

一、前言

高通量测序 (high-throughput sequencing, HTS) 即下一代测序 (next generation sequencing, NGS), 又称为大规模平行测序 (massively parallel sequencing, MPS)。相较于传统测序技术, 高通量测序单碱基检测成本较低、速度较快、一次可检测大量靶基因, 因而广泛应用于染色体非整倍体无创产前筛查、肿瘤靶向治疗基因突变检测、遗传性肿瘤检测、遗传病及罕见病检测、病原微生物及宏基因组检测、胚胎植入前遗传学筛查和胚胎植入前遗传学诊断等领域^[1]。

高通量测序操作步骤多、程序复杂, 分为"湿实验 (wet bench)"和"干实验 (dry bench)"两个阶段。"湿实验"包括样本预处理、核酸提取、基因组的片段化、建库、扩增、靶序列富集、混样、测序前准备及测序等; "干实验"包括测序后的数据质量分析、比对、变异识别、注释和结果报告与解释等环节。上述任一环节出现问题, 均会影响检测结果的准确性, 进而影响临床决策。为保障临床高通量测序检测结果的准确性, 在借鉴国内外相关指南、标准、规范和专家共识的基础上, 基于北京市高通量测序技术临床应用的现状, 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牵头起草了高通量测序技术临床检测规范化应用北京专家共识(第一版通用部分)。本共识中的声明内容为专家讨论并推荐的要点。

二、高通量测序实验室建设的总体要求

开展高通量测序临床检测的实验室应依据卫办医政发[2010]194 号文件《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》^[2], 通过省级卫生行政部门相应技术审核和登记备案后, 方可开展临床检测工作。

1. 实验室环境:

实验室需根据拟开展的检测项目数量、检测技术流程、测序平台和工作量大小来制定实验室分区设计的方案, 应保证有效通风, 以防止核酸提取、建库扩增过程中产生的核酸气溶胶所致的样本间交叉污染和既往扩增产物污染。实验室分区原则为"各区独立、注意风向、因地制宜、方便工作", 以达到"工作有序、互不干扰、防止污染、报告及时"的目的^[1]。实验室环境需注意通风、洁净度、温湿度、震动和光照等要求, 以保证仪器设备的正常运行和实验过程的稳定性。

【共识 1】实验室应有必要的分区设计, 通风充分, 以有效防止样本核酸提取及建库扩增等过程中产生的污染。实验室应具备满足测序仪等正常运行所必需的实验室洁净度、温湿度、防震和光照等条件。

2. 实验室安全:

实验室应制定适当的有关生物、化学、用电和消防等安全防护措施, 建立不同污染废弃物的处理制度, 实验室安全应符合国家相关法规或指南要求^[3,4]。

3. 实验室人员:

实验室应具有可满足开展检测要求的医学和生物学等专业人员, 包括实验室负责人或技术负责人、"湿实验"的操作人员、"干实验"的生物信息学分析人员、报告解读人员和信息系统相关人员等; 涉及到生殖、肿瘤、遗传病和罕见病等检测项目的实验室, 可根据需要配备遗传咨询人员; 使用实验室自建方法 (laboratory-developed tests, LDTs) 的实验室应配备试剂研发人员 (包括"湿实验"和"干实验"的研发人员)。实验室人员数量需满足开展项目及工作量的需求。实验室人员应获得国家要求的相应资质, 参加必要的外部培训和充分的内部培训。"湿实验"操作人员、"干实验"生物信息学分析人员和报告解读人员等需要通过人员能力评估后方可上岗。

【共识 2】实验室应配备获得国家要求的相应资质的专业人员 (如医师、技师和研究员等系列), 实验室负责人或技术负责人应有全面的高通量测序知识, 人员能力和数量应满足开展检测要求。

4. 试剂耗材：

实验室应优先选择国家药品监督管理局（National Medical Products Administration, NMPA）批准的试剂。如没有 NMPA 批准的试剂，在经过审核后，可采用 LDTs 试剂，所建立的 LDTs 试剂禁止商品化或在其他实验室使用。LDTs 有以下 3 种情况^[9]：（1）实验室通过购买或定制试剂原材料，如引物、探针、扩增缓冲液、酶等，建立检测和生物信息学分析流程；（2）未经批准的商品化试剂盒，如仅供研究使用的试剂；（3）实验室使用批准的商品化试剂盒，但是对其预期用途、试剂组分或操作流程进行了改变。LDTs 试剂在用于临床检测前，应进行性能确认，并形成试剂制备和使用的标准操作程序（standard operation procedures, SOPs）。每批试剂耗材使用前应进行质检，并保存相应记录。

【共识 3】实验室应优先选择国家药品监督管理局批准的试剂。如果没有国家药品监督管理局批准的试剂，审核后可采用经过全面的分析性能确认和必要的临床性能确认的 LDTs 试剂。

5. 仪器设备：

实验室应配备满足临床检测项目需求的仪器设备，例如超净台、生物安全柜、纯水仪、pH 计、离心机、移液器、冰箱、PCR 仪、超声打断仪、生物分析仪、高通量测序仪和服务器等。如果实验室进行确认实验，还需配备确认实验所需要的仪器，如 Sanger 测序仪、数字 PCR 仪等。实验室应建立仪器使用、维护和校准程序，并在日常工作中按照程序进行维护和定期校准，以保证仪器设备的正常运行，仪器设备维护和校准应保存相应记录。

【共识 4】实验室应配备满足开展高通量测序检测项目所需的仪器设备，建立仪器使用、维护和校准程序，并在日常工作中按照程序进行日常维护和定期校准，以保证仪器设备处于良好状况，正常运行。

三、高通量测序检测流程的建立与质量保证

（一）检测项目的选择

检测项目必须基于医学科学证据，有明确的临床预期用途，例如疾病风险分层、疾病筛查、疾病鉴别诊断或辅助诊断、治疗药物选择、预后判断、疾病活动性监测等。

【共识 5】实验室拟开展的高通量测序检测项目必须有明确的临床预期用途。检测申请单、结果分析、解释和临床决策必须基于医学科学证据。

（二）性能验证和性能确认及标准操作程序的建立

如果 NMPA 批准试剂可以满足实验室拟开展检测项目的临床预期用途，则实验室应优先选择 NMPA 批准试剂。实验室应在试剂指定的预期用途范围内，按照试剂说明书建立检测的标准操作程序，包括但不限于样本采集、运送和保存（如使用试剂说明书中指定的样本类型、采集容器、保存液，在要求的温度和时间内进行运输等）、检测过程操作程序（“湿实验”和“干实验”）、质量控制标准（如样本质量、文库质量、测序质量等）；如果试剂说明书中注明试剂性能的局限性，则实验室在建立分析后结果报告的 SOP 时，应考虑试剂局限性可能对临床产生的影响，根据不同情况建立检测策略（如确认实验）或者在结果报告和解释中进行充分说明。实验室使用已批准的高通量测序试剂开展临床检测服务前，必须进行性能验证。性能验证包括但不限于精密度、准确性、分析敏感性、分析特异性和可报告范围等^[6,7]。性能验证方案、检测过程和结果应保存相应的记录。如果实验室改变试剂指定的预期用途、试剂组分、操作流程，则按照 LDTs 试剂要求进行管理。

对于 LDTs 试剂，实验室应通过试剂方法建立和性能确认的过程，建立及完善检测系统、明确日常检测质量控制标准及关键点、形成检测操作全过程说明书（即分析前、分析中和分析后 SOPs）、建立试剂的分析性能指标以及明确检测局限性。LDTs 试剂应根据临床预期用途进行试剂方法的设计和优化，完成测序平台和生物信息学分析流程性能确认后，进行全面的分析性能确认和必要的临床性能确认。分析性能确认

包括但不限于精密度、准确性、分析敏感性、分析特异性、可报告范围等，临床实验室可根据不同检测项目，对采血管保存样本的有效性、甲醛固定石蜡包埋（formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE）样本的切片厚度及重复性、核酸提取的重复性、引物或探针设计的充分性和特异性、交叉污染等进行性能确认，性能确认的过程和结果应保存相应的记录。在确认分析性能特征可以满足临床预期用途后，最终建立“湿实验”试剂配制标准操作程序和“干实验”生物信息学分析流程，包括所有检测流程中使用的试剂组分、试剂原料的来源、试剂配制过程、探针捕获的区域、软件及版本、算法、数据库和质控对照品等；还需建立检测操作全过程（分析前、分析中和分析后）的 SOPs，包括但不限于样本采集、运送和保存，“湿实验”操作程序，“干实验”生物信息学分析操作程序以及结果报告和解释等^[8]。如果实验室检测不同类型样本，应分别对每种类型的样本进行性能确认，并建立包括试剂制备在内的检测体系相关 SOPs^[9]。由于 NGS 检测范围广，性能确认通常无法覆盖检测范围内的所有变异（或指标），需在后续的临床检测中持续补充未确认的变异。若发现性能确认不能完全满足预设的临床预期用途的情况，应修改分析性能指标和相应的 SOPs，并补充注明方法的局限性。

SOPs 建立后不可随意进行修改。如发现特定的 SOPs 存在需要修改完善的情况，应在一定程序下（如实验室负责人召集所有涉及该 SOPs 使用的人员进行讨论，并进行必要的验证后）进行修改。一旦 SOPs 中关键环节出现任何改变，则应视影响程度决定是否重新进行（全面或部分的）性能确认或者性能验证。当样本采集、样本质量、文库质量、测序质量未达到 SOPs 要求时，可进行让步检测，但应建立对应的异常情况处理程序。

NMPA 批准试剂通常对临床有效性已进行确认。实验室如使用 LDTs 试剂，应进行必要的临床有效性确认。如果在使用前未能证明检测的临床有效性（如辅助诊断、治疗药物及方法选择或监测、预后判断等），则只能根据临床指南建立结果报告和解释的 SOPs。临床预期用途为筛查的检测项目，必须在证明临床有效性（临床敏感性、临床特异性）和临床有用性（如阳性预测值、阴性预测值和费用等）的基础上，方可开展。

对所建立的实验室信息管理系统在使用前亦应进行必要的性能确认，如样本采集容器的条码的可追溯性，患者和项目申请医生的可追溯性，样本相关的信息（样本类型、检测要求、采集时间、送检时间等），样本条码及其可追溯性，检测中所使用的试剂、质控品和仪器设备等信息，检测信息，结果输入及检测报告的可追溯性等。

【共识 6】 实验室在使用 NMPA 批准试剂进行临床高通量测序检测前，应先进行分析性能验证。如使用 LDTs 试剂则应在测序平台和所建立的生物信息学流程性能确认的基础上，进行分析性能确认和必要的临床性能确认（临床有效性和临床有用性）。实验室应通过完成性能验证或性能确认，确立日常检测分析前、分析中和分析后全流程且包括关键环节质量控制参数的标准操作程序。

（三）检测过程的记录

实验室应对检测全流程进行记录，以保证临床检测结果的可追溯性。包括但不限于样本采集、样本接收、样本质检、文库构建、文库质检、测序上机、测序数据质量指标、检测结果、检测报告、异常情况处理等，记录需有相关人员的签名和时间，建议长期保存。实验室应尽可能建立信息系统进行记录的保存，并可通过患者或样本的唯一性标识进行查询。原始数据是重要的检测过程记录，FASTQ（样本测序数据格式）文件和二进制的比对文件（binary alignment map, BAM）至少保存 2 年，变异注释文件（variant call format, VCF）建议长期保存^[9]。原始测序数据的保存应保证数据的安全性，避免患者隐私泄露。实验室应建立 SOPs 文件，明确每种记录的保存时间和保存位置。

实验室应记录生物信息学分析中使用的软件和数据库的升级或版本更新，以保证生物信息学分析的可追溯性和检测结果的再现性。实验室应定义生物信息学分析整体流程的版本号，当软件更新时进行记录，对更新后的流程重新进行性能确认后并升级版本号，以便在检测记录中进行引用^[8]。

【共识 7】 实验室应对检测全流程进行记录, 保证记录对检测方法、仪器、试剂、操作者、关键环节质量控制参数和偏离 SOP 情况的可追溯性。对原始数据的保存应充分考虑数据的安全性。实验室应对生物信息学分析中软件和数据库升级进行记录, 以保证生物信息学分析的可追溯性和检测结果的再现性。

(四) 室内质量控制

实验室在日常检测中应进行室内质量控制。建议与临床样本同批检测弱阳性、阴性质控品和无模板对照(如水样本)^[9], 理想的弱阳性质控品应接近检测下限。实验室可采用多个含有不同阳性结果(如不同变异、不同染色体异常)的质控品, 并在日常检测中轮流使用。实验室可根据检测项目和检测平台制定相应的可接受的质控标准。质控标准至少应符合以下要求: 如果弱阳性质控品未检出, 判为失控; 阴性质控品检出阳性, 判为失控。无模板对照中应包含在所有的扩增步骤中, 如在文库质控环节中出现目的片段, 说明检测操作过程中出现了核酸的交叉或遗留污染, 判为失控。如果质控品的检测结果与预期相符, 说明结果可信, 报告可以发出; 反之, 就要对这种情况出现的原因进行分析。在找不到合理解释的情况下, 需要重新检测样本。实验室应保存室内质控相关记录。临床样本是理想的质控品, 如果样本来源有限, 难以获得, 可以采用模拟样本作为质控品。自制质控品应有质控品制备和验证的程序和记录。

实验室还可阶段性统计日常检测中的指标, 例如样本提取的失败率、文库构建失败率、样本阳性率和阴性率、检测失败率等, 可动态监测检测体系中可能存在的问题。

【共识 8】 实验室在日常高通量测序检测中应将弱阳性、阴性和无模板对照(如水样本)等质控品与临床样本同批进行检测, 以监测实验室日常检测的重复性和再现性及当批临床样本检测的有效性。此外, 还可通过分析每批及一定时间内的临床样本中出现阳性和阴性结果的频率, 发现潜在的失控。一旦出现失控, 应分析失控原因, 并采取相应的纠正措施和预防措施。

(五) 室间质量评价或能力验证

实验室应通过定期参加室间质量评价(external quality assessment, EQA)或能力验证(proficiency testing, PT)来评估实验室检测能力, 发现问题, 并采取措施加以改进。如该项目未开展 EQA/PT, 可和外部实验室进行实验室比对。EQA/PT 结果不合格或实验室比对结果不符合的, 应当分析原因, 从而提出有效的纠正措施进行改正, 防止同样的问题再次发生。实验室应保存 EQA/PT 相关记录。

【共识 9】 实验室应定期参加室间质量评价/能力验证或实验室间比对, 一旦发现结果可比性或准确性存在问题, 需分析并明确问题的原因, 并采取纠正措施和预防措施。

(六) 结果报告和解释

1. 检测报告:

检测报告单的内容应包括但不限于(1)患者基本信息: 如患者姓名、性别、年龄、临床信息等; (2)样本信息: 如样本采集时间、样本类型、样本唯一编号、送检时间、检测时间、报告时间等; (3)检测信息: 如试剂、仪器、检测方法、检测范围、检测下限等; (4)结果报告: 如检出的基因型、变异结果、染色体异常; (5)结果解释: 如致病性分级、药物信息及相关的临床意义、必要的参考文献等; (6)实验室信息: 如实验室名称、联系方式、检测者、报告审核者等; (7)检测方法的局限性: 检测方法在样本检测中存在的局限性或不确定结果的可能性; (8)其他: 如进一步检测的建议, 检测过程中异常情况的说明(如质量值不符合要求)等^[10,11]。

检测报告应准确, 基因和变异可参考 HUGO 基因命名委员会(HUGO gene nomenclature committee, HGNC, <http://www.genenames.org>)、人类基因组变异学会(Human Genome Variation Society, HGVS, <http://www.hgvs.org>)等建议进行报告。

检测报告应具有可追溯性。实验室应参照相关指南或共识建立报告解读的 SOPs^[12,13,14]。根据实验室的预期用途, 在 SOPs 中明确变异分级的流程, 包括采用分级证据的来源(数据库、文献)、根据证据进

行分级的评分方法和规则；明确报告单上体现何种级别的变异（或阳性结果）。实验室应遵循该 SOPs，在日常检测中对变异分级过程进行记录，包括采用的功能分析软件、文献、数据库、数据库查询日期、数据库提供的证据等，以保证变异分级结果的可追溯性。

2. 结果的解释：

实验室结果解释应准确、及时、充分地描述检测结果对患者疾病诊疗的意义。（1）实验室应在基于医学科学证据的基础上，提供正确和有依据的解读，证据有记录、可追溯；（2）实验室应当对数据库及时更新，并记录更新时间；（3）实验室应当在临床需要的情况下，尽可能提供充分的信息、证据和解读。如果仅提供部分解读，应基于一定的程序和原则，并且在报告中进行说明。

【共识 10】 实验室应保证高通量测序检测结果报告的充分性（患者及其样本相关信息、检测相关信息、检测实验室信息、结果及其临床意义、局限性等），准确性（基因名称、靶向或免疫治疗药物等相关的指南或其他文献及网址等）和可追溯性（变异解读的依据）。为临床医生和患者准确、及时、充分描述检测结果对特定疾病诊疗的意义。

四、总结

本共识仅对高通量测序的通用情况进行阐述。该共识将适时修订，以适应 NGS 临床规范化应用的需求。

委员会成员

项目主持者（按姓氏汉语拼音排序）：李金明（国家卫生健康委临床检验中心）；贾玫（北京大学人民医院检验科）；王清涛（北京市临床检验中心，首都医科大学附属北京朝阳医院检验科）

执笔者（按姓氏汉语拼音排序）：樊高威（北京市临床检验中心，首都医科大学附属北京朝阳医院检验科）；刘文彬（Illumina 中国）；孟雪红（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）；田婵（北京大学第三医院生殖医学中心）；王威（深圳华大智造科技有限公司）；魏星（北京华诺奥美医学检验实验室有限公司）；张瑞（国家卫生健康委临床检验中心）；张秀艳（南京世和基因生物技术有限公司）

共识制定专家组成员（按姓氏汉语拼音排序）：崔巍（中国医学科学院肿瘤医院检验科）；黄杰（中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所）；惠汝太（中国医学科学院阜外医院心血管内科）；贾淑芹（北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所分子诊断中心）；蒋宇林（中国医学科学院北京协和医院产科）；田婵（北京大学第三医院生殖医学中心）；王静敏（北京大学第一医院儿科）；吴焕文（中国医学科学院北京协和医院病理科）；徐国宾（北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所检验科）；应建明（中国医学科学院肿瘤医院病理科）；张瑞（国家卫生健康委临床检验中心）；张括（国家卫生健康委临床检验中心）；赵屹（中国科学院计算技术研究所）；周洲（中国医学科学院阜外医院检验科）

致谢 南京世和基因生物技术有限公司；深圳华大智造科技有限公司；Illumina 中国；赛默飞世尔科技（中国）有限公司；北京华诺奥美医学检验实验室有限公司

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

五、参考文献

- [1] 李金明.高通量测序技术[M].北京：科学出版社，2018.
- [2] 中华人民共和国卫生部办公厅.卫办医政发[2010]194 号医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[S].2010-12-06.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会.CNAS-CL36 医学实验室安全认可准则[S].2007-04-16.
- [4] 中华人民共和国卫生部.医疗卫生机构医疗废弃物管理办法[S].2003-10-15.
- [5] United States, Office of the Federal Register.Code of federal regulations, title 42 [M]. Regulations Press,2015.

- [6] RehmHL, BaleSJ, Bayrak-ToydemirP,et al. **Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing** [J]. Genet Med, 2013,15(9):733-747. DOI:[10.1038/gim.2013.92](https://doi.org/10.1038/gim.2013.92).
- [7] GargisAS, KalmanL, BerryMW,et al. **Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice**[J]. Nat Biotechnol,2012,30(11):1033-1036.DOI:[10.1038/nbt.2403](https://doi.org/10.1038/nbt.2403).
- [8] AzizN, ZhaoQ, BryL,et al. **College of American pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests**[J]. Arch Pathol Lab Med, 2015, 139(4):481-493. DOI: [10.5858/arpa.2014-0250-CP](https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0250-CP).
- [9] New York State Department of Health. Next generation sequencing(NGS) guidelines for somatic genetic variant detection[M]. New York: New York State Department,2015.
- [10] BeanL, Bayrak-ToydemirP. **American college of medical genetics and genomics standards and guidelines for clinical genetics laboratories** [J]. Genet Med, 2014,16(12): e2. DOI: [10.1038/gim.2014.146](https://doi.org/10.1038/gim.2014.146).
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality management for molecular genetic testing, approved guideline. CLSI document MM20-A[S]. Wayne, PA:CLSI,2014.
- [12] RichardsS, AzizN, BaleS,et al. **ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology** [J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424. DOI: [10.1038/gim.2015.30](https://doi.org/10.1038/gim.2015.30).
- [13] LiMM, DattoM, DuncavageEJ,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):4-23DOI:[10.1016/j.jmoldx.2016.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002).
- [14] GreenRC, BergJS, GrodyWW,et al. **American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing**[J]. Genet Med,2013,15(7):565-574. DOI:[10.1038/gim.2013.73](https://doi.org/10.1038/gim.2013.73).