

基于下一代测序技术的BRCA1/2基因检测指南(2019版)



扫一扫下载指南原文

《基于下一代测序技术的BRCA1/2基因检测指南(2019版)》编写组

执笔人:吴焕文(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科100730)

通信作者:梁智勇(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科100730),

Email:liangzhiyong1220@yahoo.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.09.002

Guideline on next-generation sequencing-based BRCA1/2 testing (2019)

Working Group of Guideline on Next-Generation Sequencing-Based BRCA1/2 Testing (2019)

Corresponding author: Liang Zhiyong, Email: liangzhiyong1220@yahoo.com

【摘要】 BRCA1/2基因检测有着重要的临床意义,有助于评估乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌等相关肿瘤的发病风险,并可以协助制定患者的精准诊疗方案。为建立基于下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术的BRCA1/2基因检测的方法学标准,编写组在2018年《基于NGS技术的BRCA基因检测流程中国专家共识》的基础上,组织国内分子病理及临床专家,补充相关领域更新,并结合国内检测现状,形成《基于NGS技术的BRCA1/2基因检测指南(2019版)》,对BRCA1/2基因检测的适用人群及检测流程进行了梳理,旨在进一步指导和规范BRCA1/2基因检测的临床应用,优化患者的个体化诊疗实践。

乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene, BRCA)是重要的抑癌基因,包括BRCA1和BRCA2^[1-2]。BRCA1/2基因是评估乳腺癌、卵巢癌和其他相关肿瘤发病风险的重要生物标志物,也是影响患者个体化治疗方案选择的生物标志物,所以BRCA1/2基因检测具有重要的临床意义。由于BRCA1/2基因没有热点变异,且变异遍布于2个基因的全长^[3-4],国内对于BRCA1/2基因检测一般采用下一代测序(next-generation sequencing, NGS)或称高通量测序的方法,但NGS流程复杂,各实验室之间技术参数差异大,检测水平参差不齐。为建立基于NGS技术的BRCA1/2基因检测的方法学标准以及规范临床检测操作,中华医学会病理学分会组织国内分子病理学领域的相关专家,于2018年发表《基于NGS技术的BRCA基因检测流程中国专家共识》^[5],对BRCA1/2基因检测流程的规范起到了积极的推动作用。本指南以该共识为基础,经过专家组讨论,补充相关领域的更新,主要包括BRCA1/2基因检测的适用人群、样本要求、临床路径等,旨在进一步建立BRCA1/2基因检测规范,加强内外部质

量控制意识,优化检测路径,以提高BRCA1/2检测的准确性和可重复性,更有效地进行遗传风险评估、治疗决策和预后判断,指导临床实践。

一、BRCA1/2基因检测的意义

1. BRCA1/2基因突变与肿瘤的遗传易感性: BRCA1/2通过同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)途径对DNA双链断裂进行修复,若BRCA1/2基因突变导致BRCA1/2蛋白功能缺陷,会影响基因组的稳定性,并引起多种肿瘤的发生^[3]。约5%~10%的乳腺癌和15%~22%的卵巢癌是由BRCA1/2基因突变导致的^[6-7]。BRCA1/2基因致病性突变使女性发生乳腺癌风险提高5倍,发生卵巢癌风险提高10~30倍^[8-10]。一项研究结果显示,美国普通女性至70岁时只有11%的概率死于乳腺癌或卵巢癌,而BRCA1/2基因突变携带者死于这2种肿瘤的概率达56%~77%^[11]。所以,携带BRCA1/2基因突变不仅显著地增加了女性罹患乳腺癌和卵巢癌的风险,也极大地提高了女性死于这2种肿瘤的概率。BRCA1/2基因突变还会显著增加前列腺癌、胰腺癌、男性乳腺癌、黑色素瘤

等的发病风险^[12-15]。了解 BRCA1/2 基因状态,有助于进行相关的遗传风险管理,包括采取预防性手术、制定定期筛查方案、对家属遗传风险进行评估等^[16-17]。

2. 治疗选择与预后:(1)BRCA1/2 基因突变与铂类化疗:铂类化疗药物通过引起 DNA 损伤破坏基因组稳定性,引起细胞死亡,被广泛应用于临床一线治疗各种肿瘤,包括卵巢癌和乳腺癌等。BRCA1/2 基因突变的癌细胞存在同源重组修复缺陷,影响 DNA 双链断裂修复过程,导致癌细胞对于诱导 DNA 双链断裂的化疗药物较为敏感^[18]。已有多项研究结果表明,携带 BRCA1/2 基因突变的卵巢癌患者在接受铂类药物治疗后获益更显著,具有更高的总生存率和无进展生存率^[19-20];晚期或复发、转移性三阴性乳腺癌患者若携带 BRCA1/2 基因突变,对铂类化疗有着更高的客观缓解率(objective response rate)^[21];也有研究表明,局部晚期及转移性胰腺癌患者若携带 BRCA1/2 突变,接受铂类为基础的化疗有着更高的总生存率^[22]。(2)BRCA1/2 基因突变与聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 [Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 抑制剂的合成致死 (synthetic lethality) 效应:PARP 是一种修复 DNA 单链损伤至关重要的酶,当 PARP 抑制剂选择性抑制 PARP 介导的 DNA 单链损伤修复途径时,未修复的 DNA 单链损伤经过复制后将转化为 DNA 双链断裂。正常细胞可通过同源重组修复 DNA 双链断裂,然而在 BRCA1/2 基因突变的肿瘤细胞中,因为同源重组修复功能的缺陷, DNA 双链断裂得不到修复, DNA 损伤不断积累,最终导致细胞死亡,即合成致死效应^[23]。已有文献报道,携带 BRCA1/2 基因突变的乳腺癌患者接受 PARP 抑制剂类药物治疗相比传统化疗,中位无进展生存期延长 2.8 个月,疾病进展或死亡风险降低 42%^[24];对于携带 BRCA1/2 基因突变的新诊断卵巢癌患者,在一线铂类化疗后使用 PARP 抑制剂进行维持治疗,中位随访时间 41 个月后,疾病进展或死亡风险对比安慰剂降低 70% 以上^[25]。对于一线接受铂类化疗未进展且携带 BRCA1/2 基因突变的转移性胰腺癌患者,使用 PARP 抑制剂维持治疗相比安慰剂显著延长患者的中位无进展生存期(7.4 个月比 3.8 个月),疾病进展或死亡风险降低 47%^[26]。携带 DNA 损伤反应 (DNA damage response, DDR) 基因 (包括 BRCA1/2、PALB2、ATM、CHEK2 等) 突变的转移性去势抵抗的前列腺癌患者,可以显著地获益于

PARP 抑制剂的治疗,文献报道总缓解率 (overall response rate) 最高可达 88%^[27-28]。(3)BRCA1/2 基因突变与相关肿瘤预后:肿瘤预后判断需要考虑多种临床病理及分子指标。对于卵巢癌患者来讲, BRCA1/2 基因突变状态是一个指示患者预后的重要因素。有研究报道,携带 BRCA1/2 基因突变的卵巢癌患者相比于 BRCA1/2 基因野生型的患者有着更好的预后,无进展生存期和总生存期均高于野生型患者,且 BRCA2 基因突变的卵巢癌患者相比于 BRCA1 基因突变者预后更好^[29-30]。而对于乳腺癌患者,从目前的研究中尚不能得到一致的结论^[31-32],因此 BRCA1/2 基因状态是否与乳腺癌患者预后直接相关仍需要更多的研究证据来明确。

综上, BRCA1/2 基因检测可以有助于评估相关肿瘤的遗传易感性、制定相应的遗传管理措施 (包括采取预防性手术、制定定期筛查方案、家属遗传风险评估等),还可以协助制定精准诊疗方案以及判断肿瘤患者的预后等。

二、BRCA1/2 基因检测的适用人群

随着研究进展, BRCA1/2 检测的适用人群会不断更新和拓展。新近的国内外权威指南和专家共识均推荐符合一定条件的肿瘤患者及高风险人群进行 BRCA1/2 基因突变检测。在遗传性风险评估方面,《美国国立综合癌症网络 (NCCN) 乳腺和卵巢遗传性/家族性高风险评估指南》(2019 V3 版) 推荐满足以下一条或以上条件的肿瘤患者或高风险人群进行个体化风险评估、遗传咨询及 BRCA1/2 基因检测:来自于携带已知 BRCA1/2 基因致病/可能致病突变的家系中的个体,满足特定条件的乳腺癌患者 (如发病年龄在 45 岁及以下的乳腺癌患者、发病年龄在 60 岁及以下的三阴性乳腺癌患者、满足一定家族史条件的乳腺癌患者等), 卵巢癌 (包括输卵管癌及原发性腹膜癌) 患者, 男性乳腺癌患者, 胰腺癌患者, 转移性前列腺癌患者, 满足一定家族史条件的高级别前列腺癌患者, 肿瘤检测发现 BRCA1/2 基因致病/可能致病突变但是没有进行胚系突变分析的任何类型肿瘤患者, 所有能够因基因检测而有可能受益于靶向治疗的 BRCA1/2 相关肿瘤患者 (无论家族史情况, 例如能够受益于 PARP 抑制剂的卵巢癌和转移性 HER2 阴性乳腺癌患者, 能够受益于铂类化疗的前列腺癌患者等), 不符合以上标准但有 ≥1 位一级或二级亲属符合以上任何一条的个体 (需要讨论对未患病者检测结果解读的局限性)^[33]。

在指导临床治疗选择方面,《NCCN 卵巢癌、输

卵管癌及原发性腹膜癌临床实践指南》(2019 V1版)推荐所有卵巢癌、输卵管癌及原发性腹膜癌患者在确诊时接受BRCA1/2基因检测(包括胚系和/或体细胞BRCA1/2基因检测),推荐复发或抵抗时在治疗前对肿瘤组织进行分子检测,至少应包括BRCA1/2基因,微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)或DNA错配修复(mismatch repair, MMR)等检测^[34]。《NCCN乳腺癌临床实践指南》(2019 V1版)强烈推荐HER2阴性乳腺癌患者进行胚系BRCA1/2基因检测^[35]。《NCCN胰腺癌临床实践指南》(2019 V2版)推荐所有胰腺癌患者在确诊时接受遗传性肿瘤综合征相关的胚系多基因检测,包括BRCA1/2等;推荐局部晚期及转移性胰腺癌患者进行肿瘤/体细胞基因检测以发掘罕见但可用药的基因突变,包括BRCA1/2等;优先考虑肿瘤组织检测,当无法获取肿瘤组织时,可考虑ctDNA检测^[36]。《NCCN前列腺癌临床实践指南》(2019 V2版)对前列腺癌高风险及以上患者,局部进展(N1M0)患者,转移性(M1)患者,有家族史的患者,及导管内癌患者推荐进行胚系基因检测,包括同源重组修复基因BRCA1、BRCA2、ATM、PALB2、CHEK2及Lynch综合征相关基因MLH1、MSH2、MSH6、PMS2等;对N1M0与M1患者考虑进行肿瘤分子检测,包括BRCA1、BRCA2、ATM、PALB2、FANCA、RAD51D、CHEK2等同源重组修复基因的检测,及微卫星不稳定性检测或错配修复缺陷检测等^[37]。

《中国晚期上皮性卵巢癌维持治疗专家共识(2019版)》推荐初治卵巢癌患者在获得病理诊断后,复发或未控时,进行肿瘤分子检测,检测内容至少包括BRCA1/2基因、同源重组修复通路的相关基因、错配修复基因或微卫星不稳定性状态^[38];《中国乳腺癌患者BRCA1/2基因检测与临床应用专家共识(2018年版)》推荐符合一定临床特征的乳腺癌患者进行BRCA1/2基因筛查,如发病年龄在40岁以下的乳腺癌患者,60岁以下的三阴性乳腺癌患者,所有男性乳腺癌患者,满足一定家族史条件的乳腺癌患者等^[39];《中国前列腺癌患者基因检测专家共识(2019年版)》推荐高风险及以上、局部进展(N1)及转移性(M1)前列腺癌患者,前列腺导管内癌或导管腺癌患者,及满足一定家族史条件的患者进行NGS基因胚系变异检测,对转移性去势抵抗性前列腺癌(metastatic castration-resistant prostate cancer)患者推荐进行胚系检测以及肿瘤检测;检

测基因包括BRCA1/2等同源重组修复基因及其他DNA修复基因等;对家族史不详患者,或肿瘤组织检测已发现与肿瘤发病风险相关基因变异而缺乏胚系变异验证的前列腺癌患者,推荐进行遗传咨询后再考虑检测^[40]。

结合这些权威指南和共识,本指南建议:

1. 为评估遗传风险,建议对相关高风险人群进行遗传咨询及胚系BRCA1/2基因检测,包括:来自于BRCA1/2基因致病/可能致病突变家系中的个体;肿瘤检测发现BRCA1/2基因致病/可能致病突变但是不能明确是否为胚系突变的患者;所有新确诊的卵巢癌、输卵管癌及原发性腹膜癌患者;发病年龄在40岁及以下的乳腺癌患者,发病年龄在60岁及以下的三阴性乳腺癌患者,所有男性乳腺癌患者;所有新确诊的胰腺癌患者;高风险及以上、N1及M1前列腺癌患者,前列腺导管内癌患者;满足一定家族史条件的乳腺癌及前列腺癌患者;有1个或以上1级或2级血亲满足上述检测标准的个体等(Ⅱ级推荐)^a。

2. 为指导后续治疗方案的选择,建议所有新确诊的卵巢癌、输卵管癌及原发性腹膜癌患者进行胚系和/或体细胞BRCA1/2基因检测,复发后考虑使用新近获取的肿瘤组织进行BRCA1/2基因检测(Ⅰ级推荐);建议HER2阴性晚期乳腺癌患者在考虑化疗时进行胚系BRCA1/2基因检测(Ⅰ级推荐);建议局部晚期及转移性胰腺癌患者在确诊时进行胚系和/或体细胞BRCA1/2基因检测(Ⅰ级推荐);建议所有转移性去势抵抗性前列腺癌患者进行至少包含BRCA1/2等DNA损伤反应基因的胚系及体细胞变异的检测(Ⅱ级推荐)^b。

三、基于NGS技术的BRCA1/2基因检测流程

基于NGS技术的BRCA1/2基因检测流程可以概括为以下6个环节,即样本获取及处理、核酸抽提、文库构建、上机测序、下机数据分析以及变异解读,每个环节都应包括相应的质控步骤。

1. 样本获取及处理:BRCA1/2基因突变分为胚系突变和体细胞突变两种。胚系BRCA1/2基因突变起源于生殖细胞,存在于机体的每一个细胞中;体细胞BRCA1/2基因突变仅存在于肿瘤细胞中;肿瘤组织检测可同时获得胚系及体细胞BRCA1/2基因突变信息,但是对于突变检测阳性的患者需要进一步行胚系突变分析,以区分胚系及体细胞突变。肿瘤检测一般使用手术或穿刺获得的肿瘤样本,胚系检测一般使用血液、唾液、口腔拭子等样本,目前

以血液为主。对样本的具体要求如下:(1)手术或穿刺取得的新鲜肿瘤组织:理想的保存方法是迅速置于液氮中,可保存于液氮罐或 -80°C 冰箱,该过程应在离体后 30 min 内完成,以防止 RNA 等核酸降解;或保存在样本保护剂中,尽早转移到 -80°C 冰箱保存。要求尽可能取肿瘤组织,附带正常组织越少越好。可采用冷冻切片染色评估样本中的肿瘤细胞含量。恶性肿瘤细胞占比要求 $\geq 20\%$ 。手术样本(大样本): $\geq 50\text{ mg}$ (黄豆大小);穿刺样本(小样本):至少 1 针。(2)甲醛固定石蜡包埋组织(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE):按病理操作规范进行取材。手术或穿刺取得的组织应尽可能在 30 min 内浸入足量的 3.7% 中性甲醛溶液中进行固定,避免使用酸性及含有重金属离子的固定液。大标本应切开后充分固定 6~48 h,不超过 72 h。小活检标本可固定 6~12 h。开展 NGS 检测前应进行 HE 染色评估肿瘤细胞的含量。肿瘤细胞占比要求 $\geq 20\%$ 。为保证 FFPE 标本 DNA 提取的成功率,应尽可能送检 1 年以内的蜡块或 6 周以内的石蜡切片,切片厚度 4~5 μm (防脱玻片);手术样本(大样本): ≥ 5 张;穿刺样本(小样本):10 张以上。(3)血液样本:采集 2 mL 全血,保存于 EDTA 抗凝管中,常温(15~35 $^{\circ}\text{C}$)运输至检测实验室,分离白细胞后抽提 DNA。(4)唾液样本:收集 2 mL 唾液样本,注意避免产生过多气泡,收集后与保存液混合均匀,常温保存和运输,及时提取 DNA。(5)口腔拭子:检测对象温开水漱口后,用无菌棉签在颊黏膜轻擦 10 次,直接用于 DNA 提取或者干燥后常温暂时保存和运输。

2. 核酸抽提及质控:针对不同的样本类型,需选用不同的 DNA 提取方法和试剂。原则上优先采用由国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准上市的试剂盒进行基因组 DNA 提取。DNA 的质量和浓度对检测结果的准确性有重要影响,所以 DNA 的质量控制环节不容忽视。需要从 DNA 纯度、浓度以及片段化程度进行充分评估,在进行浓度和纯度测定时,可采用 Nanodrop 和 Qubit 等仪器。可采用琼脂糖凝胶电泳等方法对片段化程度进行评估。提取 DNA 后的剩余样本一般建议长期保存或保留至产生报告结果时按流程销毁。

3. 文库制备及质控:测序前需要对 DNA 样本进行文库制备。可使用 2 种方法进行文库制备,即基于扩增子的方法和基于杂交捕获的方法。选择

合适的文库制备试剂盒,需考虑适用样本、DNA 起始量、基因板(gene panel)数据量等因素。另外,检测区域需至少包括 BRCA1/2 基因整个外显子编码区及外显子与内含子交界区(± 20 个碱基对)。(1)基于扩增子方法文库构建流程:该方法通过严格的引物设计和优化的 PCR 反应条件,使得多重 PCR 反应可以顺利进行而不互相干扰。目标区域经过扩增后,富集产物通过连接法加上接头变成可以测序的文库。(2)基于杂交捕获方法文库构建流程:该方法在全基因组文库的基础上再通过探针捕获富集目标文库。对于全基因组文库的建立基本上包括了 2 大类方法,接头连接酶法和转座酶接头导入法。通过这 2 类方法获得的全基因组文库再与生物素标记的基因组的目标区域探针进行杂交,杂交产物通过亲和素磁珠富集含有目标区域片段的文库用于上机测序。(3)文库质控:为使测序质量和产量达到最优,需要从 DNA 浓度及片段大小等方面对文库制备过程进行质控。文库定量一般采用 Qubit,也可采用荧光定量 PCR 等方法,片段大小分析可采用 Bioanalyzer 2100 等。确定文库可用后即可进行后续的上机测序。

4. NGS 测序及质控:构建好的文库将在高通量测序仪上进行上机测序,测序完成后需要对原始数据进行质控,再进行后续的生物信息分析。测序完成后,需对原始测序数据进行质控,一般参考 Q30 值。

5. 数据分析:(1)流程及相关软件:在获得原始测序数据并进行质控后,常规的分析流程主要包括数据比对、变异识别、变异注释等,数据分析流程中常用软件可参考表 1。(2)生物信息分析质控:在测序原始数据完成比对之后,需再次进行质控。胚系 BRCA1/2 基因检测和肿瘤 BRCA1/2 基因检测对 NGS 检测的测序深度要求不相同。胚系 BRCA1/2 基因检测只需检测杂合突变或纯合突变,理论突变频率分别为 50% 或 100%;而肿瘤组织 BRCA1/2 基因突变频率可能很低。使用不同的测序平台选用不同的文库构建方法,对测序深度也有不同的要

表 1 常用软件推荐^[41-43]

使用目的	软件名称
拼接比对	BWA
去冗余(杂交捕获方式)	Picard
变异识别(SNV、indel)	GATK, Freebayes, Varscan 和 Vardict
注释	Snpeff, Annovar
商业化软件包	Array Studio, Alamut Visual, HGMD

求,推荐测序深度可参见表 2。测序深度超过(0.2×平均测序深度)的位点应该占有所有目标检测位点比例的 90% 以上。此外,还需参考测序片段比对率等参数。建议利用 IGV 等软件对变异位点进行可视化查看和确认。

表 2 平均测序深度推荐

文库构建方法	胚系 BRCA1/2 检测	肿瘤 BRCA1/2 检测
基于扩增	200×	1 000×
基于捕获(去冗余后)	100×	500×

6. 变异解读:变异解读是 BRCA1/2 基因检测结果分析中的关键步骤,为临床报告提供重要参考依据。变异分类建议参考国际癌症研究机构(IARC)分类,根据变异的致病性可分为五类:5 类-致病性、4 类-可能致病性、3 类-意义未明、2 类-可能良性以及 1 类-良性^[44]。数据解读的标准和规范以及数据解读和注释流程中常用数据库可参考《ACMG 和美国分子病理学会 (Association for Molecular Pathology, AMP) 序列变异解读标准和指南(2015 版)》和《BRCA 数据解读中国专家共识》^[41,43]。BRCA1/2 基因检测报告可参考《BRCA1/2 数据解读中国专家共识》^[43]。

7. 验证:为了保证检测结果的准确性,在临床应用前需要对整个实验流程进行验证,主要包括优化实验条件与分析参数、建立整个实验流程的操作规范(protocol)、制定性能规范和质控程序、评估 NGS 与其他检测方法检测结果的一致性以及使用数量和类型合适的样本进行性能验证或确认等^[45-47]。

8. 大片段重排 (large genomic rearrangement, LGR) 的检测:完整的 BRCA1/2 基因检测,除了包括对点突变和小片段插入缺失的检测,还应包括对 LGR 的检测。据已有报道,LGR 比例在不同人群中会有不同,在亚洲人群中,LGR 在所有 BRCA1/2 基因突变中占比在 7% 以下,一项包含 555 例中国南方城市乳腺癌/卵巢癌患者的研究表明,LGR 占有所有 BRCA1/2 基因突变的 5.8%,BRCA1 基因 LGR 的比例(6.9%)高于 BRCA2 基因(5%)^[48-49]。多重连接探针扩增技术 (MLPA) 是目前应用最广泛的 LGR 检测方法,如 NGS 方法未检测到致病点突变或小片段插入缺失时,推荐继续进行 LGR 的检测(尤其是有相关肿瘤家族史的人群)。MLPA 主要采用血液样本进行胚系突变的检测。此外,部分经过特殊设计并严格验证的 NGS 方法在检测突变的同时也可

以检测 LGR。

9. BRCA1/2 基因检测的临床路径(图 1):对于遗传性/家族性高风险人群,可行遗传咨询及胚系 BRCA1/2 基因检测以评估遗传风险,建议优先检测先证者。对于未罹患相关肿瘤的家系成员的检测需要在获得充分知情同意后开展,并且需要讨论对未患病者检测结果解读的局限性。胚系 BRCA1/2 基因检测样本包括血液或唾液等,以血液样本为主。

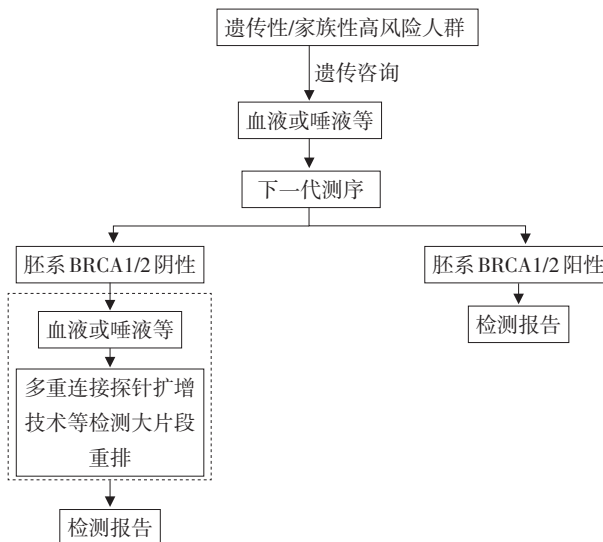


图 1 遗传性/家族性高风险人群 BRCA1/2 基因检测的临床路径 (虚线框内的检测步骤可以根据实际情况选择性开展)

对于肿瘤患者,可行肿瘤或胚系 BRCA1/2 基因检测以指导后续治疗方案的选择(图 2)。对于优先选择肿瘤组织进行检测的患者,当肿瘤 NGS 检测结果为阳性时,建议采集血液或唾液等样本进行胚系 BRCA1/2 检测(可采用 Sanger 测序等方法)以明确该突变是否为胚系突变。肿瘤或胚系 NGS 检测结果(点突变,小片段插入缺失)为阴性时,可进行 LGR 检测以进一步明确是否含有 BRCA1/2 基因的大片段重排变异(尤其有相关肿瘤家族史的人群)。现阶段 LGR 检测主要推荐采用 MLPA 方法,检测样本以血液为主。若用特殊设计的 NGS 检测 LGR,需要使用足够的样本进行充分的方法学验证。若胚系 BRCA1/2 基因突变检测结果为阳性,建议对其进行检测后遗传咨询及相应的风险管理,并建议对有风险的亲属进行遗传咨询并考虑进行基因检测。

四、BRCA1/2 基因检测实验室及人员资质

进行 BRCA1/2 基因检测的实验室必须通过相关机构认证,有规范的实验室标准化操作流程(SOP),建立严格的质量控制体系,并定期参加国

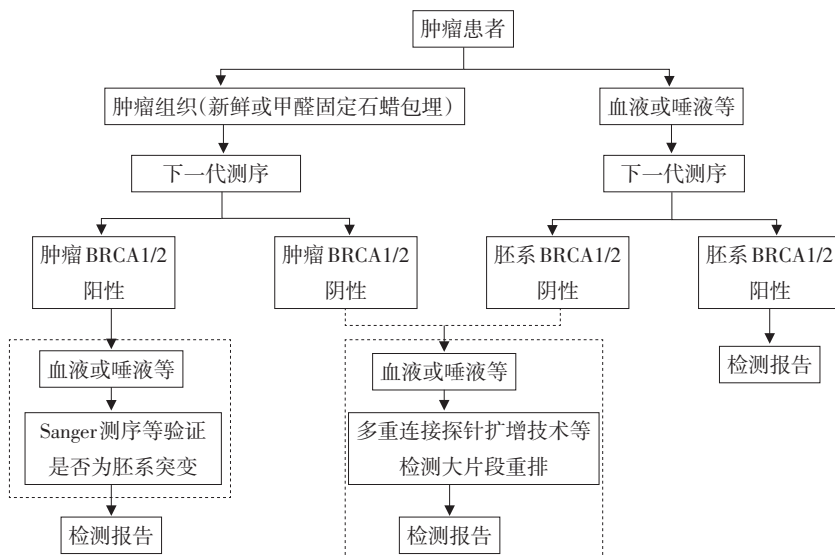


图2 肿瘤患者 BRCA1/2 基因检测的临床路径
(虚线框内的检测步骤可以根据实际情况选择性开展)

际和国内相关室间质评(EQA)项目对其检测能力进行评估^[50-51]。由于 BRCA1/2 基因突变类型多样且无热点突变,建议在 EQA 项目中针对不同类型的突变(如 SNV、Indel、LGR 等)进行全面评估。

BRCA1/2 基因检测涉及的人员包括检测人员、生物信息分析人员及变异解读人员,相关的人员必须接受过技术检测、生物信息分析或变异解读相关的专业培训,并获得相应的资格证书^[50]。对于检测过程的操作人员必须经过质量管理体系、操作规程、污染防控等技能的培训,并严格按照标准化操作流程操作,确保检测结果的准确可靠。生物信息分析及变异解读人员应具有生物信息学或者遗传学专业背景,并接受过基因检测相关培训^[50]。变异解读人员应具有遗传咨询师资质或经相关遗传咨询培训合格。

BRCA1/2 基因检测流程复杂,需要规范化的操作流程及严格的质控体系才能保障结果的准确性,保障患者得到精准的治疗和管理。在 BRCA1/2 基因检测过程中,要重视多学科合作的重要性,加强临床与病理的沟通合作,并促进 BRCA1/2 基因检测数据的共享。

^a高风险人群的界定参考前文或《美国国立综合癌症网络(NCCN)乳腺癌和卵巢癌遗传性/家族性高风险评估指南》(2019 V3 版)。

^b参考《中国临床肿瘤学会(CSCO)诊疗指南证据类别(2018)》{1A 类证据:基于高水平证据[严谨的 Meta 分析或随机对照临床研究(RCT)结果],专家组有统一共识;1B 类证据:基于高水平证据(严谨的 Meta 分析或 RCT 结

果),专家组有小争议;2A 类证据:基于低水平证据,专家组有统一共识;2B 类证据:基于低水平证据,专家组无统一共识,但争议不大;3 类证据:专家组存在较大争议}及《CSCO 诊疗指南证据类别(2018)》(I 级推荐:1A 类证据和部分 2A 类证据;II 级推荐:1B 类证据和部分 2A 类证据;III 级推荐:2B 类证据和 3 类证据;不推荐/反对)。

免责声明:本指南只代表本编写组观点,供各临床病理实验室结合各单位实际情况参照使用。随着科学知识的迅速发展,在本指南出版或更新之前可能出现新的证据。本编写组不对因使用本指南而引起的直接或间接损失承担任何责任。

编写组成员(按姓名汉语拼音字母顺序排列):陈刚、陈罡、陈敏、程文俊、崔文丽、丁伟、董周寰、段秀梅、段亚琦、郭蕾、郭凌川、侯英勇、胡沛臻、胡夕春、黄欣、江泽飞、姜国忠、金钢、孔北华、李霄、李月红、梁后杰、梁莉、梁志清、梁智勇、林仲秋、刘慧、刘继红、刘强、刘卫平、刘艳辉、刘毅、刘月平、路军、马将军、马杰、毛峥嵘、孟宏学、穆殿斌、欧阳能太、欧阳取长、邱雪杉、饶秋、邵建永、邵志敏、师怡、石怀银、孙平丽、孙文勇、唐源、滕梁红、王理伟、王立峰、王连唐、王亮、王树森、王晓稼、王永胜、王征、吴鹤、吴焕文、吴令英、吴小华、武春燕、武莎斐、郗彦凤、肖华亮、徐兵河、徐紫光、许颂霄、薛小磊、阎晓初、杨佳欣、杨举伦、姚茜岚、叶定伟、叶丰、叶菁、殷咏梅、尹丹静、应建明、虞先濬、袁勇、岳君秋、曾瑄、张波、张丹芳、张冠军、张国楠、张杰、张燕、张智弘、章宜芬、赵晨燕、郑建明、郑晶、周建华、周琦、周晓燕、朱虹光、朱卫东、朱耀

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. Science, 1994,266(5182):66-71.
- [2] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13[J]. Science, 1994, 265(5181):2088-2090.
- [3] Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage[J]. J Cell Sci, 2001,114(Pt 20):3591-3598.
- [4] Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations[J]. Nat Rev Cancer, 2007,7(12):937-948.
- [5] 《基于下一代测序技术的 BRCA 基因检测流程中国专家共识》编写组. 基于下一代测序技术的 BRCA 基因检测流程中国专家共识 [J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(6): 401-406. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.06.003.
- [6] Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary

- breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues[J]. *Hum Genet*, 2008, 124(1): 31-42. DOI: 10.1007/s00439-008-0529-1.
- [7] Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases[J]. *Cancer*, 2005, 104(12):2807-2816.
- [8] Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5):1117-1130.
- [9] Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(11):1329-1333.
- [10] Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2011[J]. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2014, 19.
- [11] Kurian AW, Sigal BM, Plevritis SK. Survival analysis of cancer risk reduction strategies for BRCA1/2 mutation carriers [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(2): 222-231. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.7991.
- [12] Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(10): 1697-1701. DOI: 10.1038/bjc.2012.146.
- [13] Iqbal J, Ragone A, Lubinski J, et al. The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(12): 2005-2009. DOI: 10.1038/bjc.2012.483.
- [14] Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, et al. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(23):1811-1814.
- [15] Moran A, O'Hara C, Khan S, et al. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations[J]. *Fam Cancer*, 2012, 11(2):235-242. DOI: 10.1007/s10689-011-9506-2.
- [16] Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, et al. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(3): 159-164.
- [17] Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality[J]. *JAMA*, 2010, 304(9): 967-975. DOI:10.1001/jama.2010.1237.
- [18] Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, et al. Genomic patterns resembling BRCA1-and BRCA2-mutated breast cancers predict benefit of intensified carboplatin-based chemotherapy [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3): R47. DOI: 10.1186/bcr3655.
- [19] Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(34): 5530-5536. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.1703.
- [20] Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(21):2654-2663. DOI:10.1200/JCO.2011.39.8545.
- [21] Tutt A, Tovey H, Cheang MC, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 628-637. DOI: 10.1038/s41591-018-0009-7.
- [22] Golan T, Kanji ZS, Epelbaum R, et al. Overall survival and clinical characteristics of pancreatic cancer in BRCA mutation carriers[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(6):1132-1138. DOI: 10.1038/bjc.2014.418.
- [23] Iglehart JD, Silver DP. Synthetic lethality: a new direction in cancer-drug development[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(2): 189-191. DOI:10.1056/NEJMc0903044.
- [24] Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 523-533. DOI: 10.1056/NEJMoa1706450.
- [25] 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. DOI: 10.1056/NEJMoa1810858.
- [26] Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1903387. In Press.
- [27] Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. DNA-Repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(18):1697-1708. DOI: 10.1056/NEJMoa1506859.
- [28] Mateo J, Porta N, McGovern UB, et al. TOPARP-B: A phase II randomized trial of the poly (ADP)-ribose polymerase (PARP) inhibitor olaparib for metastatic castration resistant prostate cancers (mCRPC) with DNA damage repair (DDR) alterations [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15 suppl):5005.
- [29] Xu K, Yang S, Zhao Y. Prognostic significance of BRCA mutations in ovarian cancer: an updated systematic review with meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 285-302. DOI: 10.18632/oncotarget.12306.
- [30] Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer[J]. *JAMA*, 2012, 307(4):382-290. DOI:10.1001/jama.2012.20.
- [31] Zhong Q, Peng HL, Zhao X, et al. Effects of BRCA1-and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(1): 211-220. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-1816.
- [32] Goodwin PJ, Phillips KA, West DW, et al. Breast cancer prognosis in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an International Prospective Breast Cancer Family Registry population-based cohort study[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(1): 19-26. DOI:10.1200/JCO.2010.33.0068.
- [33] NCCN Guidelines. Genetic / familial high-risk assessment: breast and ovarian[DP/EB]. Version 3.2019.
- [34] NCCN Guidelines. Ovarian cancer including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer[DP/EB]. Version 1.2019.
- [35] NCCN Guidelines. Breast cancer[DP/EB]. Version 1.2019.
- [36] NCCN Guidelines. Pancreatic adenocarcinoma[DP/EB]. Version 2.2019.
- [37] NCCN Guidelines. Prostate cancer[DP/EB]. Version 1.2019.
- [38] 周琦, 吴小华. 中国卵巢上皮性癌维持治疗专家共识(2019)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(6): 655-659.
- [39] 中国医师协会精准治疗委员会乳腺癌专业委员会, 中华医学会肿瘤学分会乳腺肿瘤学组, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国乳腺癌患者 BRCA1/2 基因检测与临床应用专家共识(2018 年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2018, 28(10):787-798. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.10.011.

- [40] 中国抗癌协会泌尿生殖系肿瘤专业委员会前列腺癌专家组. 中国前列腺癌患者基因检测专家共识(2018年版)[J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(8): 627-633. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.08.011.
- [41] Richards S, Aziz N, Bale S, 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.
- [42] Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing[J]. Eur J Hum Genet, 2016, 24(10):1515. DOI:10.1038/ejhg.2016.63.
- [43] 《BRCA 数据解读中国专家共识》编写组. BRCA 数据解读中国专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(5):293-297. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.05.002.
- [44] Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results [J]. Hum Mutat, 2008, 29(11): 1282-1291. DOI: 10.1002/humu.20880.
- [45] Gargis AS, Kalman L, Bick DP, et al. Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(7): 689-693. DOI: 10.1038/nbt.3237.
- [46] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing[J]. Genet Med, 2013,15(9):733-747. DOI:10.1038/gim.2013.92.
- [47] Gargis AS, Kalman L, Berry MW, 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.
- [48] Kim H, Choi DH. Distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in Asian patients with breast cancer[J]. J Breast Cancer, 2013, 16(4): 357-365. DOI: 10.4048/jbc.2013.16.4.357.
- [49] Kwong A, Ng EK, Law FB, et al. Novel BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Southern Chinese breast/ovarian cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(3): 931-933. DOI: 10.1007/s10549-012-2292-1.
- [50] 《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识》编写组. 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(3): 145-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.03.001.
- [51] 中华医学会病理学分会, 中国医师协会病理科医师分会, 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 等. 分子病理诊断实验室建设指南(试行) [J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(6): 369-371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.06.001.

(收稿日期:2019-07-03)

(本文编辑:常秀青)

荧光原位杂交检测技术共识

《荧光原位杂交检测技术共识》编写组

执笔人:董周寰(解放军总医院第一医学中心病理科),段敏刚(解放军总医院第四医学中心),高颖(首都医科大学附属北京世纪坛医院病理科),郭蕾(中国医学科学院肿瘤医院病理科),贾玲(北京大学肿瘤医院病理科),李喆[基因科技(上海)股份有限公司],刘莉(首都医科大学宣武医院病理科),王琼(解放军总医院第一医学中心病理科),王伟(首都医科大学附属北京安贞医院病理科),武莎斐(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科),朱凤伟(解放军总医院第一医学中心病理科)

通信作者:周立新(北京大学肿瘤医院病理科 100141),Email:zlixin@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2019.09.003

Consensus of fluorescence in situ hybridization on technology

Committee of Consensus of Fluorescence in Situ Hybridization on Technology

Corresponding author: Zhou Lixin, Email:zlixin@aliyun.com

【摘要】 荧光原位杂交检测是临床病理检测中广泛运用的一种分子细胞遗传学诊断技术,在标本处理、检测步骤、结果判读、质量控制等各个环节实现检测的规范化和标准化,对提高检测的准确性和降低室间差异具有重要的现实意义,同时也为辅助病理诊断和预测临床靶向治疗的疗效提供更为准确的依据。

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 是依据碱基互补原理,应用荧

光素直接或间接标记的核酸探针,在组织切片、细胞涂片、染色体铺片上检测间期细胞核染色质数量