

前言

随着个体化医学的发展和“精准医学”概念的提出，肿瘤药物治疗发展迅速，临床研究逐渐发现并证实更多与药物治疗疗效预测相关的基因突变^①。传统的基因突变检测方法如 Sanger 测序、焦磷酸测序和实时荧光 PCR 等仅能对单个基因，或者单个基因的部分外显子突变进行检测，采用上述传统基因突变检测方法同时检测多个基因，一则需要的样本量大，其次需要更长的检测时间和更大的工作量。高通量测序 (HTS) 即下一代测序 (NGS)，能够同时对上百万甚至数十亿个 DNA 片段进行测序，可实现在较低的成本下，一次对多至上百个肿瘤相关基因、全外显子以及全基因组进行检测，而且需要的样本量并不增加。因其在通量、成本和效率方面的优势，NGS 在实体肿瘤体细胞基因突变中展现了其广阔的应用前景^②。

NGS 检测流程复杂，对实验室环境条件、人员能力及质量管理要求高。前期，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制定了《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）》（以下简称“通用共识”）^③。实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测中，低频突变、肿瘤异质性、样本种类多样、样本质量差别较大等均给实验室检测带来了挑战，因此其在方法建立、分析前、中、后质量控制等方面均有其特殊之处。为规范实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测，在借鉴相关指南、规范及权威发表的文献基础上，专家组又起草了《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）》。本共识中的声明内容为专家讨论并推荐的要点。

实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测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》，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。实验室环境条件（如通风、温湿度、洁净度和防震要求等）、实验室人员的专业知识和能力、试剂耗材的质检、仪器设备配备与维护校准等应满足“通用共识”的要求^④。

一、实验室分区

实验室分区在满足“通用共识”要求的基础上，同时考虑肿瘤基因突变 NGS 检测的特点，根据项目、测序平台、检测技术流程、样本类型和样本量等进行合理设置。实体肿瘤体细胞基因突变检测通常分析敏感性较高，以单核苷酸变异 (SNVs) 为例，肿瘤组织和血浆样本分别能够检出突变等位基因百分比低于 5% 和 1% 的 SNVs，因此开展实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测的实验室应尤其注意对实验室进行合理分区，以防止污染。以杂交捕获法 NGS 为例，建议分区考虑以下方面：“试剂准备区”是最洁净的区域，应独立成区；福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本需要设置“样本制备前区”，进行样本的切片，注意该区域不要与常规病理检测区域共用；“样本制备区”用于样本 DNA 提取；组织或细胞 DNA 样本如通过超声打断进行片段化处理，在有条件的情况下建议实验室单独设置“打断区”；DNA 片段分析如采用琼脂糖凝胶电泳，可以单独设置“电泳区”；“文库制备区”用于打断后的 DNA 加 A 尾、加接头、标签等；“扩增一区”进行文库的预扩增和纯化等；“杂交捕获区”进行序列的捕获、富集和纯化；“扩增二区”进行文库的扩增、定量和混合；“测序区”完成高通量测序。

不同检测流程，其分区设置有所不同，实验室应根据“通用共识”的“32 字原则”来考虑实验室分区设置。如果实验室采用多重 PCR 捕获，在扩增的同时进行捕获，则根据检测流程可以考虑某一扩增区和捕获区域合并；如果采用的片段化方式是酶消化，则无需设置“打断区”，可以和“文库制备区”共用；如果使用生物分析仪对提取核酸进行片段分析，无需单独设置“电泳区”，可以和“文库制备区”共用；血浆提取的循环肿瘤 DNA (ctDNA) 如直接建库，无需设置“打断区”。若使用自动化建库的设备，在确认不产生交叉污染的前提下，可适当合并某些区域。若实验室同时开展组织或细胞学样本基因组 DNA 和 ctDNA 检测时，因为两类样本的测序深度及检测限有较大差别，为避免高浓度组织核酸对低浓度 ctDNA 的污染，需要设置不同的样本制备区和文库制备过程中所涉及的相关区域。

【共识 1】 实体肿瘤体细胞突变检测通常分析敏感性较高，临床实验室应尤其注意合理分区，以防止污染。杂交捕获法 NGS 建议的分区包括试剂准备区、样本制备前区、样本制备区、打断区、电泳区、文库制备区、扩增一区、杂交捕获区、扩增二区和测序区。但是不同检测流程，分区设置有所不同，临床实验室应根据“通用共识”的“32 字原则”来考虑实验室分区设置。若实验室同时检测血浆和组织或细胞学两类样本，则需设置不同的样本制备区及其后续的文库制备过程中的相应区域。

二、实验室人员及能力要求

实验室应具有可满足开展检测要求的相关专业人员，包括实验室负责人或技术负责人、“湿实验”的操作人员和“干实验”的生物信息学分析人员、遗传咨询人员（必要时）和信息系统建立及管理相关人员等，所有人员均需持续接受岗位相关的培训，并定期进行内部的能力评估^[3]。NGS 实验室负责人或技术负责人应有全面的 NGS 及其实验室质量管理知识，对所开展的 NGS 检测项目及其质量保证关键环节具有清晰的认识。“湿实验”操作人员应具有完成实验操作的能力，采用组织样本进行检测的实验室，还应包含病理医（技）师人员，制备组织切片进行 HE 染色，并能对切片中肿瘤组织的坏死情况、肿瘤细胞的含量和数量进行评估^[4]。生物信息学分析人员团队除需熟练掌握肿瘤基因突变 NGS 检测原理及常用软件外，还应配备具有临床肿瘤学和临床分子检测基本知识的人员。签发报告人员应具备医学分子生物学和临床肿瘤学知识背景，能够熟练使用肿瘤基因相关数据库，掌握相关临床诊疗指南，了解肿瘤靶向和免疫治疗药物及其相关肿瘤基因突变研究的最新进展。对于疑难病例或必要时，可由相关临床医生、病理医生、影像医生、医学遗传学家、肿瘤突变分子检测人员、相关的实验室其他人员、相关药师等来自不同专业的专家组成分子肿瘤专家组（MTB），依据基因突变检测结果，结合患者状况、临床表现、病理和影像学检查结果等，经充分讨论后，给出合理的个体化精准治疗方案^[5]。使用实验室自建检测（LDTs）的实验室，应配备“湿实验”和“干实验”研发人员，具备“湿实验”和“干实验”方法建立、优化和性能确认的能力。其中生物信息学分析人员具有搭建序列比对、突变过滤、临床意义及靶向用药类、突变注释类以及本实验室内肿瘤基因突变临床有效性等的数据库的能力。

【共识 2】 NGS 实验室负责人或技术负责人应有全面的 NGS 及其实验室质量管理知识。采用组织样本进行检测的实验室，“湿实验”团队成员应包括病理医（技）师人员。生物信息学分析团队中应有具备临床肿瘤学和临床分子检测基本知识的人员。签发报告人员应具备医学分子生物学和临床肿瘤学知识背景，熟练使用相关数据库，掌握本领域的指南，了解相关研究的最新进展。对于疑难病例或必要时，可由不同专业的专家组成的分子肿瘤专家组给出个体化治疗方案。使用 LDTs 的实验室，应配备“湿实验”和“干实验”研发人员，其应具有正确设定肿瘤体细胞突变 NGS 检测临床预期用途、建立检测系统（含试剂配制和生物信息分析流程搭建等）及其使用 SOPs 以及完成 LDTs 性能确认的能力。

肿瘤基因突变 NGS 检测流程的建立与质量保证

实验室可选择国家药品监督管理局（NMPA）批准的试剂盒，使用前应进行分析性能验证；如没有可用的批准试剂，或对批准试剂根据研究及临床诊疗指南进展进行了修改，即可设计建立 LDTs。使用 LDTs 进行 NGS 检测的实验室，在建立检测流程前，应首先明确拟开展的 NGS 检测项目的临床预期用途，确定合适的检测基因及其突变^[6,7]，建立并优化“湿实验”和“干实验”分析流程，并对测序平台、生物信息学分析流程分别进行性能确认，最后对检测方法进行全面的分析性能确认和一定的临床性能确认（适用时）^[8,9]。

一、临床预期用途

检测项目必须基于医学科学证据，有明确的临床预期用途。实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测的临床预期用途是用于药物疗效预测，即通过体细胞基因突变检测选择可能在靶向或免疫治疗药物中受益的患者以及监测耐药的出现^[10]。临床预期用途的叙述中应包括但不限于适用人群、样本类型、检测基因及其突变位点或突变类型和检测的临床意义^[7]。原则上，建议选择医学科学证据支持的、临床意义明确或有潜在临床意义的基因进行检测。如果检测的临床意义是伴随诊断，预期用途中必须明确伴随诊断的药物和每种药物

对应的实体肿瘤患者人群。如果是非伴随诊断，预期用途中必须说明检测项目为非伴随诊断，由临床医生根据相应的疾病诊疗指南选择治疗药物。

二、NGS 方法学建立及其关键环节的优化

实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测方法的建立与优化涉及分析前的样本采集、运送、保存及处理；分析中的“湿实验”（引物或探针设计及合成、核酸提取、文库制备、上机测序）和“干实验”即生物信息学分析流程等检测全过程；分析后的结果报告及解读、信息贮存及传递和保密（实验室信息管理系统）以及临床有效性数据的收集等。此外，实验室需设计体细胞基因突变的识别策略，无论是是否采用肿瘤组织与该患者正常组织或白细胞进行配对检测，都需要确认检测方法是否能有效区分体细胞突变和胚系突变。

1. 待测基因位点的选择：

需根据检测目的，依据医学科学证据选择待测基因位点。如美国 FDA 根据基因位点的临床意义等级将肿瘤基因突变 NGS 检测分为 3 个等级^[11,12]：第一级为肿瘤的伴随诊断（CDx），为安全有效使用治疗药物所进行的必要检测，所测的基因位点具有明确的分析有效性和临床有效性，如 EGFR、ALK、BRAF 突变检测；第二级为专业指南推荐的具有显著临床意义的基因位点，其分析有效性和临床有效性可通过临床试验、指南或已发表的文献证实，如用于肿瘤突变负荷（TMB）和微卫星不稳定性（MSI）的检测；第三级为除第一、二级以外的，具有潜在临床价值的基因位点，已有基础或临床研究显示其临床意义，此类检测有可能用于临床试验受试者的筛选。检测基因盘（以下简称 panel）的大小决定了测序成本、实验室检测工作量以及分析和临床解释的复杂性，实验室应合理选择基因和 panel 大小。如用于指导初诊患者用药治疗时，可选用第一级的基因位点，检测 panel 较小；靶向治疗耐药监测或免疫治疗疗效预测，则可设计泛癌种的 panel，选择包括第一级、第二级和第三级的基因位点，检测 panel 通常较大^[13,14]。

NGS 检测的基因突变类型包括 SNVs、小的缺失和插入、拷贝数变异（CNAs）、结构变异（SVs）如基因融合^[14]。实验室应根据拟检测的基因突变类型和位点，确定基因 panel 内每个基因的覆盖范围，如拟检测整个基因水平上的 CNAs 时，需要覆盖所有外显子区域，甚至向非编码区延伸以保证准确性；若检测基因融合时，可选择杂交捕获的方法进行 DNA 测序或是 RNA 测序，融合基因的断点位置通常位于非编码区域，并且很少具有聚集性，若使用 DNA 测序，检测 panel 需要覆盖最常见的内含子/外显子、或者整个基因^[14]。微卫星（MS）是遍布人类基因组中的短串联重复序列，由 1~6 个碱基的序列重复构成^[15]，在探针设计时可优先考虑单碱基重复，如果单碱基重复不佳，可对双/多碱基单元重复进行严格筛选后纳入^[16]。用于检测 MSI 的 panel，需要保证有足够的 MS 位点数，目前文献报道的 MS 位点数已达到数千个^[17,18,19]。在对 TMB 进行检测时，最理想的方法是全外显子测序^[20]，也可使用靶向测序，测序 panel 的大小影响 TMB 检测的准确性，文献报道 panel 大小位于 1 Mb~39 Mb 之间^[21]，检测前应利用全外显子测序的数据对 panel 的编码区范围进行 TMB 分析的饱和度评估^[22]。使用扩增子法进行建库时还需要重点考虑引物的扩增效率、扩增子密度等，以保证检测的重复性和再现性。

2. 核酸提取的建立和优化：

实验室需根据待检样本类型选择核酸提取试剂，不同样本类型对核酸提取试剂要求不同，实验室可使用商业化的提取试剂盒、设备或已经过确认的自建核酸提取方法。使用前，应对拟采用的试剂或设备进行评估，评估是否适用拟检测的癌种和样本类型。如肿瘤患者血浆样本中含有的游离 DNA 以主峰在 140~170 bp 的小片段为主，而且浓度很低，与组织和细胞样本中提取的人基因组 DNA 有很大不同。因此，实验室需确认核酸提取的重复性、提取效率、提取纯度及不同大小核酸片段提取的偏好性（必要时）等方面。

NGS 检测所需的核酸量与测序平台、panel 大小以及文库富集方法有关^[23]，核酸质量是决定检测成功的关键因素。使用 FFPE 提取 DNA 时，若 FFPE 保存年限过长，DNA 中胞嘧啶脱氨基转变为尿嘧啶，PCR 扩增后 C>T 现象较为严重，可以通过尿嘧啶 DNA 糖基酶（UNG 酶）或 5-甲基胞嘧啶 DNA 糖基化酶（5-

methylcytosine DNA glycosylase) 处理 DNA 以降低检测的背景噪音^[14]。使用血浆样本进行 ctDNA 提取, 可通过 PCR 法分析 ctDNA 的片段分布, 来监测是否受到基因组 DNA 的“污染”^[24]。

3. 文库制备的建立和优化:

文库制备步骤较多, 接头与样本 DNA 片段的连接效率、PCR 反应体系(聚合酶、引物、缓冲液和扩增反应条件等) 均可能影响文库的质量, 此外, 实验室还可在 PCR 扩增前, 使用特异分子标签(UMIs 或 UMD) 标记技术, 以便于准确识别天然重复序列, 区分低频突变和检测过程中引入的错误^[25,26]。实验室需确认文库制备流程可以产生满足检测要求的文库(文库浓度、文库片段大小等), 评估交叉污染发生率, 必要时通过特异双端标签建库策略以及合适的生物信息学分析流程降低污染^[27]。

4. 测序平台的性能确认:

实验室应优先选择 NMPA 批准的测序平台, 并根据所选定的基因 panel, 并综合考虑测序通量、测序数据准确度、可支持读长、运行时间、测序成本等选择测序平台型号。对已知不同突变类型的样本进行检测, 建立测序平台检测不同突变类型的性能指标(如精密度、准确度), 并明确所用测序平台是否满足临床预期用途^[9,13]。

5. 生物信息学分析流程的搭建与性能确认:

在生物信息学分析流程搭建和优化过程中, 实验室应确定测序深度和阳性判断值(cut-off)。测序深度和阳性判断值密切相关, 即适宜的测序深度需在已知阳性判断值的前提下方可确定; 而合理的阳性判断值也需在一定的测序深度条件下明确。实验室应根据所检测的突变类型, 选择合适的算法和软件, 提高对肿瘤基因突变检测的敏感性。不同软件或算法识别某种变异类型的能力有所不同, 应采用多种算法, 以提高不同突变类型的检出准确率^[28]。另外还应建立完善包括数据质控与过滤、数据比对、变异识别和变异注释在内的生物信息学数据分析流程、软件及数据库^[29]。

生物信息学分析流程建立后, 实验室应对其进行性能确认, 并建立数据分析质量标准, 包括但不限于最低测序深度、平均测序深度、覆盖均一性、GC 含量、碱基识别质量值、比对质量值和在靶率等。(1) 测序深度: 测序深度与拟定的基因 panel 临床预期用途、文库的复杂性和测序成本等因素相关^[30]。实验室可根据相关文献、统计学方法(如功效分析、二项式分布)或工作经验, 估算测序深度^[14,31]。也可先用较高的测序深度进行测序, 通过数据抽样, 分析部分原始测序数据来模拟不同的测序深度^[32]。通过分析在不同测序深度条件下, 不同突变频率(包括检测限)的阳性样本检出率而确定。(2) 阳性判断值: 阳性判断值用于区分阴阳性结果, 实验室应清楚证明阳性判断值设定的依据。如果实验室检测不同突变类型, 则需要分别说明每一种突变类型阳性判断值设定的依据。有文献通过检测一定数量的阴性临床样本(如 FFPE 样本)或正常细胞系(如 HapMap 细胞系 NA12878), 统计分析各个基因位点的 reads 数和标准差, 并以 reads 数加上 3 倍的标准差作为暂定的阳性判断值^[33]。也有文献报道通过检测一定数量的阴性和阳性样本, 采用统计学方法如 ROC 曲线或 PR (precision-recall) 曲线来确定合适的阳性判断值^[30,34]。

当生物信息学分析流程经过上述过程建立完成后, 需对其进行性能确认以进一步优化。性能确认的样本可为: (1) 临床样本的测序数据。对临床样本进行 NGS 全流程检测后得到的测序数据是最重要的性能确认样本; (2) 计算机模拟的测序数据。如通过 Varsim、BAMSurgeon 或 Mutationmaker 等软件对已有样本的测序数据再编辑后产生的测序数据; (3) 参考物质(如 Hapmap 的细胞系 NA12878、NA19240、NA18507 或商品化参考物质)的测序数据。计算机模拟和参考物质的测序数据只能作为补充数据, 不能完全替代临床样本测序数据^[35]。性能确认的指标包括精密度、准确度、分析敏感性、分析特异性和可报告范围等^[35]。

【共识 3】 实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测的临床预期用途为通过体细胞基因突变检测选择可能在靶向或免疫治疗药物使用中受益的患者以及耐药监测。临床实验室应在预期用途中包括但不限于适用人群、样本类型、检测基因及其突变位点或突变类型和检测的临床意义等。在 NGS 方法学建立和优化阶段, 实验室需根据临床预期用途, 选择具有临床意义的待测基因位点; 优化核酸提取方法, 所提取核酸的质量

应满足检测要求；建立和优化文库制备方法；对测序平台进行性能确认，建立测序平台检测不同突变类型的性能指标；搭建和优化生物信息学分析流程，确定测序深度和阳性判断值，并对生物信息学分析流程进行性能确认。

三、性能验证或性能确认

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。实验室使用已批准的 NGS 试剂开展临床检测服务前，必须进行性能验证。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 LDTs 试剂要求进行管理。如所用试剂为 LDTs，在临床检测前需进行检测系统（包含人、机、料、法、环等）的分析性能确认^[8]。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。以下将分析性能确认和分析性能验证统称分析性能评价。

进行分析性能评价的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^[36]。其中，精密度是指同一样本在多次检测中结果的一致程度，包括重复性和再现性两个方面。重复性指在同一条件下（相同环境、相同操作人员、相同检测流程、相同仪器）进行多次测量同一序列，测定结果的一致程度。再现性指由不同操作人员、不同仪器（相同型号）和不同批试剂进行同一序列测量结果的一致性程度^[6]。准确性指测定检出的序列与参考序列的一致性程度。对准确性的评价可通过两部分进行。一是通过检测已知序列的人基因组 DNA（如标准细胞株），来评价测序本身的准确性。如果为疾病相关的多基因或全外显子测序，可只评价靶向区域的测序结果。测序的准确性可通过碱基的正确率来表示；二是通过检测临床样本进行验证，包括含有疾病相关突变的样本和含有与待检突变相同突变类型的样本，评价范围应包括具有明确临床意义的位点，较难测序或比对的区域、不同 GC 含量的区域等^[6,14]。可将 NGS 与另一已经过确认的方法同时检测临床样本来评价，比较 NGS 与另一方法之间结果的差异，不一致的结果再用第三种方法进一步确认，通过阳性符合率（PPA）和阴性符合率（NPA）来评价定性测定的准确度^[14]。检测点突变、短片段缺失和短片段插入的比较方法可以采用 Sanger 测序、等位基因特异性 PCR 等；检测拷贝数变异的比较方法，可以采用实时荧光定量 PCR、荧光原位杂交（FISH）等；基因融合可以采用 FISH、实时荧光 PCR 等方法作为 NGS 检测的比较方法。分析敏感性，这里指 LoD，通常使用 LoD_{95%}表示，即有 95%的可能性能够正确检出突变位点的最低等位基因百分比^[8]。通常采用已知突变等位基因百分比的样本，用另一基因组 DNA（或游离 DNA）混合稀释来进行评价。实验室需建立不同突变类型和不同样本类型的 LoD_{95%}。分析特异性是评价样本中的同源序列或其他交叉反应的序列和内源及外源干扰物质对检测结果的影响^[6,37,38,39]。干扰物质即可能对检测结果产生影响的物质，内源性的如黑色素、血红蛋白等；外源性的如标本处理过程中加入的乙醇、蛋白酶 K、加入的标签等。此外，在准确性确认中，可部分确认可报告范围，实验室在日常检测中，应对可报告范围持续关注和确认。

用于性能评价的样本最理想的是与检测范围内肿瘤类型、样本类型和组织来源相同的临床样本^[40]。特别是预期将来临床应用检测的样本类型，是最佳的选择。如果临床实验室可接受多个样本类型，那么对每种样本类型均需分别进行性能确认。未经分析性能评价的样本类型应被视为无法准确检出的样本。没有足够的、能代表各种突变类型、并且有适合浓度的临床样本，可以使用类似的模拟样本来代替。如 FFPE 样本可以部分使用细胞系或人基因组 DNA 样本；如血浆样本可以使用模拟游离 DNA 样本等；但不能完全代替临床样本^[41]。实验室可通过福尔马林固定和石蜡包埋，将细胞系制备成 FFPE 样本以模拟临床样本^[14,42]。

对每种突变类型或样本类型进行分析性能确认时，所用的样本量需达到统计学意义。有文献建议进行精密度性能确认时至少需 3 例样本，进行准确性评价时应至少检测 59 例样本，进行 LoD_{95%}评价时至少需要进行 60 次检测，若无法获得足够的检测次数，则应在后续临床检测中设置弱阳性质控，以保证能准确检测位于 LoD 的突变^[14,43]。检测 FFPE 样本时，由于 DNA 质量可能不高，实验室需增加性能确认的样本量，以保证低质量样本检测结果的可靠性^[14]。若某种突变类型（如大片段的缺失、结构变异、拷贝数变异等）的样本不易获得，实验室无法短时间内获得足够的样本进行性能确认，则应按 NGS 无法准确检出的位点对

待，需使用其他方法（如 PCR 法、Sanger 测序法或杂交芯片法等）对这类位点的阳性结果进行确认，或在 NGS 的检测报告中注明检测的局限性^[4]。

分析性能确认需明确分析前、分析中、分析后涉及影响检测结果的关键质量控制参数如肿瘤细胞含量、文库构建所需的 DNA 量、文库片段分布、文库浓度、最低测序深度、平均测序深度、覆盖均一性、符合要求质量值的碱基百分比（如 Q30 百分比）等及检测的局限性，最终完成建立“湿实验”试剂配制和“干实验”生物信息学分析流程 SOPs，包括采血管（如适用）、核酸提取试剂、合成相应的引物探针、文库制备试剂、通用测序反应试剂、仪器、质控品、软件/算法及其版本、分析参数、质量标准、数据库等。所有日常检测中均需全员严格遵循，不得随意改变。若试剂、软件及其版本、参数和数据库发生改变，实验室应根据影响程度进行全流程或部分检测环节的重新分析性能确认。实验室在进行分析性能确认过程中，若发现重要区域的测序质量值无法达到预定的可接受范围，实验室需继续修改、优化检测体系，或是将其从可报告范围中删除^[40]。对于预期用途为伴随诊断的 NGS 检测，还需进行临床性能确认和临床有用性评价^[41]。临床性能确认的指标包括适用人群中的临床敏感性、临床特异性^[44,45]。实验室需结合预期用途和患者临床资料（如病理检查、影像学检查或临床发现）进行临床性能确认指标分析^[41]。单个实验室若无法通过本实验室的检测样本统计临床性能指标，可以通过检测无疾病人群获得临床特异性的指标。此外，还可以根据相关文献，建立临床性能指标^[41,46]。

【共识 4】 使用 NMPA 批准的 NGS 试剂进行检测前应进行分析性能验证；LDTs 试剂应根据临床预期用途进行试剂方法的设计和优化，至少要对体细胞基因突变的识别策略、样本前处理、核酸提取、文库制备、靶向捕获、高通量测序平台、生物信息学分析、测序深度和阳性判断值等环节进行确认。在完成试剂方法的设计和优化后，实验室应对 LDTs 检测的全流程进行整体的性能确认。分析性能确认应至少证明 NGS 对各种不同突变类型的检测能力，证明对重要常见基因的检测能力。如果临床实验室可接收多个样本类型，那么对每种样本类型均需分别进行性能确认。没有足够的临床样本，可以使用模拟样本来代替。分析性能确认包括但不限于精密度、准确度、分析敏感性、分析特异性和可报告范围等。在确认分析性能特征可以满足临床预期用途后，最终完成建立“湿实验”试剂配制和“干实验”生物信息学分析流程 SOPs。对预期用途为伴随诊断的 NGS 检测需进行临床性能确认。性能评价应包含检测范围内样本类型和突变类型。通过性能评价，建立性能参数，明确检测的局限性。若实验室流程发生改动，需根据对检测的影响进行全面或部分性能确认。

四、实验室检测 SOPs 的建立

实验室应对检测操作全过程建立具有可操作性的 SOPs，并在日常检测中对检测全流程进行记录，以保证检测结果具有可追溯性。

（一）分析前

在分析前阶段，为保证临床医生能为患者开具正确的检测申请单以及采集到符合质量要求的样本，实验室需提前告知临床医生有关 NGS 检测的临床预期用途和适用症、检测方法及其性能、检测的局限性、样本采集运输和预处理的注意事项以及报告周转时间等。临床医生应为患者提供必要的分析前咨询，使其知情同意。为能使实验室对检测申请单的合理性进行审核，送检申请单应包含必要的信息，包括采样相关信息（包括样本类型、采样部位、采样时间等）和相关的临床信息（包括疾病诊断、疾病分期分型、治疗情况）等^[46]。此外，实验室还需建立分析前质量指标（如样本不合格率、样本容器错误率、检测申请单错误率等），监控分析前关键环节的质量^[47]。

可用于实体肿瘤体细胞基因突变检测的样本类型包括 FFPE 样本、新鲜组织、血浆、胸腹水等。实验室应对样本的采集容器、采样量、保存及运送条件、预处理方式等进行确认，保证样本质量，避免交叉污染。应制定样本采集 SOPs，明确样本接收和拒收标准，建立合适的样本运输和保存要求。对于不满足样本接收标准，无法重新取样，但又有检测需求的特定样本，可在实验室主任或相关负责人同意以及与临床医生充分沟通并同意的情况下，实施让步检测，并在结果报告中进行风险提示和免责声明。

1. FFPE:

为保证核酸的质量,手术或活检组织应在离体 10 min 内浸入 10%中性福尔马林固定液中进行固定,固定时间为 6~48 h^[48]。组织固定后石蜡包埋并连续切片,建议切片厚度 4~5 μm。对其中 1 张 FFPE 切片进行 HE 染色,并在显微镜下观察肿瘤细胞的含量和数量。若肿瘤细胞含量不足,实验室可标记肿瘤细胞区域并富集肿瘤细胞。需要注意的是,肿瘤细胞含量与数量的评估易受到观察者主观因素的影响^[49]。为避免样本处理带来的交叉污染,切片制备过程中,应使用一次性耗材(如切片的刀片、挑切下蜡片的棉签或毛笔等),并在每个样本操作完成后及时清理切片机并保证每个样本的切片有单独展片水缸,每个患者的 FFPE 样本应单独脱蜡^[50,51]。FFPE 样本可常温运输和保存,为防止样本之间的交叉污染,应保证“一盒一样”。强酸处理的脱钙组织 DNA 损伤严重,不适合 NGS 检测。实验室可用弱酸进行骨组织脱钙,但需对脱钙时间和脱钙方法进行验证,保证提取核酸的质量满足要求^[52]。

2. 新鲜组织:

新鲜组织(包括手术和活检组织)可提取得到高质量的核酸。新鲜组织应在离体后 30 min 内置于液氮中,进行快速病理切片,以评估肿瘤细胞的含量^[50]。若肿瘤细胞含量不足,可通过标记肿瘤区域进行富集^[53]。新鲜冰冻组织可于液氮、-70℃冰箱或稳定剂中长期保存^[50]。

3. 血浆样本:

血浆样本采集、运送、接收和保存的核心是避免外周血有核细胞裂解释放基因组 DNA 稀释游离 DNA 和游离 DNA 降解。可使用血浆游离 DNA 专用采血管或 EDTA 抗凝管采集外周血。不同采血管的样本保存温度及保存时间不同^[24,54]。血浆游离 DNA 专用采血管可参考厂家建议。采集血液样本时应注意避免溶血,EDTA 抗凝管采集样本后需要对血液样本进行血浆分离处理,以避免 ctDNA 降解或外周血有核细胞裂解释放基因组 DNA 稀释 ctDNA^[24]。建议进行两次离心,第一次为 1 600×g 离心 10 min,第二次为 16 000×g 离心 10 min。血浆分离最好在采集后 6 h 内完成。运输过程中需避免血液样本发生剧烈振荡。血浆分离后,如果不能立即进行游离 DNA 提取,可在-20℃可保存 1 个月,长期保存应置于-70℃^[55],避免反复冻融。如果可以提取,可暂时在 4℃保存 3 h。ctDNA 的含量与肿瘤类型、肿瘤分期、采样时间和临床治疗等有关^[56,57]。实验室应制定 ctDNA 检测的临床适应证^[58]。

4. 胸腔积液及腹腔积液样本:

临床上可采用胸腔积液及腹腔积液上清或离心后得到的细胞沉淀进行 NGS 检测。使用细胞沉淀检测前,应先制成蜡块,进行切片和 HE 染色,镜检确认肿瘤细胞含量^[23]。不同的样本类型(上清或细胞沉淀)所需的样本采集容器不同,实验室应制定适宜的保存条件^[50]。

【共识 5】实验室应制定每一种类型样本采集、运送、接收和保存的 SOPs,明确样本接收和拒收标准,建立合适的样本运输和保存要求。适用于肿瘤基因突变 NGS 检测的样本主要包括 FFPE、血浆、新鲜组织、胸腹水等。采用 FFPE、胸腹水细胞沉淀或新鲜组织进行 NGS 检测前,需先评估样本质量和肿瘤细胞的含量。为避免交叉污染,切片制备过程中,应使用一次性耗材。血浆样本采集、运送、接收和保存的核心是避免外周血有核细胞裂解释放基因组 DNA 稀释游离 DNA 或游离 DNA 降解。分析前记录的关键点为样本接收、拒收和预处理的记录。当样本质量未达到 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。

(二) 分析中

实验室应根据性能确认或性能验证的结果,建立分析中检测的标准操作程序。各环节的质量标准是标准操作程序的重要组成部分,包括核酸提取后,核酸浓度、核酸纯度和核酸的片段分布要求,文库制备的 DNA 上样量和文库制备后进行杂交捕获上样量的要求,最低测序深度、平均测序深度、覆盖均一性、GC 含量、

碱基识别质量值、比对质量值和在靶率等要求^[41]。这些要求也同时是分析中实验记录的关键点。当上述质量标准要求未达到时，可进行让步检测，但应建立对应的异常情况处理程序。

实验室应建立室内质量控制的标准操作程序。室内质控品应尽可能涵盖检测范围内的所有样本类型和突变类型。临床样本是最理想的质控品，但特定标志物的阳性标本常常难以获得，因此肿瘤体细胞突变 NGS 检测多采用模拟样本作为质控品。模拟样本的分析物生物特征和基质应尽可能与临床样本一致。如可将细胞系进行福尔马林固定石蜡包埋，模拟 FFPE 样本；采用核小体特异切割位点的机制，形成肿瘤游离 DNA 核小体单体大小为主的片段分布特征，以模拟血浆中的 ctDNA^[59]。自制质控品应有质控品制备和验证的程序和记录。单个质控品可能无法覆盖检测范围内的所有突变位点或突变类型，实验室可轮换使用多个含有不同突变类型的质控品。质控品的设置应至少包含弱阳性、阴性和无模板对照（如水样本），且与待检样本同批检测。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。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。实验室还可阶段性统计核酸提取不合格率、文库构建不合格率、下机数据质控不合格率、测序深度不合格率、覆盖均一性不合格率、污染率、各体细胞突变位点阳性率等，动态监测统计日常检测样本和室内质控数据，观察变化以进行改善。DNA 质量、文库质量或测序质量不合格时，实验室应建立异常情况处理程序（如让步检测、确认检测或不发出检测报告）。

实验室应定期参加室间质量评价（EQA）或能力验证（PT）。如使用肿瘤/正常双样本配对检测肿瘤基因突变的实验室，应尽量选择双样本配对的 EQA/PT 项目。具体要求可参考“通用共识”^[3]。

【共识 6】实验室应根据性能确认或性能验证的结果，建立分析中检测的标准操作程序。各环节的质量标准是标准操作程序的重要组成，包括核酸提取后，核酸浓度、核酸纯度和核酸的片段分布要求，文库制备的 DNA 上样量和文库制备后进行杂交捕获上样量的要求，最低测序深度、平均测序深度、覆盖均一性、GC 含量、碱基识别质量值、比对质量值和在靶率等要求，这些要求也同时是分析中实验记录的关键点。若某一关键环节的检测质量控制参数不符合要求，则实验室应根据所建立的异常情况的处理程序进行处理。此外，实验室应根据可检测的样本类型、突变类型、检测下限等设置合适的包括所检测的所有突变类型的弱阳性、阴性和无模板对照（如水样本）质控品，且与待检样本同批检测。定期参加 EQA/PT 或进行实验室间比对等。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。

（三）分析后

1. 基本信息：

肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测结果报告的要素见“通用共识”^[3]。样本信息中需注明病理诊断（如肿瘤组织部位、组织类型等）、肿瘤细胞的百分比和数量（适用时）、其他影响样本质量的因素（如出血、坏死、是否强酸脱钙处理）等。因方法对检测性能影响较大，实验室应对肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测方法进行详细说明，包括：（1）方法名称：例如靶向测序、全外显子测序、全基因组测序；（2）检测平台：即使用的高通量测序仪名称；（3）目标区域富集方法：例如多重 PCR、杂交捕获等；（4）检测范围：包括实验室需要在结果报告单上注明检测的基因、可检测的突变类型或者具体的肿瘤热点突变，如果突变位点很多，可以给予网址链接，以便查询；（5）生物信息学分析：重要的参数，如测序深度，不符合要求的区域需要说明；（6）检测性能和局限性：检测限等重要的性能指标需进行说明。检测方法的局限性也应当进行说明。如肿瘤游离 DNA 体细胞突变检测用于药物疗效预测，特异性较高，但临床敏感性较差，NCCN 指南建议如果血浆 T790M 检测结果为阴性，仍需进行组织学检测；（7）确认实验：如果检测采用第二种方法确认，需在结果报告单对该方法进行说明。

2. 结果报告：

实体肿瘤体细胞基因突变可参考 HUGO 基因命名委员会 (HGNC)、人类基因组变异学会 (HGVS) 等建议进行报告^[41]；还应提供与检出的肿瘤基因突变相关的推荐药物、药物的证据等级、变异的临床意义分级及相关详细证据来源，对于在研临床药物应给出临床试验开展状态、患者入组条件及联系方式等相关信息。突变的临床意义可依据肿瘤特异性公共数据库 (如 COSMIC、cBioPortal、My Cancer Genome、Personalized Cancer Therapy、Clinical interpretations of variants in cancer、oncoKB 等)、临床试验数据库 (如 ClinicalTrials.gov、中国临床试验注册中心、EudraCT 等) 及肿瘤相关指南 (如 NCCN 指南、ESMO 指南、CSCO 指南等) 进行注释^[60]。综合伴随诊断、临床指南、数据库或文献证据，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)。实验室需要建立分类及分级和报告的 SOPs，SOPs 应至少包括两个方面：(1) 对体细胞基因突变进行分级的流程；(2) 在日常检测中报告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，证据通常包括以下 4 级^[61] (表 1)：(1) 等级 A：美国 FDA 批准靶向治疗药物相关突变位点 (特定肿瘤) 或者是临床诊疗指南中治疗、诊断或者预后判断相关突变位点 (特定肿瘤)；(2) 等级 B：基于证据充分临床研究基础上专家共识认为与靶向治疗、某一疾病诊断或者预后相关的突变位点；(3) 等级 C：美国 FDA 批准靶向治疗药物相关突变位点 (不同肿瘤) 或者是临床诊疗指南中治疗、诊断或者预后判断相关突变位点 (不同肿瘤)，即非适应证的用药，临床试验的入组标准或者基于多个小规模研究表明具有指导诊断和预后判断的意义；(4) 等级 D：临床前研究表明可能有治疗指导意义，或者在小规模研究、多个病例报道 (非共识) 中表明该突变 (或者和其他标志物联合) 具有指导诊断和预后判断的意义。实验室应根据相关要求制定肿瘤基因突变检测结果报告的程序文件，其中 I 级和 II 级突变需要明确报告^[44,61,62]。肿瘤基因突变检测报告除了报告阳性变异位点外，对于特定肿瘤中的 A 级阴性结果也应予以标注^[61]。报告中应注明所用数据库的版本号，并对数据库的局限性进行说明。实验室需定期更新完善数据库，并对数据库的更新迭代做好记录，以便结果的回溯^[61]。

表 1 对体细胞基因突变分级及证据等级的标准^[61]

突变分级	证据等级
临床意义明确	等级 A 或等级 B
有潜在临床意义	等级 C 或等级 D
临床意义不明确	在人群数据库和肿瘤相关数据库中均没有较高的发生率；没有确定的与肿瘤相关的文献证据
良性或可能良性突变	在人群数据库中突变频率较高；没有与肿瘤相关的文献证据

共识 7】 肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测结果报告应对检测方法进行详细说明。肿瘤体细胞基因突变可以分为临床意义明确、有潜在临床意义、临床意义不明确和良性或可能良性突变四级，临床证据等级有 A、B、C 和 D 级。实验室需要建立分级和报告的 SOPs，明确对体细胞基因突变进行分级的流程和在日常检测中报告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。

3. 结果解释：

实验室应对体细胞基因突变的意义进行解释，本共识仅涉及药物疗效预测的临床意义。实验室应制定结果解释的 SOPs，SOPs 应遵循以下原则：(1) 准确：实验室提供的药物应该是有依据的，而且药物推荐的证据应该在报告中注明。(2) 及时：实验室应当依据最新的证据 (包括指南、文献和数据库等) 进行药物解读，因为证据是不断变化的。(3) 充分：实验室在临床需要的情况下，应该尽可能提供全面的信息、证据和解读。实验室应在和临床沟通后，确定实验室报告何种临床证据等级的药物，并制定 SOPs。如实验室日常报告伴随诊断和临床指南推荐的药物，那么在报告解读时，应对该等级的药物进行全面的推荐。

4. 实验室的建议和说明：

在需要的情况下,临床实验室应给出进一步检测的建议。例如 FFPE 样本有些核酸降解或者片段化严重,核酸提取的量低,导致检测结果中内控阴性,或者文库构建失败;又如血浆中游离 DNA 检测时,有些样本 DNA 含量偏低,这些样本的问题只有在检测过程中才能够发现。这种情况下,实验室可要求临床重新采集样本;如果样本来源受限,例如组织样本无法重新采集,可建议进行细胞学检测或者血浆游离 DNA 检测。由于样本质量或其他质量要求未达到,但样本有限的情况进行的让步检测,也应在报告中进行说明。

在进行肿瘤基因突变 NGS 检测时,可能会出现意外发现。国际上对于是否报告意外发现的意见尚不统一。如 ACMG 推荐有明确临床意义的意外发现需要报告^[63]; CAP 要求实验室应根据当地法律法规,制定是否报告意外发现的程序文件^[41];欧洲人类遗传学会(ESHG)认为患者有权选择是否报告意外发现,并建议检测项目应局限在与临床症状相关的基因,以减少意外发现^[63];EuroGentest 建议生物信息学分析时只分析待测目的基因,以避免意外发现^[13]。考虑到国内从事遗传咨询的专业人员较为缺乏,以及遗传咨询培训尚未成熟,为避免给患者带来不必要的担忧和焦虑,建议与肿瘤无关的意外发现不在报告中进行呈现。

在对如结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌和乳腺癌等具有遗传倾向的肿瘤进行 NGS 检测时,需结合家族史,考虑是否为遗传性肿瘤,并建立遗传咨询流程,具体内容可参考《高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识(第一版遗传病部分)》^[64]。

【共识 8】实验室应对体细胞基因突变药物疗效预测的临床意义进行解释。实验室应制定结果解释的 SOPs,并遵循准确、及时和充分的原则。在需要的情况下,临床实验室应给出进一步检测的建议。由于样本质量或其他质量要求未达到,但样本有限的情况进行的让步检测,也应在报告中进行说明。与肿瘤无关的意外发现因难以解释,建议不在检测报告中呈现。在对如结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌和乳腺癌等具有遗传倾向的肿瘤进行 NGS 检测时,需结合家族史,考虑是否为遗传性肿瘤,并建立遗传咨询流程。

总结

NGS 技术在肿瘤的精准诊疗中具有重要作用,实验室应加强质量管理,保证 NGS 检测结果的准确性。本共识对实体肿瘤体细胞基因突变 NGS 检测中的临床预期用途确定、方法建立与优化、LDTs 性能确认、分析前中后的质量保证关键环节进行了阐述。目前,实体肿瘤基因突变 NGS 突变检测主要用于肿瘤靶向用药指导及其耐药监测和免疫治疗疗效评估。随着发展,新的生物标志物将不断出现,新的 NGS 测序技术不断进入临床检测,预期用途还会进一步扩大。本共识将适时修订,以适应肿瘤基因突变高通量测序技术临床规范化应用的需求。

对于实体肿瘤胚系变异 NGS 检测的相关内容,可具体参考《高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识(第一版遗传病部分)》^[64],本共识不再赘述。

项目主持者:李金明(国家卫生健康委临床检验中心);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);贾玫(北京大学人民医院检验科)

执笔者:张瑞(国家卫生健康委临床检验中心);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);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);杨玲(北京吉因加科技有限公司);杜长诗(北京泛生子基因科技有限公司);楚玉星(北京吉因加医学检验实验室有限公司);韩彦熙(国家卫生健康委临床检验中心);阮力(厦门艾德生物医药科技股份有限公司);刘慧(北京泛生子基因科技有限公司);郑青松(北京星云医学检验实验室有限公司)

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);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);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);赵屹(中国科学院计算技术研究所)

参考文献

- [1] RajaR, LeeYS, StreicherK, et al. **Integrating genomics into drug discovery and development: challenges and aspirations**[J]. Pharm Med, 2017, 31(4): 217-233. DOI:[10.1007/s40290-017-0192-8](https://doi.org/10.1007/s40290-017-0192-8).
- [2] RotowJ, BivonaTG. **Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC**[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(11): 637-658. DOI:[10.1038/nrc.2017.84](https://doi.org/10.1038/nrc.2017.84).
- [3] 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,等.**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）** [J]. 中华医学杂志,2019,99(43): 3393-3397. DOI:[10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.43.008](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.43.008).
- [4] LegrasA, BarritaultM, TalletA, et al. **Validity of targeted next-generation sequencing in routine care for identifying clinically relevant molecular profiles in non-small-cell lung cancer: results of a 2-year experience on 1 343 samples**[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(4): 550-564. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2018.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.04.002).
- [5] ParkerBA, SchwaederléM, ScurMD, et al. **Breast cancer experience of the molecular tumor board at the University of California, San Diego Moores Cancer Center**[J]. J Oncol Pract, 2015, 11(6): 442-449.DOI: [10.1200/JOP.2015.004127](https://doi.org/10.1200/JOP.2015.004127).
- [6] Department of Health and Human Services. Considerations for design, development, and analytical validation of next generation sequencing (NGS)-based in vitro diagnostics (IVDs) intended to aid in the diagnosis of suspected germline diseases[S]. 2018.
- [7] LihCJ, TakebeN. **Considerations of developing an NGS assay for clinical applications in precision oncology: The NCI-MATCH NGS assay experience**[J]. Curr Probl Cancer, 2017, 41(3): 201-211. DOI:[10.1016/j.crrprobcancer.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.crrprobcancer.2017.05.003).
- [8] 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).
- [9] GargisAS, KalmanL, LubinIM. **Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical microbiology and public health laboratories**[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(12): 2857-2865. DOI:[10.1128/jcm.00949-16](https://doi.org/10.1128/jcm.00949-16).
- [10] BijwaardK, DickeyJS, KelmK, et al. **The first FDA marketing authorizations of next-generation sequencing technology and tests: challenges, solutions and impact for future assays**[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(1): 33-40. DOI: [10.1586/14737159.2015.979795](https://doi.org/10.1586/14737159.2015.979795).
- [11] PantS, RamaraoM, Green IVGA, et al. Next-generation sequencing-based companion diagnostics: from biomarker discovery to Clinical implementation[A]. In: Companion and Complementary Diagnostics: Elsevier, 2019: 135-163.
- [12] Food and Drug Administration. **CDRH'S approach to tumor profiling next generation sequencing tests**[EB/OL]. [2018]. <https://www.fda.gov/media/109050/download>.
- [13] MatthijsG, SoucheE, AldersM, et al. **Guidelines for diagnostic next-generation sequencing**[J]. Eur J Hum Genet, 2016, 24(1): 2-5. DOI:[10.1038/ejhg.2015.226](https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.226).
- [14] JenningsLJ, ArcilaME, CorlessC, 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. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2017.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011).
- [15] LuchiniC, BibeauF, LigtenbergMJL, et al. **ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach**[J]. Ann Oncol, 2019, 30(8): 1232-1243. DOI: [10.1093/annonc/mdz116](https://doi.org/10.1093/annonc/mdz116).
- [16] TrabuccoSE, GowenK, MaundSL, et al. **A novel next-generation sequencing approach to detecting microsatellite instability and pan-tumor characterization of 1 000 microsatellite instability-high cases in 67,000 patient samples**[J]. J Mol Diagn, 2019, 21(6): 1053-1066.DOI: [10.1016/j.jmoldx.2019.06.011](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.06.011).

- [17] MiddhaS, ZhangL, NafaK, et al. **Reliable pan-cancer microsatellite instability assessment by using targeted next-generation sequencing data**[J]. JCO Precis Oncol, 2017, 1: 1-17. DOI:[10.1200/po.17.00084](https://doi.org/10.1200/po.17.00084).
- [18] ChalmersZR, ConnellyCF, FabrizioD, et al. **Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden**[J]. Genome Med, 2017, 9(1): 34. DOI:[10.1186/s13073-017-0424-2](https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2).
- [19] WillisJ, LefterovaMI, ArtyomenkoA, et al. **Validation of microsatellite instability detection using a comprehensive plasma-based genotyping panel**[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(23): 7035-7045. DOI:[10.1158/1078-0432.ccr-19-1324](https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-1324).
- [20] MelendezB, Van CampenhoutC, RoriveS, et al. **Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue**[J]. Transl Lung Cancer Res, 2018, 7(6): 661-667. DOI: [10.21037/tlcr.2018.08.02](https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.08.02).
- [21] StenzingerA, AllenJD, MaasJ, et al. **Tumor mutational burden standardization initiatives: recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions**[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2019, 58(8): 578-588. DOI:[10.1002/gcc.22733](https://doi.org/10.1002/gcc.22733).
- [22] GandaraDR, PaulSM, KowanzM, et al. **Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab**[J]. Nat med, 2018, 24(9): 1441. DOI: [10.1038/s41591-018-0134-3](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0134-3).
- [23] ChenH, LuthraR, GoswamiRS, et al. **Analysis of pre-analytic factors affecting the success of clinical next-generation sequencing of solid organ malignancies**[J]. Cancers (Basel), 2015, 7(3): 1699-1715. DOI:[10.3390/cancers7030859](https://doi.org/10.3390/cancers7030859).
- [24] NikolaevS, LemmensL, KoesslerT, et al. **Circulating tumoral DNA: preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory**[J]. Anal Biochem, 2018, 542: 34-39. DOI:[10.1016/j.ab.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.004).
- [25] HongJ, GreshamD. **Incorporation of unique molecular identifiers in TruSeq adapters improves the accuracy of quantitative sequencing**[J]. Biotechniques, 2017, 63(5): 221-226. DOI: [10.2144/000114608](https://doi.org/10.2144/000114608).
- [26] KouR, LamH, DuanH, et al. **Benefits and challenges with applying unique molecular identifiers in next generation sequencing to detect low frequency mutations**[J]. PloS One, 2016, 11(1): e0146638. DOI: [10.1371/journal.pone.0146638](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146638).
- [27] Illumina. **Effects of index misassignment on multiplexing and downstream analysis**[EB/OL]. [2017-12-31].<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/whitepapers/index-hopping-white-paper-770-2017-004.pdf?linkId=36607862>.
- [28] ToledoRA, BurnichonN, CasconA, et al. **Consensus statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas**[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(4): 233-247. DOI:[10.1038/nrendo.2016.185](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.185).
- [29] RoyS, ColdrenC, KarunamurthyA, et al. **Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists**[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(1): 4-27. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003).
- [30] HardwickSA, DevesonIW, MercerTR. **Reference standards for next-generation sequencing**[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(8): 473-484. DOI:[10.1038/nrg.2017.44](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.44).
- [31] SureshK, ChandrashekarS. **Sample size estimation and power analysis for clinical research studies**[J]. J Hum Reprod Sci, 2012, 5(1): 7. DOI: [10.4103/0974-1208.97779](https://doi.org/10.4103/0974-1208.97779).
- [32] SpencerDH, TyagiM, VallaniaF, et al. **Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single nucleotide variants in targeted next-generation sequence data**[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(1): 75-88. DOI: [10.1016/j.jmoldx.2013.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.09.003).

- [33] StefanCP, KoehlerJW, MinogueTD. **Targeted next-generation sequencing for the detection of ciprofloxacin resistance markers using molecular inversion probes**[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25904. DOI: [10.1038/srep25904](https://doi.org/10.1038/srep25904).
- [34] SteadLF, SuttonKM, TaylorGR, et al. **Accurately identifying low-allelic fraction variants in single samples with next-generation sequencing: applications in tumor subclone resolution**[J]. Hum mutat, 2013, 34(10): 1432-1438. DOI: [10.1002/humu.22365](https://doi.org/10.1002/humu.22365).
- [35] 李金明.高通量测序技术[M].北京:科学出版社,2018.
- [36] Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988; final rules and notice[S].2017.
- [37] LiW, QiuT, GuoL, et al. **Major challenges related to tumor biological characteristics in accurate mutation detection of colorectal cancer by next-generation sequencing**[J]. Cancer Lett, 2017, 410: 92-99. DOI:[10.1016/j.canlet.2017.09.014](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.014).
- [38] ShengJ, FangW, YuJ, et al. **Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer**[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20090. DOI: [10.1038/srep20090](https://doi.org/10.1038/srep20090).
- [39] BaiH, WangZ, ChenK, et al. **Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer**[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(25): 3077-3083. DOI:[10.1200/jco.2011.39.3744](https://doi.org/10.1200/jco.2011.39.3744).
- [40] HumeS, NelsonTN, SpeevakM, et al. **CCMG practice guideline: laboratory guidelines for next-generation sequencing**[J]. J Med Genet, 2019, 56(12): 792-800. DOI:[10.1136/jmedgenet-2019-106152](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106152).
- [41] College of American Pathologists. Molecular pathology checklist: CAP accreditation program[S]. 2015.
- [42] ShahsiahR, DeKoningJ, SamieS, et al. **Validation of a next generation sequencing panel for detection of hotspot cancer mutations in a clinical laboratory**[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(2): 98-105. DOI:[10.1016/j.prp.2016.11.016](https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.11.016).
- [43] RehmHL, BaleSJ, Bayrak-ToydemirP, et al. **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).
- [44] AlonsoCM, LlopM, SargasC, et al. **Clinical utility of a next-generation sequencing panel for acute myeloid leukemia diagnostics**[J]. J Mol Diagn, 2019, 21(2): 228-240. DOI: [10.1016/j.jmoldx.2018.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.09.009).
- [45] WeissRL. **The long and winding regulatory road for laboratory-developed tests**[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 138(1): 20-26. DOI: [10.1309/AJCP6OAULC3CMFEJ](https://doi.org/10.1309/AJCP6OAULC3CMFEJ).
- [46] ChenB, GagnonMB, ShahangianS, et al. **Good laboratory practices for molecular genetic testing for heritable diseases and conditions**[J]. MMWR Recomm Rep, 2009, 58(6): 1-37.
- [47] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会.WS/T 496-2017 中华人民共和国卫生行业标准临床实验室质量指标[S], 2017.
- [48] KimS, ParkC, JiY, et al. **Deamination effects in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in the era of precision medicine**[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(1): 137-146. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2016.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.006).
- [49] SmitsAJ, KummerJA, de BruinPC, et al. **The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate**[J]. Mod Pathol, 2014, 27(2): 168-174. DOI:[10.1038/modpathol.2013.134](https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.134).
- [50] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会.国卫医医护便函[2015]240 号肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行) [S].2015.
- [51] DeansZC, CostaJL, CreeI, et al. **Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL**[J]. Virchows Arch, 2017, 470(1): 5-20. DOI:[10.1007/s00428-016-2025-7](https://doi.org/10.1007/s00428-016-2025-7).
- [52] GoswamiRS, LuthraR, SinghRR, et al. **Identification of factors affecting the success of next-generation sequencing testing in solid tumors**[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 145(2): 222-237. DOI:[10.1093/ajcp/aqv023](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqv023).

- [53] MichaelOI, CatherineID, MaryHH, et al. **Molecular oncology testing for solid tumors: a practical handbook and multidisciplinary approach**[M]. Springer, 2015.
- [54] DenisMG, KnolAC, TheoleyreS, et al. **Efficient detection of BRAF mutation in plasma of patients after long-term storage of blood in cell-free DNA blood collection tubes**[J]. Clin Chem, 2015, 61(6): 886-888. DOI:[10.1373/clinchem.2015.238352](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.238352).
- [55] NormannoN, DenisMG, ThressKS, et al. **Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer**[J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 12501-12516. DOI:[10.18632/oncotarget.13915](https://doi.org/10.18632/oncotarget.13915).
- [56] FanG, ZhangK, YangX, et al. **Prognostic value of circulating tumor DNA in patients with colon cancer: systematic review**[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171991. DOI:[10.1371/journal.pone.0171991](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171991).
- [57] AravanisAM, LeeM, KlausnerRD. **Next-generation sequencing of circulating tumor dna for early cancer detection**[J]. Cell, 2017, 168(4): 571-574. DOI:[10.1016/j.cell.2017.01.030](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.030).
- [58] MerkerJD, OxnardGR, ComptonC, et al. **Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists joint review**[J]. Arch of Pathol Lab Med, 2018, 142(10): 1242-1253. DOI:[10.5858/arpa.2018-0901-SA](https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0901-SA).
- [59] ZhangR, PengR, LiZ, et al. **Synthetic circulating cell-free DNA as quality control materials for somatic mutation detection in liquid biopsy for cancer**[J]. Clin Chem, 2017, 63(9): 1465-1475. DOI:[10.1373/clinchem.2017.272559](https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.272559).
- [60] WrzeszczynskiKO, AbhyankarA, FeliceV, et al. **Analytical validation of clinical whole genome and transcriptome sequencing of patient derived tumors: clinical application of whole genome sequencing for reporting targetable variants in cancer**[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(6): 822-835. DOI:[10.1016/S1470-2045\(15\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00188-6).
- [61] 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): 4-23. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2016.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002).
- [62] RitterDI, RoychowdhuryS, RoyA, et al. **Somatic cancer variant curation and harmonization through consensus minimum variant level data**[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 117. DOI:[10.1186/s13073-016-0367-z](https://doi.org/10.1186/s13073-016-0367-z).
- [63] Van ElCG, CornelMC, BorryP, et al. **Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics**[J]. Eur J Hum Genet, 2013, 21(6): 580-584. DOI:[10.1038/ejhg.2013.46](https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.46).
- [64] 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,等. **高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识 (第一版遗传病部分)**[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(9): 660-668. DOI:[10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.09.004](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.09.004).