83] SNYDER M W, KIRCHER M, HILL A J, et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin [J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 57-68.
- [84] COHEN J D, LI L, WANG Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test [J]. *Science*, 2018, 359(6378): 926-930.
- [85] LIANG N, LI B, JIA Z, et al. Ultrasensitive detection of circulating tumour DNA via deep methylation sequencing aided by machine learning [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(6): 586-599.

[收稿 2022-05-09][修回 2022-06-19][编辑 罗惠予/游雪梅]