

《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》评述^{*}

冯刚 熊蓉 刘康

(南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院组织工程与干细胞研究所·肿瘤生物治疗南充市重点实验室,四川南充 637000)

【摘要】 高通量测序技术以其高输出量、高解析度的显著优势,在肿瘤基因检测领域被广泛应用。中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会和中国肿瘤驱动基因分析联盟制定了《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》,本文结合该共识从二代测序技术(NGS)检测在肿瘤精准诊断中的应用价值、检测流程和质量保证、结果报告等方面进行简要评述,以指导临床医师和 NGS 检验从业人员更好地进行临床应用。

【关键词】 二代测序;肿瘤;精准医学;专家共识;评述

【中图分类号】 R446 **【文献标志码】** A **doi:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2020. 11. 001

Interpretation of expert's consensus on the application of The Second Generation Sequencing Technology in accurate medical diagnosis of cancer

FENG Gang, XIONG Rong, LIU Kang

(Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong Key Laboratory of Cancer Biotherapy, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 High-throughput sequencing technology is widely used in the field of tumor gene detection because of its significant advantages of high output and high resolution. The expert Committee of tumor markers of the Chinese Society of Clinical Oncology and the China tumor-driven Gene Analysis Union have formulated the expert consensus on the application of the second generation sequencing technology in accurate medical diagnosis of tumors. In order to guide clinicians and NGS practitioners to better carry out clinical practice, this paper combined with this consensus briefly interprets the application value of NGS detection in accurate diagnosis of tumors, the detection process and quality assurance of NGS, and the report and interpretation of the results.

【Key words】 Next Generation Sequencing; Tumor; Precision medicine; Consensus; Interpretation

基金项目:四川省科技计划重点研发项目(2018SZ0377);肿瘤生物治疗南充市重点实验室项目(NCKL201904);南充市市校合作科研专项资金(18SXHZ0366)

执行编委简介:冯刚,二级教授,硕士研究生导师,南充市中心医院副院长,川北医学院组织工程与干细胞研究所所长。兼任中国中西医结合学会骨伤科分会椎间盘修复与退变专家委员会常务委员、中国医药卫生事业发展基金会功能医学专业委员会常务委员、中国医师协会骨科医师分会脊柱微创修复与重建学组委员。四川省千人计划专家、四川省学术和技术带头人、四川省卫生厅学术技术带头人、南充市杰出人才。主要研究领域集中在椎间盘、骨和软骨组织工程,肿瘤发病机制及生物治疗临床转化,以及基于全基因组测序的精准医学研究三个方面。主持、主研国家、省、市等各级科研项目 20 余项。发表学术论文 100 余篇,其中 SCI 论文 30 余篇,授权国家发明专利 2 项。获得军队科技进步奖二等奖、四川省医学科技奖一等奖等科研成果奖励 8 项,参编专著和高校教材 3 部。

共同第一作者:熊蓉, E-mail: xiongrong2019214@163.com

通信作者:刘康,副研究员,硕士研究生导师, E-mail: liukang@nsmc.edu.cn

第二代高通量测序技术也称为下一代测序技术(Next Generation Sequencing, NGS),其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。因 NGS 在通量、成本和效率方面的优势,其在实体肿瘤体细胞基因突变中展现了广阔的应用前景。NGS 检测流程复杂,需要严格的实验室条件,对人员能力及质量管理要求高。为确保 NGS 在临床肿瘤精准诊疗中的顺利开展,规范在使用过程中包括检测技术、数据管理、分析与报告、解读与临床咨询等方面的操作流程,中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会和中国肿瘤驱动基因分析联盟结合国内外相关指南、共识和最新研究进展,结合我国国情制定了《二代测序技术在肿瘤精准医学诊

断中的应用专家共识》^[1] (以下简称“共识”), 具有面向全行业的指导意义。本文对该共识进行评述, 以指导肿瘤科医师和 NGS 检验人员更好地进行临床实践。

1 《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》要点

该共识阐述了 NGS 技术质量需求、临床肿瘤相关 NGS 检测内容、样本处理、测序流程、数据管理、信息学分析、结果报告与咨询等多个方面的内容, 同时也对患者知情同意、研究与诊断的应用差别、监督管理等内容进行了说明, 见表 1。

2 NGS 检测在肿瘤精准诊断中的应用价值

基于 NGS 的分析可用于评估整个基因组、外显子、特定基因突变、单基因或重复变异的“热点”区域。该共识强调用于临床肿瘤分子诊断的 NGS 项目应是能够带来明确的益处, 且是经过充分分析和临床验证的, 未进行充分分析和临床验证的 NGS 技术不应在临床诊断中应用。另外, 对于已有临床意义的分子变异结果的研究项目需进一步在诊断条件下确证后才可用于临床实践。

随着肿瘤发病人数逐年增加及靶向药物不断上市, NGS 检测在肿瘤分型、指导临床用药以及患者用药疗效监测和预后方面已经得到了广泛应用和认可。NGS 分析可以预测与化疗和靶向治疗相关的总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)^[2-4]。基于 NGS 的诊断, 具有高肿瘤突变负荷(TMB)的非小细胞肺癌(NSCLC)患者在接受靶向治疗和化疗后获得显著更长的PFS^[5-6]。同样, 根据基于 NGS 的诊断, 在化疗的基础上增加靶向治疗可以提高具有高肿瘤突变负荷的转移性结直肠癌(CRC)患者以及具有野生型KRAS和NRAS基因患者的存活率^[7]。此外, NGS 检测还可以预测乳腺癌和卵巢癌、急性髓系白血病(AML)和几种难治性肿瘤与化疗和靶向治疗相关的OS和PFS^[8-13]。

3 NGS 肿瘤基因检测流程

3.1 知情同意 该共识指出, 在开展 NGS 检测项目之前应向患者提供知情同意或相关遗传咨询, 应充分向患者解释疾病条件下进行 NGS 检测的目的和利弊。并且向医师及患者告知测试的局限性, 包括驱动基因的信息、报告范围、技术分析的灵敏度和特异度等。同时, 该共识也对知情同意书的内容进行了规范, 包括基因检测的依据、检测的局限性、检测结果是否用于辅助个体化治疗须由临床医师决定以及检测机构对患者信息的保密等。

3.2 样本采集 合格的样本是确保 NGS 检测结果

可靠的前提。临床医师应依据患者的疾病情况经多学科讨论和患者充分的知情同意后在关键时间节点收集标本进行 NGS 分析, 为患者争取最大的获益。可用于实体肿瘤体细胞基因突变检测的样本类型优先选用新鲜组织标本, 也可以选用甲醛固定-石蜡(FFPE)样本、血浆、胸腹水等。实验室应制定每一种类型样本采集、运送、接收和保存的各环节标准化作业流程体系(Standardized operation process system, 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。除血浆样本来源的 DNA/RNA 外, 其他样本应正确估计肿瘤细胞含量, 一般情况下, 建议 NGS 检测的组织样本中肿瘤细胞含量达到 20% 以上, 血液样本采集量至少 8 mL。样本的采集过程、分析前的运输和处理流程以及病理的评估结果等均应做相应的记录。

3.3 NGS 实验室检测流程 开展高通量测序临床检测的实验室应依据卫办医政发 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。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。操作人员应具有完成实验操作的能力, 能够对样本中肿瘤细胞含量和数量进行正确评估。各类样本的储存、核酸提取及 NGS 分析应在通过验收的临床基因扩增检验实验室完成。NGS 检测整个流程中的每个环节, 包括样本质控/质量保证、样本预处理、接头连接、预扩增、基因组靶区的捕获、靶区纯化、扩增文库构建、质控定量后上 NGS 测序检测等都应建立具有可操作性的 SOPs、质量标准和完整的操作记录。NGS 试剂应独立存放, 防止交叉污染。

3.4 NGS 检测数据生物信息学分析 NGS 检测产生的数据庞大, 主要的分析流程包括初步分析、接头序列去除、引物序列去除、低质量序列去除、参照基因组序列比对、去重、插入或缺失重复比对、碱基质量得分校正、突变识别、注释、过滤后输出等步骤, 不同肿瘤的 NGS 数据分析应遵循以上流程。应严格按照 SOPs 指导进行质量检查, 执行接受与拒绝的标准。该共识指出, 临床肿瘤组织样本的 NGS 检测数据有效深度应达到 500 倍以上。其次, 检测实验室必须采用结构化的数据库来注释单碱基位点变异、插入或缺失、重拍(融合)、拷贝数变异等各类变异信息, 数据储存格式应采用通用的 FASTQ、BAM、VCF 格式, 便于数据交换及实验室间评价, 并应对所采用的数据分析工具(软件)进行能力验证。此外, 应区分体细胞与胚

表 1 共识要点简介

Table 1 Brief introduction to key points of consensus

声明所属范畴	声明内容	补充说明
NGS 的质量需求	1、应符合相应的诊断技术标准	靶向用药、分子分型或疗效预测、预后判断等 需多学科专家共同讨论后制定
	2、检测项目的目的和临床意义明确	
NGS 在临床肿瘤应用的检测内容	3、明确用于临床分子诊断 NGS 检测项目的核心基因名单	说明其基因型与潜在可靶向作用位点或通路的关系
	4、医师需根据基因型的检测结果来指导临床诊疗方案	
样本处理	5、及时更新检测内容	应提供分析敏感性和特异性的参数
	6、应对每个基因变异位点进行明确的注释	
测序技术及流程	7、检验流程和生物信息学分析需针对特定平台和分析项目进行充分优化和标准化	不同类型的样本收集和处理应建立明确的 SOP
	8、需高质量的临床生物材料样本	
NGS 数据的产生、管理、信息学分析	9、样本应在 NGS 分析有唯一的标识性	同一患者的不同来源的样本均有唯一的标识 肿瘤细胞含量 >20% 或核酸含量 >50 ng 包括浓度、纯度、长度和完整性分析
	10、应有充分的样本评估和起始核酸用量	
NGS 结果报告与咨询	11、应对抽提后和文库构建后的核酸样本进行质控	应在通过审核验收的临床基因扩增实验室完成
	12、应预留生物材料用于后续验证	
知情同意	13、需符合严格得检测环境要求	独立存放,防止交叉污染
	14、应对试剂进行严格得管理和质控	
NGS 用于研究与诊断的区别	15、每个特定的 NGS 测试项目均需经过严格技术验证合格后才可用于临床肿瘤检测	强烈建议个实验室参加 NGS 相关的室间质量评估 整个检测流程中每个步骤的操作和质量控制都应建立 SOP
	16、应制定有明确的检测流程	
知情同意	17、NGS 技术检测项目应达到标准化	需经过充分培训的专职实验操作人员、并配有专门的质控人员
	18、人员配备和熟练程度应满足实践需求	
知情同意	19、需使用核心基因清单与相应的检测标准品用于各个实验室的质控比较	建立评分体系用于对实验室间 NGS 检测能力的分析与认证 也应有详细的内部软件验证记录
	20、应对所采用的数据分析工具(软件)进行能力验证	
知情同意	21、检测实验室应规范数据产生和管理存储流程	应长期保存相关数据集(至少 15 年) 设置并执行接受与拒绝的标准
	22、数据存储应采用通过的 FASTQ、BAM、VCF 格式	
知情同意	23、应有严格的操作规程指导原始数据的质量检查	特定的胚系突变的生物学意义需说明
	24、不同瘤种的 NGS 数据分析应遵循相同的基本流程	
知情同意	25、体细胞与胚系来源的变异应加以区分	组织样本的测序有效深度应达到 500 倍以上;血浆样本应达到 1000 倍以上
	26、应对各个瘤种中具有明确或重要临床意义的基因变异进行关系分析和说明	
知情同意	27、建议临床肿瘤 NGS 检测应达到有效测序深度	报告内容应包括患者身份标识号、疾病信息、样本信息、分析技术信息、主要结果、结果解释、操作员和实验室专家签名等
	28、CAGC 项目数据的管理应在标准流程和各类数据管理方面实现同一化	
知情同意	29、报告格式和内容需标准化,应能适合短期未来的发展趋势	充分提供必要信息给临床医师
	30、报告范围应根据测试目的及测序能够达到质量要求的覆盖范围来决定	
知情同意	31、NGS 报告应简明扼要、明确易懂	对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 ^[15]
	32、结果解释需客观中肯,平实地描述肿瘤突变结果	
知情同意	33、遗传咨询需多学科支持	充分向患者解释 NGS 检测的目的和局限性等,让其知悉知情同意书内容并签署 纳入临床实践的项目必须是经规范化或标准化的测试分析验证后确有临床意义的
	34、应向患者提供知情同意或相关遗传咨询	
知情同意	35、研究项目获得有临床意义的分子变异结果需进一步在诊断条件下确证后才可纳入患者的医疗记录	通过 NGS 建立的大数据库,有助于对疾病的比对分析、以及变异分类
	36、研究和诊断的检测结果都应建立数据库管理	

系来源的变异,并对各个瘤种中具有明确或重要临床意义的基因变异进行关注分析和说明。并且,对于研究和诊断的检测结果都应建立相应数据库进行规范化管理。

3.5 结果报告 NGS 的报告应遵循首页简明、结果明确、解释清楚、信息充分的原则,报告格式和内容需标准化。报告反映的结果应根据测试目的及测序能够达到的质量要求的覆盖范围来决定。具有临床靶向意义的检测结果及其参数应优先报告,核心基因检测结果必须明确报告,对于特别的突变可特别进行报告。结果解释需客观中肯,平实地描述肿瘤突变结果,是否用于临床决策需经临床医师或多学科专家充分讨论后,给出合理的个体化精准治疗方案。

3.6 质量保证 质量保证包括样本环节质控、核酸质控、测序结果质控。样本质控是第一道质控,目的是确定我们检测的是肿瘤组织,而不是正常细胞。质量参数是肿瘤细胞含量,肿瘤细胞的含量会影响突变丰度,并最终影响阳性突变阈值的判定,一般要求肿瘤细胞的含量要大于 20%^[14-15]。肿瘤细胞含量过低会造成漏检和假阴性。核酸质控的关键参数是核酸的提取量和降解程度(提取质量),不同检测机构的核酸投入量不同,满足需求即可。若是由于样本包埋操作或存放不当造成了样本核酸的降解,则会影响最终的检测质量。测序环节的质控参数较多,我们只需特别关注测序深度即可,因为只有有效测序深度下的数据才是用于突变分析的数据,有效测序深度过低容易造成假阴性或假阳性^[16-17]。该共识建议,NGS 测序有效深度应达到 500 倍以上,血浆游离 DNA 标本的有效测序深度应达到 1000 倍以上。

4 小结与展望

随着 NGS 的不断发展和临床经验积累,临床医师、NGS 检验从业人员及其他相关人员需对 NGS 的检测项目和应用现状有全面、正确的认识。本文对共识中 NGS 在肿瘤精准诊疗中的应用价值、科学规范的实验室检测管理、客观真实的结果报告以及详尽合理的结果解释等方面进行了评述,以期对 NGS 在肿瘤精准诊疗方面起到规范化的作用,从而提高我国恶性肿瘤的诊疗水平。

【参考文献】

[1] 吴一龙,张绪超,梁智,等. 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(26): 2057-2065.

[2] CHALMERS Z R, CONNELLY C F, FABRIZIO D, *et al.* Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1):34.

[3] 中华医学会,中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社. 中华医学会肿瘤临床诊疗指南(2019 版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2020, 42(4): 257-287.

[4] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2093-2104.

[5] MOTOI N, YATABE Y. Lung cancer biomarker tests: the history and perspective in Japan [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020,9(3):879-886.

[6] HELLMANN M D, NATHANSON T, RIZVI H, *et al.* Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Cell*,2018, 33(5): 843-852.

[7] INNOCENTI F, OU F S, QU X, *et al.* Mutational analysis of patients with colorectal cancer in CALGB/SWOG 80405 identifies new roles of microsatellite instability and tumor mutational burden for patient outcome [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(14): 1217-1227.

[8] CAPOLUONGO E, ELLISON G, LÓPEZ-GUERRERO J A, *et al.* Guidance Statement On BRCA1/2 Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients [J]. *Semin Oncol*,2017,44(3):187-197.

[9] MOORE K, COLOMBO N, SCAMBIA G, *et al.* Maintenance Olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*,2018, 379(26): 2495-2505.

[10] HEIMANN P, DEWISPELAERE L. Indications of next-generation sequencing in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Curr Opin Oncol*,2020,32(5): 391-397.

[11] SICKLICK J K, KATO S, OKAMURA R, *et al.* Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy [J]: The I-PREDICT study *Nat Med*, 2019, 25(5): 744-750.

[12] KLCO J M, MILLER C A, GRIFFITH M, *et al.* Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *JAMA*,2015, 314(8): 811-822.

[13] RADOVICH M, KIEL P J, NANCE S M, *et al.* Clinical benefit of a precision medicine based approach for guiding treatment of refractory cancers [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56491-56500.

[14] HUME S, NELSON T N, SPEEVAK M, *et al.* Canadian College of Medical Geneticists (CCMG). CCMG practice guideline: laboratory guidelines for next-generation sequencing [J]. *J Med Genet*,2019, 56(12): 792-800.

[15] 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.

[16] PETRACKOVA A, VASINEK M, SEDLARIKOVA L, *et al.* Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics [J]. *Front Oncol*,2019, 9: 851.

[17] GARGIS A S, KALMAN L, LUBIN I M. Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(12): 2857-2865.