

前言

遗传病是指由于基因突变或染色体数目或结构变异导致的疾病。根据遗传物质的改变情况,可分为单基因病、多基因病、染色体病、线粒体遗传病和体细胞遗传病^[1]。目前,人类在线孟德尔遗传数据库(OMIM)已经收录了 6 000 多种分子基础已知的遗传病^[2]。因为遗传异质性和表型多样性,以往的检测方法例如 Sanger 测序和染色体芯片分析(CMA)等在成本、通量和诊断敏感性等方面难以满足临床应用需求。近年来,高通量测序即下一代测序(NGS)技术因其可同时对多个基因,甚至全外显子组和全基因组进行测序,现已被广泛应用于遗传病诊断领域,极大地提高了遗传病诊断的预期^[3]。但与以往技术相比,基于 NGS 技术的检测操作步骤多,对人员能力要求高,不规范使用或过度使用都有可能给受检者及其家庭造成不可预期的困扰和伤害,为保障高通量测序技术在遗传病临床检测中的规范应用,在借鉴国内外相关指南、标准、规范和权威发表的文献,以及《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)》^[4](以下简称“通用共识”)的基础上,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规范化应用北京专家共识(第一版遗传病部分)》。本共识中的声明内容为专家讨论并推荐的要点。

遗传病高通量测序实验室建设的总体要求

遗传病高通量测序实验室建设时,在实验室环境条件(通风、温湿度、洁净和防震等)、仪器设备配备及日常维护与定期校准和人员专业知识及能力要求等总体上应满足“通用共识”的要求^[4],实验室分区设计则在遵循“通用共识”中所阐述的“32 字原则”上,同时要考虑遗传变异检测的特点。实验室应根据不同的遗传检测项目、检测流程、测序平台、建库策略及工作量大小制订切实可行的分区方案。基于杂交捕获方法进行遗传病目标区域捕获测序(亦称“靶向测序”)和全外显子组测序(WES)时,实验室区域应包含:试剂准备区、样本制备区、打断区(适用时)、文库制备区、扩增一区(文库预扩增和纯化)、杂交捕获区、扩增二区(文库扩增和富集)、测序区、电泳区(适用时)等区域。如采用酶法进行基因组片段化则无需划分独立打断区。对于没有 PCR 扩增(PCR-free)过程的全基因组测序(WGS),因不存在靶向区域捕获这一过程,实验流程和分区更为简单,只需试剂准备区、样本制备区、打断区(适用时)、文库制备区、测序区、电泳区(适用时)等区域即可。如实验室使用自动化建库流程,在确认不会产生交叉污染的情况下,某些区域可以适当合并。

对于多检测技术流程、多检测项目、多测序平台共存的检测实验室,则可在遵循“通用共识”基本原则的基础上,适当共用一些区域^[5],为了避免检测结果之间的相互干扰,胚系变异检测和肿瘤体细胞突变检测的“湿实验”过程中的核酸提取及建库过程相关区域宜分开。

实验室应根据所选测序平台及建库流程进行各分区内仪器的配置,以满足实验要求。各仪器应建立使用、维护和校准(适用时)标准操作程序(SOPs)及相应记录,以保证仪器正常运行。

开展遗传病高通量测序检测实验室人员资质除需满足《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》^[6]和“通用共识”外,还需要有能研发建立“湿实验”方法和搭建及确认遗传变异生物信息学分析流程(亦称“干实验”)的人员;具有建立 SOPs 和随研究进展及时更新变异解读 SOPs 的人员;此外,还应有与检测项目相匹配的遗传咨询人员等。

生物信息学分析人员应为一个团队,整体要求有生物信息学专业背景知识,同时还应有具有医学或遗传学、临床实验室和统计计算等背景的高层次(如有博士学位)人员。需接受临床实验室相关知识的培训,具备能与信息技术(IT)人员一起合作建立相关疾病变异和表型实验室内部数据库的能力;变异解读人员应具有医学、遗传学和分子生物学专业知识,熟悉相关专业文献,能及时更新知识,对于遗传变异结果能在临床背景下给予相应解释;遗传咨询人员应具有医学背景和遗传学知识,熟悉相关领域遗传咨询的概念和方法,能及时更新相关遗传咨询知识;发放产前诊断报告的实验室应符合最新颁布的政策法规,如《产前诊断技术管理办法》^[7]等的相关规定。此外,实验室负责人是 NGS 实验室决策者,应对所开展的遗传变异 NGS 检测项目及其质量保证关键环节有较全面且清晰的了解。

根据自身岗位的不同，所有人员均应接受持续的内部培训、外部培训和相应资质培训及考核，并进行内部的定期能力评估。

【共识 1】开展遗传病 NGS 检测的实验室应根据其所采用的测序平台、建库技术流程以及是否有多项目检测进行适当的实验室分区设计，如实验室同时进行肿瘤体细胞突变 NGS 检测，则“湿实验”的核酸提取及建库过程相关区域不宜与之混用。

应配备“湿实验”和“干实验”流程研发、变异解读和遗传咨询人员，生物信息学分析人员应为一个具有医学或遗传学背景的团队，负责建立生物信息分析流程并对其进行性能确认，以及与 IT 人员一起合作建立相关疾病变异和表型实验室内部数据库；变异解读人员应具有医学、遗传学和分子生物学专业知识，并能在临床背景下对遗传变异结果给予相应解释；遗传咨询人员应具有医学背景和遗传学知识，熟悉相关领域遗传咨询的概念和方法。实验室负责人应清晰了解所开展的遗传变异 NGS 检测项目及其质量保证关键环节。所有人员均应随相应研究进展及时更新知识。

遗传病高通量测序检测方法的设计和性能确认

一、临床预期用途的确定

遗传病 NGS 检测申请单、结果分析与报告以及临床决策必须基于医学科学证据，因此所开展的检测项目必须有明确的临床预期用途，例如先证者的确认诊断、怀疑患有遗传病的患者的辅助诊断、宫内胎儿表型提示遗传病但染色体核型分析未发现异常的产前诊断、或育龄夫妇的孕前携带者筛查（一般限于早发的严重致残致死的人群携带率较高的隐性遗传病）等。并根据临床预期用途选择合适的检测方法，例如针对特定疾病和基因的靶向测序，针对编码区域的 WES，针对整个基因组的 WGS 和针对基因组结构异常的拷贝数变异测序（CNV-Seq）等。

【共识 2】遗传病 NGS 检测实验室所开展的检测项目临床预期用途通常应为先证者确认诊断、怀疑患有遗传病的患者的辅助诊断、宫内胎儿表型提示遗传病但染色体核型分析未发现异常的产前诊断、或育龄夫妇的孕前遗传病携带者筛查（一般限于早发的严重致残致死的人群携带率较高的隐性遗传病）等，实验室应根据预设的上述临床预期用途选择合适的 NGS 检测方法，如靶向测序、WES 和 WGS 等。

二、检测方法设计与优化

在明确检测的临床预期用途后，实验室应对检测方法进行设计和优化。首先，实验室在建立遗传病相关靶向测序方法时，要根据临床预期用途考虑纳入哪些基因^[8,9]。当预期用途为预测性检测时，如为产前诊断和携带者筛查，则只可以纳入有充分的遗传学和实验证据表明与疾病有明确相关性的基因。实验室应建立客观的方法对证据进行评估和分类来确定基因和疾病的相关性，即基因的临床有效性，建议采用美国国立卫生研究院（NIH）的临床基因组资源组织（ClinGen）发布的基因临床有效性管理标准操作程序^[8,10]，利用遗传学和实验证据评估基因的临床有效性，并定期对证据进行系统性回顾，以寻找是否出现新的证据支持。

确定基因列表后，实验室应进一步确定目标基因组区域，选择合适的转录本来定义最小捕获区域，并充分了解每个基因的变异谱，确定热点变异或者常见的致病变异，以及是否有位于内含子或者非编码区的致病变异，并明确哪些区域难以被捕获、测序和数据分析，如果检测范围无法包含对临床敏感性有较大影响的变异，则应补充其他能检出该类变异的检测方法，或在报告中注明检测局限性^[11,12]。

当 WES 作为一线检测方法时，需要尽可能地覆盖已知疾病相关基因的所有外显子及侧翼内含子区域，最理想的是对疾病相关的特定深内含子区域和非编码区也进行捕获，并且对捕获区域中含有基因组中高同源区域的捕获效率做特殊声明，这些需要厂家或实验室研发 WES 检测时，对各种疾病数据库以及文献开展持续评估，以此不断调整捕获区域。目前不同来源的 WES 捕获试剂，其对外显子区域的捕获能力均有不同，实验室需清楚这些差异并在性能确认中明确捕获效率和覆盖度^[13]。

与 WES 相比, WGS 不需要捕获, 因此测序覆盖度偏倚更少, 并能够检测到深内含子区域变异和部分结构变异, 但是 WGS 也不能准确测序所有区域 (如着丝点区域、端粒区域或低比对区域等), 并且 WGS 要对整个基因组产生足够的覆盖, 这可能会增加检测成本以及提高数据分析及解读难度^[13]。

在对 WES 和 WGS 检测结果进行变异解读与报告时, 需要根据临床预期用途考虑报告哪些基因中的变异。实验室应预先建立基因的临床有效性和已知基因突变谱的临床应用的一般原则, 以便在结果解读与报告时使用^[12]。

实验室应对检测进一步优化以满足初始设定的需求, 例如初步确定目标区域覆盖度、捕获和测序方法及是否需要其他检测方法作为补充, 此外, 还要考虑检测周转时间、性能确认时要使用的样本类型和检测的最终成本等。如需购买测序平台, 实验室应仔细考虑每个测序平台价格、测序通量及运行时间差异, 并结合本实验室未来检测规模需求确定使用的测序平台。如需混样操作, 则需确定满足覆盖度要求情况下每批次可混合的样本数量。建立性能确认中分析流程各步骤接受或者拒绝的质量控制参数并初步制定 SOPs^[9,14]。

【共识 3】开展遗传病 NGS 检测的实验室应根据预设的临床预期用途决定将哪些基因纳入拟检测的靶基因, 当预期用途为诸如产前诊断和携带者筛查的预测性检测时, 则只能纳入与疾病有明确相关性的基因。可采用 ClinGen 发布的基因临床有效性管理标准操作程序, 利用遗传学和实验证据评估基因的临床有效性, 并定期对证据进行系统性回顾, 以寻找是否出现新的证据支持。如直接采用 WES 检测, 则需要尽可能覆盖已知疾病相关基因的所有外显子。目前不同来源的 WES 捕获试剂, 其对外显子区域的捕获能力有所不同, 实验室需清楚这些差异并在性能确认中明确捕获效率和覆盖度。WGS 在遗传病的基因检测中亦应用越来越广, 但其仍存在检测成本高、不能准确测序所有区域及结果解释与报告难等局限性。因此, 实验室应预先建立基因的临床有效性和已知基因突变谱临床检测应用的一般原则, 以便在 WES 或 WGS 检测结果解读与报告时使用。

三、性能确认

目前, 我国基于 NGS 技术的遗传病检测方法属于实验室自建检测 (LDT), 其在临床应用之前, 需要经过完整的分析性能确认和必要的临床性能确认, 从而确立检测的分析和临床性能指标, 并在性能确认过程中最终建立整个检测和分析过程的 SOPs, 具体可参见“通用共识”^[4]。鉴于人类遗传变异的多样性和遗传病的遗传异质性, 性能确认无法评价检测样本中每个变异, 因此, 遗传病 NGS 检测性能确认是基于方法学的性能确认, 即如果检测程序一致, 可以不断累计性能确认的数据。需注意的是, 对整个流程 (即“湿实验”和“干实验”) 的确认必须整合在一起以保证整个检测的性能确认的完整性, 其包括从标本类型确定、标本采集运送和保存、DNA 提取及建库、测序到结果解读及临床报告的所有步骤^[12]。生物信息学分析流程的性能确认应先于分析性能确认之前完成。

1. 生物信息学分析流程建立及性能确认:

生物信息学分析流程是整个遗传病 NGS 检测流程的重要组成部分, 其通过比对、变异识别和注释、结合临床表型和遗传模式等信息的变异筛选过程, 将测序产生的原始数据进行处理和分析, 得到候选变异列表^[11,13]。目前, 分析流程的每个步骤都有多种算法和软件可以选择, 包括开源软件、实验室自建软件和商业付费软件, 各步骤选择不同的软件构成软件组合, 因此不同的实验室生物信息学分析流程均有不同, 对于遗传病 NGS 检测来说, 目前尚没有标准化的统一的生物信息学分析流程。实验室需根据预期检测的变异类型, 选择合适的算法和软件, 搭建本实验室的生物信息学分析流程, 进行必要的性能确认。用于“干实验”性能确认的样本应包括含有足够数量的已知变异的临床样本测序数据, 如为靶向测序检测, 则需加入特定疾病常见变异样本数据集; 如为 WES 或者 WGS 检测时, 则需包含不同遗传模式下 (例如: 显性、隐性、X 连锁) 含有已知变异的样本数据, 还需考虑是否包含先证者及其生物学父母 [核心家系分析 (trio)] 或其他亲属的测序数据, 并可使用参考标准品 (例如 NIST NA12878 细胞系等) 数据集和电子模拟数据集作为补充, 但不能完全代替临床样本数据集。通过分析这些样本数据, 确定针对不同变异类型如单核苷酸变异

(SNVs)、插入缺失 (indels)、拷贝数变异 (CNVs) 或其他的结构变异 (SVs) 等的检测敏感性、特异性和重复性^[15]。同时还要确定生物信息学分析各步骤中可满足预期检测性能的质量控制参数的阈值。实验室应建立生物信息学分析流程 SOPs, 并应建立监测、记录和更新分析流程的各个组成部分的版本改变 (例如软件升级、数据库更新、脚本更改等) 的程序, 及必要时对分析流程进行再次确认的程序。实验室应定义整体流程的版本号, 以保证患者报告的可溯源性^[16]。另外, 实验室需确保分析过程中每一步骤都可对样本数据进行准确追踪, 保证每一个中间文件都能与患者信息唯一对应, 并确保在数据文件存储、转移及分析过程中数据的完整性, 并确保存储的安全性等^[15,17]。鉴于患者表型对遗传病 NGS, 尤其是 WES 和 WGS 测序数据变异筛选及变异致病性评估的重要性, 在进行数据分析时, 实验室需仔细评估患者表型信息并使用标准化表型术语如人类表型标准术语 (HPO) 或中文人类表型标准术语 (CHPO) 等描述核心表型信息^[13]。

信息技术基础设施及实验室计算和存储环境都会影响生物信息学分析过程, 实验室应确保其在分析和保存患者数据信息时具有可靠性、安全性和稳定性。NGS 检测的原始数据、分析过程文件、比对文件以及检验结果等, 均是以数据的形式进行储存, 实验室应建立数据存储、保存及保证患者信息安全的一般原则, 规定读取、处理数据和运行流程的人员权限^[12]。

2. 分析性能确认和临床性能确认:

分析性能指标包括精密度、准确度、可报告范围和参考区间、分析敏感性和分析特异性等, 在一些情况下, 如嵌合体异常细胞比例或线粒体 DNA 异质性比例检测, 还需确定检测限 (LOD)。临床有效性和临床有用性性能指标包括临床敏感性、临床特异性、特定人群的阳性和阴性预测值 (适用时)。临床有效性和临床有用性性能指标应通过相关临床数据确定, 通常还需要对患者的后续随访和研究, 一般的 NGS 实验室很难做得到, 此时, 实验室也可通过引用科学文献来建立临床敏感性和临床特异性指标^[16], 同时建议实验室累积相关数据完善指标建立过程。

已知目前的测序平台和生物信息学分析流程在检测不同类型样本和不同类型变异的能力均有不同, 检测的性能存在差异。因此实验室应分别建立预期检测的不同样本类型 (例如: 全血样本、产前羊水或绒毛样本等) 的性能指标, 同时实验室还应分别建立针对预期要检测的不同的变异类型的性能指标^[16], 使用 NGS 数据分析 indels 和 CNVs 时, 还需要确认保证检测准确性的 indels 和 CNVs 的大小^[12]。所需要的确认样本数量由检测的预期用途决定。用于分析性能确认的样本需包括含有足够数量不同变异类型的样本及疾病代表性遗传变异谱的样本, 可使用参考标准品 (例如 NIST NA12878 细胞系等), 但是其不能完全替代临床样本, 还需要考虑纳入含有常见的致病变异的样本和疾病相关致病变异位于难于检测或分析的区域如低复杂度、高 GC 和同源或重复序列区域等的样本^[11,16]。当使用 WES 或者 WGS 方法时, 则需包含不同遗传模式下 (例如: 显性、隐性、X 连锁) 含有已知变异的样本, 如果同时检测 trio 或其他亲属样本, 性能确认时则必须包括已知表型、基因型和遗传模式的 trio 样本或其他亲属样本^[13,16]。

除了建立上述性能指标外, 实验室需在确认过程中建立与完善检测全流程各步骤的质量控制指标及参数, 以确定整个批次及单个样本质量是否满足检测要求。质量控制指标及参数随测序平台和分析流程的不同而不同, 质量控制指标及参数可能涉及但不限于文库片段化及浓度要求、测序过程中的簇密度生成及碱基质量要求、生物信息学分析各步骤性能指标及各指标阈值等。此外, 实验室还应建立当检测和分析流程发生改变时进行再次确认的程序及再次确认时应满足的性能, 例如: "湿实验"中测序化学和捕获方法的改变或"干实验"中比对或变异识别中使用的算法和软件更新等^[16]。

【共识 4】 基于 NGS 的遗传病检测方法, 在临床应用之前, 需要经过完整的分析性能确认和必要的临床性能确认, 从而确立检测的分析和临床性能指标, 并最终建立整个流程的 SOPs。遗传病 NGS 检测性能确认是基于方法学的性能确认。"干实验"性能确认需使用已知变异的临床样本测序数据, 并可使用参考标准品数据集和电子模拟数据集作为补充, 通过性能确认分析针对不同变异类型的检测敏感性、特异性和重复性。分析性能指标包括精密度、准确度、可报告范围和参考区间、分析敏感性和分析特异性等, 嵌合体异常细胞比例或线粒体 DNA 异质性比例检测还需确定 LOD。临床有效性和临床有用性性能指标包括临

床敏感性、临床特异性、特定人群的阳性和阴性预测值（适用时）等。实验室应根据预期用途建立不同样本类型和不同变异类型的分析性能指标。WES 或者 WGS 检测性能确认中需纳入不同遗传模式样本及家系样本。实验室应在确认过程中建立整个流程各步骤的质量控制指标及参数。还应建立当检测和分析流程发生改变时进行再次确认的程序及再次确认时应满足的性能。

四、NGS 检测结果的确认实验

NGS 技术因建库和测序过程中引物或探针的特异性、探针捕获效率、PCR 扩增中产生的偏倚、标签或接头连接的有效性、标签识别的准确性、测序仪本身的错误率、序列分析软件所致错误等，可导致基于 NGS 的遗传变异检测有一定的假阳性率，实验室需确定在 NGS 检测到的阳性结果用于疾病临床诊断和管理之前，是否需要使用其他方法对其进行确认，并且在何种情况下需对其他家庭成员进行进一步确认。同时，也可通过确认实验对样本真实性进行进一步追踪及确认^[14]。确认方法可使用 Sanger 测序等。随着测序化学和生物信息学的研究进展，NGS 的检测遗传变异的准确性逐渐提高，实验室也可建立不需要进行验证的变异需要满足的性能指标和质量参数阈值，从而减少需要确认的变异数量，缩短报告发放的周转时间，降低检测成本。例如实验室可以通过建立性能指标和质量参数阈值来确定满足要求时不需要进行 Sanger 测序验证的 SNVs 比例，但是对于具有检测技术难度的变异类型，如 indels 等是否需要进一步确认检测仍需慎重考虑^[13]。另外，通过 NGS 数据分析 CNVs 的算法仍待改进，由于覆盖深度的均一性受上游“湿实验”批次效应影响，加上 NGS 短读长带来的比对困难区域，CNVs 的检测准确性易受影响，尤其是对于基因内外显子水平的缺失和重复，因此，对 NGS 检出的 CNVs 应验证确认其准确性^[9]。

【共识 5】开展遗传病 NGS 检测的实验室应确定在 NGS 检测到的阳性结果用于疾病临床诊断和管理之前，是否需要使用其他方法如 Sanger 测序等对其进行确认，并且在何种情况下需对其他家庭成员进行进一步确认。实验室也可建立不需要进行验证的变异类型（如 SNVs）需要满足的性能参数和质量参数阈值。但是对于具有检测技术难度的变异类型（如 indels 等）是否需要进一步确认检测仍需慎重考虑。此外，目前通过 NGS 检测 CNVs 的准确性仍存在问题，尤其是对于基因内外显子水平的缺失和重复，因此，对 NGS 检出的 CNVs 应进行验证确认。

遗传变异解读及结果报告

为提高遗传变异解读的标准化和一致化，建议实验室依据 ACMG 相关指南进行序列变异（2015 年版）^[18,19]及 CNVs（2019 年版）的分类解读^[20]。序列变异和 CNVs 均应按照 ACMG 指南建议进行五级分类解读，即“致病性的（pathogenic, P）”、“可能致病性的（likely pathogenic, LP）”、“意义不明的（variant of uncertain significance, VUS）”、“可能良性的（likely benign, LB）”和“良性的（benign, B）”。序列变异及基因内 CNVs 的命名应遵循人类基因组变异学会（HGVS, <http://www.hgvs.org>）命名规则，全基因组范围内 CNVs 的命名应遵循人类细胞基因组学国际命名体系（ISCN）命名规则。同时实验室也应关注和应用 ClinGen 序列变异解读（SVI）专家组陆续发布的一系列通用建议和细则（例如 PVS1、PS2/PM6、PS3、BA1、PM3、PP5 和 BP6 等），以及针对特定基因（例如 PTEN、CDH1、PAH 等）和疾病（如 Rasopathy 和耳聋等）的解读指南。需指出的是，上述指南提供的是序列变异分类解读的“框架”，实验室应在对每一个条款正确的理解并知晓目前指南不同条款适用条件的基础上，根据本实验室患者或样本的具体情况，建立解读流程并制订 SOPs，SOPs 中需阐述如何对文献和数据库进行查阅并做到合理利用，如何评估和使用人群数据、计算和预测数据、功能数据、共分离数据、表型数据和新发数据等，以及如何对所有证据进行汇总从而得到分级解读结果^[21]，最终得到具有可操作性的变异解读 SOPs，从而保证本实验室变异解读结果的重复性和再现性。同样，检测和报告 CNVs 的实验室也需建立 CNVs 分类解读流程并制订 SOPs，充分考虑各证据类别，包括涉及的基因、剂量敏感性评估和预测、与文献中患者的临床表型重叠度、来自病例和对照数据库的证据以及遗传模式等，以及如何根据这些证据进行半定量的打分及对 CNVs 进行分类^[20]。

结果报告内容可参考“通用共识”要求^[4]，注意清楚描述所使用的技术方法及其局限性，并且报告中需有针对检测结果的遗传咨询建议，包括针对遗传模式的咨询，是否需完善家族其他成员的遗传检测，阴性结果的残余风险、阳性结果的医学建议等。阳性报告中应包含相关基因信息：基因命名、转录本、基因-疾病相关性、遗传模式、是否外显不全等。建议实验室在结果报告中详细描述支持变异解读的相关证据，包括参考文献和数据库，并说明检测到的变异是否能够充分或者部分解释患者的临床表型，从而在临床医生进行二次解读或其他实验室检测和（或）分析患者其他亲属样本时提供参考。提供靶向测序检测的实验室应提供检测的有关预期用途（临床适应症）、预期的临床敏感性和临床特异性（如果已知），以及包括的基因列表，并描述是否有排除在检测范围之外的特定区域^[9]。对于涉及多个基因的 CNVs 报告，实验室可参考相关指南建议^[20]。

对于致病性明确但与检测目的无关的非预期变异，隐性疾病的携带状态及尚无相关临床表现的意外发现（包括 ACMG 建议报道的 59 个基因^[22]），是否需要报告及报告哪类意外发现（如已知致病的或预期致病的），实验室应有相应的报告原则，确认其检测性能并描述检测局限性，如需报告，应在患者和亲属签署相关知情同意后。如进行 trio 检测，可能涉及生物学亲子关系，实验室需预先确定报告原则并充分做好知情同意^[13]。

随着文献研究的深入和新证据的不断累积，变异分类解读结果可能会改变，例如 VUS 变异可能因为更多的证据如功能实验研究、新发数据等而被重新分类为可能致病变异，也可能因为数据库中（如 EXAC/gnomAD 数据库等，exac.broadinstitute.org 或 <https://gnomad.broadinstitute.org>）正常人群测序数据的累积而被重新分类为良性变异，因此，对可疑病例，如果有临床必要性，可继续追踪相关文献和数据库，对测序数据进行再分析，实验室应结合实际情况制订是否对遗传数据进行再分析及如何进行再分析和提供修正报告的相应原则^[11,14]。

现阶段的检测报告应由具备相关资质的医生或授权签字人审核后签发。

【共识 6】开展遗传病 NGS 检测的实验室需基于 ACMG 指南对遗传变异进行五级分类解读，并在正确理解指南各条款的情况下，结合本实验室具体情况建立解读流程并制订可操作性 SOPs，保证本实验室变异解读的重复性和再现性，变异命名应遵循 HGVS 或 ISCN 规则，结果报告中应包含必要的信息，清楚描述所使用的技术方法及其局限性，并且报告中需有针对检测结果的遗传咨询建议，详细描述支持变异解读的相关证据，并说明检测到的变异是否能够充分或者部分解释患者的临床表型。对于致病性明确但与检测目的无关的非预期变异，隐性疾病的携带状态及尚无相关临床表现的意外发现是否需要报告及如何报告，实验室应有相应的报告和确认原则，如需报告，应在患者和亲属签署相关知情同意后。实验室需预先确定 trio 检测报告原则并充分做好知情同意。实验室应结合实际情况制订是否因临床需求对遗传数据进行再分析及如何进行再分析和提供修正报告的相应原则。现阶段的检测报告应由具备相关资质的医生或授权签字人审核后签发。

质量保证

实验室应建立本实验室质量保证计划，涵盖分析前、分析中和分析后各环节，预先设定每个样本或每批次检测各步骤质量控制关键核查点和相关质量控制参数，并明确规定可接受和拒绝的标准，同时预先设定需要持续监测的质量指标，根据其变化趋势决定是否需要对流程进行进一步优化。发现问题后采取纠正措施，必要时采取预防措施，并记录其对检测质量持续改进的影响^[14]。遗传病 NGS 检测各环节的质量控制关键核查点举例如下（包括但不限于）^[9]。

分析前：实验室应制定不同样本类型（例如外周血或产前羊水、绒毛样本等）及其提取的基因组 DNA 的质量要求及接受和拒绝的标准，并对每个样本进行监测和记录。涉及样本的采集、接收和保存，基因组 DNA 的浓度、纯度和总量等，产前样本建议使用荧光定量 PCR 等技术进行短串联重复序列（STR）分析以排除母源 DNA 污染。

分析中：实验室应制定每批次检测和每样本检测的分析中质量控制参数及标准。每批次质控参数包括簇密度、碱基质量、总 reads 数和无法分配给任何样本的 reads 比例等。同时，实验室可考虑在每批次检

测中通过增加外部质控品，如无模板的质控、阳性质控、阴性质控与临床样本同时检测，以监测实验室日常检测的重复性和检测的有效性。

每个样本质控参数包括文库制备参数（例如：片段大小和分布、文库浓度）、信号分离参数（例如：每个样本 reads 百分比）、read 比对参数（例如：目标区域 reads 比例、目标区域平均覆盖度、覆盖度分布）、变异识别和注释参数（例如：WES 和 WGS Ti/Tv 比值）等。

分析后：实验室应对一些质量指标进行动态监测并详细记录，例如定期进行报告统计（报告时间范围及平均报告时间，报告总数，阳性、阴性和没有确切结论的报告数，需要修改的报告数等），需进行确认检测的样本数、检测失败率、文库构建失败率、比对失败率、样本污染比例等。

建议实验室定期参加国家卫生健康委临床检验中心组织的相关室间质量评价（EQA）/能力验证（PT）计划，以评价实验室基于 NGS 方法检测和分析遗传变异的能力；尚无 EQA/PT 计划的检测项目，例如针对某些疾病相关基因的靶向测序检测，建议实验室与开展相同或相近检测项目的外部实验室交换样本进行比对；无法进行外部比对的检测项目，建议实验室定期盲样检测本实验室之前检测过的样本^[16]。

另外，对整个检测流程的记录是实验室质量保证的关键环节，有助于实验室发现问题并保证整个过程中样本的追溯溯源，记录包括但不限于检测优化和性能确认，每个样本的检测和分析过程及是否有辅助检测和确认检测，EQA/PT 相关记录，使用的仪器和试剂批号的记录，检测过程中任何偏离 SOPs 的记录等^[15]。具体可参见“通用共识”^[4]。

【共识 7】开展遗传病 NGS 检测的实验室应建立本实验室质量保证计划，涵盖分析前、分析中和分析后各环节，预先设定每个样本或每批次检测各步骤质量控制关键核查点和相关质量控制参数，并明确规定可接受和拒绝的标准，同时预先设定需要持续监测的质量指标，根据其变化趋势决定是否需要对流程进行进一步优化。发现问题后采取纠正措施，必要时采取预防措施，并记录其对检测质量持续改进的影响。实验室应定期参加国家卫生健康委临床检验中心组织的相关 EQA/PT 计划，尚无 EQA/PT 计划的检测项目，可定期与外部实验室交换样本进行比对或盲样检测本实验室之前检测过的样本。对整个检测流程的记录是实验室质量保证的关键环节。

临床遗传咨询

遗传咨询贯穿遗传变异检测的全过程，对基于 NGS 方法的检测项目进行遗传咨询时需包含一般的遗传咨询，同时考虑其特殊性^[23,24]。应由具备相关专业背景和资质的遗传咨询师或临床医生在以伦理和道德为中心、咨询对象自愿、完全知情和保护隐私等基本原则下，向患者和（或）家属进行必要的检测前和检测后遗传咨询。

NGS 检测前的遗传咨询主要包括^[25,26]：（1）告知 NGS 的检测内容、目的及其临床预期用途；（2）检测的基本原理和适应症；（3）检测的敏感性和特异性；（4）检测的局限性；（5）检测可能带来的风险；（6）检测样本和检测数据后续怎样处理；（7）可能的检测结果：阴性、阳性（致病变异或可能致病变异），特别告知可能报告“意义不明的变异”；（8）建议告知咨询对象意外发现的意义以及后续可寻求的医疗帮助，由咨询对象决定是否接受报告^[27]；（9）检测的价格和报告时间；（10）为了得到明确结果，某些情况下还需提供更多家系成员样本进行检测；（11）除 NGS 外是否还有其他检测方法可供选择，各自的优缺点等。

检测后的遗传咨询主要包括^[26,28,29]：（1）报告遗传变异的性质及与受检者临床表型的关系；（2）针对目前检测结果是否还需进一步的检测；（3）有关受检者的治疗和临床干预；（4）家庭生育计划，提供再发风险和生育建议；（5）亲属的变异携带风险和建议等。

另外针对不同的检测目的，还要有侧重性的遗传咨询，例如携带者筛查更要强调检测的阳性预测值、残余风险值、局限性和生育选择的建议；遗传病诊断更强调检测的目的、敏感性和特异性以及变异的性质和临床表型的关系^[26]。产前诊断遗传咨询需更加谨慎，因为会面临更多问题，例如不确定的报告结果导致受检者决定终止妊娠，因此遗传咨询及知情同意尤为重要。

【共识 8】 基于 NGS 方法的遗传检测项目应由具备相关专业背景和资质的遗传咨询师或临床医生在检测前和检测后对患者及其家属进行遗传咨询，咨询应在以伦理和道德为中心、咨询对象自愿、完全知情和保护隐私等基本原则下进行。进行遗传咨询时需包含一般的遗传咨询，同时考虑 NGS 检测的特殊性。另外针对不同的检测目的，如携带者筛查、遗传病诊断和产前诊断，还要有侧重性的遗传咨询。

总结

本共识阐述了高通量测序在遗传病领域临床检测规范化应用的基本原则，应用 NGS 技术进行遗传变异检测的实验室可按照本共识进行实验室的总体设计、检测方法的设计和性能确认、遗传变异解读及结果报告、质量保证和遗传咨询，最大可能地为临床提供准确可靠的遗传变异检测结果，需要注意的是在临床应用，NGS 检测结果还应充分结合家族史、疾病表型和其他辅助检查结果，综合评估后做出临床决策。另外，鉴于 NGS 技术在遗传病临床应用领域的迅速发展，本共识将适时修订，以适应临床规范化应用的需求。

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：张括（国家卫生健康委临床检验中心）；马祎楠（北京大学第一医院实验中心）；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）；杨航（中国医学科学院阜外医院实验诊断中心）；刘哲[百世诺（北京）医学检验实验室有限公司]；周维真（中国医学科学院阜外医院实验诊断中心）；马懿[安塞斯（北京）生物技术有限公司]；曹彦东[安塞斯（北京）生物技术有限公司]；魏星（北京华诺奥美医学检验实验室有限公司）；喻长顺（北京金域医学检验实验室）；郑焱（广州凯普生物科技股份有限公司）

共识制定专家组成员（按姓氏汉语拼音排序）：陈晓丽（首都儿科研究所遗传研究室）；戴朴（中国人民解放军总医院第一医学中心耳鼻咽喉头颈外科）；郝婵娟（国家儿童医学中心，首都医科大学附属北京儿童医院，北京市儿科研究所出生缺陷遗传学研究室）；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）；刘晓红（北京市海淀区妇幼保健院产前诊断中心）；马祎楠（北京大学第一医院实验中心）；王静敏（北京大学第一医院儿科）；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实验诊断中心）

致谢 安塞斯（北京）生物技术有限公司；百世诺（北京）医学检验实验室有限公司；广州凯普生物科技股份有限公司；北京华诺奥美医学检验实验室有限公司

参考文献

- [1] 国家卫生计生委个体化医学检测专家委员会.遗传病相关个体化医学检测技术指南（试行）[S].2015.
- [2] AmbergerJS, BocchiniCA, SchiettecatteF, et al. **OMIM.org: online mendelian inheritance in man (OMIM), an online catalog of human genes and genetic disorders**[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): D789-798. DOI: [10.1093/nar/gku1205](https://doi.org/10.1093/nar/gku1205).
- [3] WrightCF, FitzPatrickDR, FirthHV. **Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children**[J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(5): 325. DOI:[10.1038/nrg.2018.12](https://doi.org/10.1038/nrg.2018.12).
- [4] 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).
- [5] 李金明.高通量测序技术[M].北京：科学出版社，2018.
- [6] 中华人民共和国卫生部办公厅.卫办医政发[2010]194 号临床基因扩增检验实验室管理暂行办法[S]. 2010.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会令. [2019]2 号.产前诊断技术管理办法[S]. 2019.
- [8] StrandeNT, RiggsER, BuchananAH, et al. **Evaluating the clinical validity of gene-disease**

associations: an evidence-based framework developed by the clinical genome resource[J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 100(6): 895-906. DOI:[10.1016/j.ajhg.2017.04.015](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.015).

[9] BeanLJH, FunkeB. **Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)**[J]. *Genet Med*, 2019. DOI: [10.1038/s41436-019-0666-z](https://doi.org/10.1038/s41436-019-0666-z). [Epub ahead of print]

[10] RehmHL, BergJS, BrooksLD, et al. **ClinGen—The clinical genome resource**[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(23): 2235-2242. DOI:[10.1056/NEJMSr1406261](https://doi.org/10.1056/NEJMSr1406261).

[11] SantaniA, MurrellIJ, FunkeB, et al. **Development and validation of targeted next-generation sequencing panels for detection of germline variants in inherited diseases**[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(6): 787-797. DOI:[10.5858/arpa.2016-0517-RA](https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0517-RA).

[12] SantaniA, SimenBB, BriggsM, et al. **Designing and implementing ngs tests for inherited disorders: a practical framework with step-by-step guidance for clinical laboratories**[J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(3): 369-374. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2018.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.11.004).

[13] HegdeM, SantaniA, MaoR, et al. **Development and validation of clinical whole-exome and whole-genome sequencing for detection of germline variants in inherited disease**[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(6): 798-805. DOI:[10.5858/arpa.2016-0622-RA](https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0622-RA).

[14] 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)

[15] 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).

[16] College of American Pathologists. **Molecular pathology checklist: CAP accreditation program**[S]. 2015.

[17] 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).

[18] RichardsS, AzizN, BaleS, et al. **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).

[19] 王秋菊, 沈亦平, 陈少科,等.**遗传变异分类标准与指南**[J].*中国科学:生命科学*, 2017, 47(6): 668-688. DOI:[10.1360/N052017-00999](https://doi.org/10.1360/N052017-00999).

[20] RiggsER, AndersenEF, CherryAM, et al. **Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)**[J]. *Genet Med*, 2020, 22(2): 245-257. DOI:[10.1038/s41436-019-0686-8](https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8).

[21] Clinical Genome Resource. **ClinGen General Sequence Variant Curation Process. Standard Operating Procedure**. [EB/OL].

(2019). https://www.clinicalgenome.org/site/assets/files/3677/clingen_variant-curation_sopv1.pdf.

[22] HegdeM, BaleS, Bayrak-ToydemirP, et al. **Reporting incidental findings in genomic scale clinical sequencing—a clinical laboratory perspective: a report of the Association for Molecular Pathology**[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(2): 107-117. DOI:[10.1016/j.jmoldx.2014.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.10.004).

- [23] YangM, KimJW. **Principles of genetic counseling in the era of next-generation sequencing**[J]. Ann Lab Med, 2018, 38(4): 291-295. DOI:[10.3343/alm.2018.38.4.291](https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.4.291).
- [24] LewisMA, BonhommeN, BlossCS. **A New Era, New strategies: education and communication strategies to manage greater access to genomic information**[J]. Hastings Cent Rep, 2018, 48Suppl 2: S25-S27. DOI:[10.1002/hast.880](https://doi.org/10.1002/hast.880).
- [25] ACMG Board of Directors. **Points to consider for informed consent for genome/exome sequencing**[J]. Genet Med, 2013, 15(9):748-749. DOI: [10.1038/gim.2013.94](https://doi.org/10.1038/gim.2013.94).
- [26] FondaAJ, StollK, BernhardtBA. **Pre-and post-test genetic counseling for chromosomal and Mendelian disorders**[J]. Semin Perinatol, 2016, 40(1): 44-55. DOI:[10.1053/j.semperi.2015.11.007](https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.11.007).
- [27] RocheMI, BergJS. **Incidental findings with genomic testing: implications for genetic counseling practice**[J]. Curr Genet Med Rep, 2015, 3(4): 166-176. DOI:[10.1007/s40142-015-0075-9](https://doi.org/10.1007/s40142-015-0075-9).
- [28] TuckerM. **The current state of genetic counseling and newborn screening: an interview with megan tucker**[J]. Future Sci OA, 2017, 3(3): Fso181. DOI:[10.4155/fsoa-2017-0017](https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0017).
- [29] EdwardsJG, FeldmanG, GoldbergJ, et al. **Expanded carrier screening in reproductive medicine-points to consider: a joint statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine**[J]. Obstet Gynecol, 2015, 125(3): 653-662. DOI:[10.1097/aog.0000000000000666](https://doi.org/10.1097/aog.0000000000000666).