

结直肠癌分子检测高通量测序中国专家共识

中国抗癌协会肿瘤靶向治疗专业委员会*

【摘要】 结直肠癌是我国发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,随着对 Ras、BRAF、错配修复/微卫星不稳定(MMR/MSI)等肿瘤相关分子标志物的深入研究及检测水平的发展,合理的检测技术及应用已经成为目前临床实践重要的组成部分。为了解决目前临床应用中存在的问题,提高相关行业从业者对结直肠癌分子检测高通量测序(NGS)的了解及应用,由临床医师结合结直肠癌实际诊疗需求发起,业内诸多检测公司参与,病理及检验专家指导,从结直肠癌 NGS 检测的临床角度及实验室流程质控角度共同起草了中国专家共识及标准,以指导 NGS 检测技术在结直肠癌诊疗中的规范应用,帮助临床医师解读报告,为结直肠癌靶向治疗和免疫治疗提供更加标准的参考。

【关键词】 结直肠癌; 高通量检测; 分子标志物; 共识

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2021)03-0253-12

结直肠癌在我国的发病率呈逐年上升的趋势,世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer IARC)数据显示,我国 2020 年结直肠癌的新发病例数为 56 万例,因结直肠癌死亡病例达 29 万例^[1]。约 25% 的结直肠癌患者在诊断时已出现远处转移,此外 25% 的患者在治疗过程中发生转移,晚期患者预后较差,5 年生存率不足 15%^[2]。分子标志物检测是筛选靶向治疗获益人群的前提,近年来随着检测技术的飞速发展,高通量测序,也称为下一代测序(next generation sequencing, NGS) 因其在通量、成本及效率等方面的综合优势,在肿瘤基因突变检测中展现出越来越广阔的应用前景。然而 NGS 检测技术流程复杂,对实验室环境条件、人员能力及质量管理要求高,任何一个环节出现问题,均会影响检测结果的准确性,进而影响临床决策^[3]。为保证临床诊疗工作的准确性和规范性,本共识由临床医师结合结直肠癌实际诊疗需求发起,业内诸多检测公司参与,病理及检验专家指导,从结直肠癌 NGS 检测的临床角度及实验室流程质控角度共同起草中国专家共识,以指导 NGS 检测技术在结直肠癌诊疗中的规范应用。

1 生物标志物在结直肠癌中的临床意义

1.1 结直肠癌诊疗必须/可选检测的生物标志物 结直肠癌诊疗的相关生物标志物具体见表 1。

1.2 遗传性结直肠癌相关检测 目前较明确的肠癌相关遗传性疾病主要有 3 类: Lynch 综合征、家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP) 和黑斑息肉病(P-J 综合征)。遗传性结直肠癌筛查和基因诊断原则可参考《中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南 2020 版》^[4]。见表 2。

在 Lynch 综合征个体中已发现 MMR 基因 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 或上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EPCAM) 的胚系突变。dMMR 或 MSI-H 患者可能会提示 Lynch 综合征(10% ~ 15% 的散发性结直肠癌也存在肿瘤组织 MLH1 蛋白的缺失,表现为 MSI-H)。BRAF^{V600E} 突变的存在与否可以初步确定是 Lynch 综合征还是散发性结直肠癌。如果突变存在提示为散发性结直肠癌,无 BRAF^{V600E} 突变时提示 Lynch 综合征可能^[5]。若存在 BRAF^{V600E} 突变的情况下,则应谨慎进行胚系变异检查以排除具有强家族史的病例^[10-11]。需要强调的是,MMR/MSI 检测是 Lynch 综合征的筛查手段, Lynch 综合征的确诊有赖于基因测序。

FAP 推荐进行 APC 外显子测序/片段缺失测序,有突变提示 FAP 或衰减型 FAP(AFAP); 无突变则推荐行 MUTYH 外显子测序/片段缺失测序,有突变提示 MUTYH 相关息肉病(MUTYH-associated polyposis, MAP)。对于无任何已知的息肉病综合征基因

* 主要执笔人: 陈功 E-mail: chengong@sysucc.org.cn; 王峰 E-mail: wangfeng@sysucc.org.cn

通讯作者: 梁智勇 E-mail: liangzhiyong1220@yahoo.com; 徐瑞华 E-mail: xurh@sysucc.org.cn

表 1 结直肠癌诊疗的相关生物标志物

基因名称	标本类型	检测方法	临床意义	临床意义解读	
必须要检测的生物标志物 ^a	MSI/MMR ^b	组织 血液	IHC PCR NGS	疗效预测 预后评估	对于 II 期结直肠癌: MSI-H 可能无法从氟尿嘧啶类单药辅助治疗中获益 ^[4] , 患者预后较好 ^[5] 。 dMMR 或 MSI-H 的晚期结直肠癌患者可从 PD-1/PD-L1 治疗中获益 ^[5] 。
	K-Ras(Exon 2、3、4) N-Ras(Exon 2、3、4) BRAF ^{V600E}	组织 ^d 血液	IHC Sanger PCR/dPCR NGS	疗效预测 预后评估	Ras 野生型/BRAF 野生型结直肠癌患者可从抗表皮生长因子受体(EGFR) 单抗治疗中明确获益 ^[4-5] 。 BRAF ^{V600E} 突变型患者可从 BRAF 抑制剂、MEK 抑制剂以及抗 EGFR 单抗两药或三药联合的靶向治疗方案中获益 ^[4] 。
可选开展检测的生物标志物	液体活检 ctDNA , 如: K-Ras、N-Ras、 BRAF、Tp53、APC、 DPYD 等早癌筛查 和基因甲基化检测	血液	PCR/dPCR NGS 其他	预后评估 疗效预测 疾病监测	ctDNA 突变负荷检测用于检测 I ~ III 期结直肠癌患者微小残留病灶和辅助治疗反应以及识别高复发风险 ^[6] 。 血液样本 ctDNA 基因突变检测用于帮助结直肠癌患者选择合适的靶向治疗 ^[7] 。 通过 ctDNA 状态的变化实现结直肠癌治疗全程管理(如抗 EGFR 治疗再挑战 ^[8] 和 NeoRas 突变清除 ^[9])。 肿瘤相关标志物筛查和甲基化检测有助于早期结直肠癌诊断, 手术疗效评估及复发监测。
	NTRK 基因融合	组织	FISH NGS	疗效预测	在有条件的情况下, 对标准治疗后失败的结直肠癌患者可以进行 NTRK 基因融合检测 ^[4] , NTRK 基因融合的患者可从 NTRK 抑制剂中获益。
	HER-2 基因扩增	组织	FISH NGS	疗效预测	在有条件的情况下, 对标准治疗后失败的结直肠癌患者可以进行 HER-2 状态检测 ^[4] (目前结直肠癌 HER-2 阳性的判断标准仅来自于临床研究, 尚未建立经过权威机构认证的伴随诊断的判读标准) 根据正在进行的两项研究, 专家小组推荐两种药物组合作为 HER-2 基因扩增(且 Ras 和 BRAF 野生型) 晚期结直肠癌后续治疗的选择: 曲妥珠单抗联合帕妥珠单抗或拉帕替尼 ^[10-11] 。
UGT1A1/DPYD 基因变异	血液	Sanger PCR NGS	化疗药物 剂量调整	UGT1A1 影响 UDP-葡萄糖醛酸酶/二氢嘧啶脱氢酶活性, 结直肠癌患者使用伊立替康治疗时, 应对相关位点(UGT1A1* 28 和 * 6) 进行检测以指导用药剂量调整 ^[5] 。 DPYD 基因编码二氢嘧啶脱氢酶, 该酶参与体内氟尿嘧啶代谢, 如 DPYD 基因中存在影响该酶活性的变异时, 可能会增加氟尿嘧啶类药物的毒性。结直肠癌患者使用氟尿嘧啶、卡培他滨、替加氟等化疗药物时, 应对相关位点进行检测以指导用药剂量调整 ^[12] 。	

续表 1:

基因名称	标本类型	检测方法	临床意义	临床意义解读
PIK3CA 基因突变 PTEN 基因变异	组织	Sanger PCR FISH NGS		PIK3CA 突变的结直肠癌患者服用阿司匹林能提高生存率 ^[13] 。 PIK3CA 和 PTEN 突变对抗 EGFR 治疗疗效预测证据尚不充分 ^[14] 。
免疫治疗疗效正相关预测标志物: 1 POLE/POLD1 基因突变; 2 TMB ^c ; 3 其他相关标志物, 如: Tp53、K-Ras 基因突变等	组织	Sanger NGS	疗效预测	1 POLE/POLD1 基因突变: 近期研究发现, POLE/POLD1 基因的体细胞非同义突变可以作为泛癌种免疫检查点抑制剂疗效预测标志物。其在结直肠癌中的突变率为 5%~8% 在筛选结直肠癌患者进行免疫治疗的指标时, 可考虑 MSS 作为进一步评估使用免疫检查点抑制剂治疗的参考 ^[15] 。 2 肿瘤突变负荷 (TMB): 有报道了在 MSI-H 型结直肠癌患者中, TMB-H 患者较 TMB-L 患者更能够从 PD-1/PD-L1 抗体治疗中获益, TMB 是免疫治疗的潜在生物标志物 ^[16] 。 3 存在免疫正相关预测标志物(如 Tp53、K-Ras 基因突变等)的患者对免疫药物更敏感, 生存获益更长 ^[17] 。
免疫治疗疗效负相关预测标志物 如: B2M、JAK1/2、STK11、PTEN 等基因变异	组织	Sanger NGS	疗效预测	当存在免疫负相关预测标志物基因突变时, 通过影响 PD-L1 表达、抗原呈递、肿瘤淋巴细胞浸润等方式, 影响免疫治疗效果 ^[18] 。
免疫治疗疗效超进展预测标志物 如: EGFR、MDM2、MDM4、DNMT3A 等基因变异	组织	Sanger NGS	疗效预测	约 9% 的患者在接受免疫治疗后会出现超进展现象, 相关超进展预测标志物检测能及时识别免疫超进展的患者, 以提示免疫治疗的指导意义, 帮助治疗决策 ^[19] 。

可选开展检测的生物标志物

注: a: 结合《中国临床肿瘤学会 (CSCO) 结直肠癌诊疗指南 2020 版》和《结直肠癌诊疗规范》推荐^[4, 20]。

b: 微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI): 建议采用美国国家癌症研究院 (NCI) 推荐的 5 个微卫星 (MS) 检测位点 (BAT25、BAT26、D5S346、D2S123 和 D17S250)。判断标准为 3 级: 所有 5 个位点均稳定为微卫星稳定 (microsatellite stable, MSS), 1 个位点不稳定为微卫星低度不稳定 (MSI-L), 2 个及 2 个以上位点不稳定为微卫星高度不稳定 (MSI-H)。MSI 多由错配修复 (MMR) 基因突变及功能缺失导致, 也可以通过检测 MMR 蛋白 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) 的表达情况来反映 MSI 状态。一般而言, 错配修复缺陷 (dMMR) 相当于 MSI-H, pMMR 相当于 MSI-L 或 MSS^[4]。根据共识推荐, 已报道的基于 NGS 平台的 MSI 算法包括但不限于 MSI sensor、mSINGS、MANTIS、MSI ColonCore 和 MSI FOne 等^[21]。临床应用时建议使用国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 批准的 MSI 试剂盒。

c: 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准 PD-1 抑制剂用于治疗组织肿瘤突变符合高 (TMB-H, ≥ 10 Muts/Mb), 既往治疗后病情进展且无满意替代治疗方案的不可切除或转移性成年和小儿实体瘤患者。

d: 治疗针对复发和/或转移灶时, 应首选对复发灶或转移灶进行检测。复发灶或转移灶标本不可获得时, 可用原发灶切除组织标本替代进行检测。如无法获得任何组织学标本时, 血液 ctDNA 检测可替代组织学检测, 支持相应的治疗决策。

的致病性变异, 首选多基因突变检测, 多基因 Panel 应包括所有息肉和结直肠癌相关基因^[22-23]。

1.3 结直肠癌中常见 TMB 判读方法及检测范围汇总
TMB 检测有助于帮助筛选免疫治疗潜在获益的患者, 显著提升晚期恶性肿瘤患者的客观缓解率和总生存期。MSI-H/dMMR 通常也伴随 TMB-H, MSI-H 肿瘤样本中有约 83% 表现为

TMB-H, 且有 97% 的样本 TMB ≥ 10 Muts/Mb^[24]。在临床研究和实践过程中, TMB 的评估判读标准在不同癌种中存在差异, 而不同靶向测序 Panel 的 TMB 检测体系之间 TMB 阈值不能通用^[25]。表格中收集了目前市场上部分检测公司的 TMB 判读方法及检测信息 (表 3), 为临床医师综合判断 TMB 标准提供参考。

表 2 遗传性结肠癌筛查和基因诊断的一般原则

疾病类型	筛查基因(或标志物)
Lynch 综合征	MLH1/MSH2/MSH6/PMS2 BRAF ^{V600E} /EPCAM
FAP	APC/MUTYH
P-J 综合征	STK11

表 3 TMB 判读方法及检测范围信息汇总

检测公司	TMB 判读方法	TMB 检测范围
A	TMB-H: TMB>10 Muts/Mb	324 基因靶向测序 Panel 大小(2. 2M)
B	五分位法 四分位法	468 基因靶向测序 Panel 大小(1. 53M)
C	TMB-H: TMB>10 Muts/Mb TMB-M: 2. 5 Muts/Mb≤ TMB≤10 Muts/Mb TMB-L: TMB<2. 5 Muts/Mb	编码区域大小 (1. 39M)
D	四分位法	599 基因靶向测序 Panel 大小(2. 3M)
E	三分位法 TMB-H: TMB>10 Muts/Mb	425 基因靶向测序 Panel 大小(1. 26M)
F	三分位法	Panel 靶向区域
G	给出 TMB 具体数值 Muts/Mb , 以及 TMB 的临床意义, TMB 在 不同癌种中的报道、获批情况 和对应的阈值情况, 供临床医 师综合参考判断	编码区域大小(约 1M)

1.4 生物标志物时机及检测内容 根据结直肠癌患者制定相关治疗方案的过程, 结合结直肠癌生物标志物相关临床意义, 建议检测作如下推荐。

(1) I ~ III 期结直肠癌(表 4):

表 4 I ~ III 期结直肠癌治疗阶段及检测时机推荐

检测推荐	结直肠癌	结直肠癌术后阶段	
	术前阶段	辅助治疗决策前	术后监测随访
必选		MSI/MMR	
		K-Ras/N-Ras/BRAF	
可选	液体活检	UGT1A1/DYPD	液体活检
		液体活检	

(2) IV 期结直肠癌(表 5):

表 5 IV 期结直肠癌治疗阶段及检测时机推荐

检测推荐	一线治疗方案决策前	治疗过程监测随访	二线治疗疾病进展后或后线治疗决策前
必选	K-Ras/N-Ras/BRAF MSI/MMR		
	免疫治疗疗效预测标志物		液体活检
可选	液体活检	液体活检	HER-2 NTRK

2 样本处理及转运

2.1 FFPE 样本 为保证核酸质量, 手术或活检组织应在离体 30 min 内浸入到 100 ml 的 4% 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。其中, 大标本固定时间为 6 ~ 48 h, 不超过 72 h; 小活检体可固定 6 ~ 12 h。对其中 1 张 FFPE 样本进行切片染色, 并在显微镜下观察肿瘤细胞的含量和数量。若肿瘤含量不足, 则实验室需要对通过富集后符合质量要求的标本进行评估, 或者制备成 FFPE 细胞学蜡块后进行核酸提取。值得注意的是, 开展 NGS 检测前应通过 HE 染色评估肿瘤细胞含量, 至少满足肿瘤细胞含量在 20% 以上。

2.2 手术或活检的新鲜组织样本 新鲜组织可提取到高质量的核酸。新鲜组织应在离体 30 min 内将其保存于液氮罐或者 -80 °C 冰箱中, 防止 RNA 等核酸降解。如需评估肿瘤细胞含量, 可采用冷冻切片染色方法, 若肿瘤细胞含量不足, 可通过标记肿瘤区域进行富集。新鲜组织可在液氮、-80 °C 冰箱或稳定剂中长期保存。

2.3 血浆样本 对于存在于血浆中的循环 DNA, 即 ctDNA, 取样时可使用专用的 ctDNA 保存管采血, 采血后轻柔颠倒 8 ~ 10 次, 确保采血管中的 ctDNA 保存液与血液充分混匀, 常温转运保存即可, 严禁冻融血液; 到达实验室后, 分离血浆, 提取游离 DNA^[26]。也可使用一次性 EDTA 抗凝真空采血管, 采集 8 ~ 10 ml 全血, 冷藏运输, 2 h 内分离血浆, 提取游离 DNA, 如需保存, 请置于 -80 °C 冰箱中, 并避免反复冻融。

2.4 样本运送规范 实验室应建立详细的样本运送标准操作规范(SOPs) 以确保运送过程中各类样本的安全性和过程的可控性(详见第 4 节)。石蜡材料可以常温运输, 血液样本需要在干冰条件下运输, 核酸样本需在 4 °C 或冷冻条件下运输^[3, 27]。

3 报告解读及标准模板

3.1 NGS 临床报告包含内容 基因检测的临床报告应当包括: (1) 基础信息: 实验室名称、实验操作人员、报告审核人员、联系方式。(2) 受检者的基本信息: 应包括受检者姓名、性别、出生日期、接受检测的日期、检测的目的和受检者的临床指征等。(3) 样本的信息: 样本类型, 如 DNA、外周

血、唾液、新鲜组织、FFPE 组织等;采集时间和采集部位、样本编号、送检时间、检测报告时间和样本主要质控情况,如 DNA 质量评估以及测序质量评估等。(4)检测项目:基因 Panel 的检测位点及检测范围、检测仪器、检测试剂,是否为 NMPA 批准使用的检测试剂以及 NMPA 获批的基因位点信息,或实验室自建检测(laboratory developed tests ,LDTs)试剂、检测方法、检测范围、检测下限(LoD)等。(5)检测结果及变异解读:对基因变异的检测结果进行解读,如检出的基因型、变异结果、染色体变化情况、检测结果的致病性分级、药物信息及临床意义、变异解读引用的参考文献等。(6)标注检测方法的实验室内部验证结果,检测局限性及不确定性,进一步检测的建议^[3]。

3.2 基因变异的命名 对基因变异的描述应遵循一定的原则和规范,推荐使用人类基因组变异协会命名指南(www.hgvs.org),转录本的选择建议采用基因座参考基因组序列数据库(Locus Reference Genomic, <https://www.lrg-sequence.org>)界定的转录本或者多个国际数据库公认的主要转录本。对遗传性结直肠癌相关基因变异的说明,建议以美国医学遗传学学院(American College of Medical Genetics and Genomics ,ACMG; <https://www.acmg.net>)指南为标准,在检测结果中列出具体的变异位点信息,包括基因名称、所参考的人类基因组版本号、转录本参考序列版本号、核苷酸变异、氨基酸变异、外显子/内含子序号、等位基因杂合性、染色体编号及坐标等^[28]。

3.3 临床意义的解读和批注

3.3.1 对于肿瘤体细胞突变,采用分级处理的方式

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,可根据《高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识》^[29]发表的体细胞突变位点和临床证据分为以下 4 级。见表 6。

表 6 体细胞基因突变分级及证据等级的标准^[29]

突变分级	证据等级
I 级-临床意义明确	等级 A 或等级 B
II 级-有潜在临床意义	等级 C 或等级 D
III 级-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临床证据
IV 级-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

3.3.2 对胚系突变的检测 除了中外诊疗指南及重要参考文献外,另有 Online Mendelian Inheritance in Man (<http://omim.org>) 和美国 ACMG 可参考。ACMG 指南将变异位点致病性的等级分为致病、疑似致病、临床意义未明、疑似良性和良性 5 个等级。报告中应列出与遗传性结直肠癌(如 FAP、Lynch 综合征等)相关的致病以及疑似致病变异,并对变异的致病性进行分析解读^[28]。

3.3.3 意义不明位点的处理 无论是肿瘤体细胞突变,或是胚系突变,都存在意义不明位点。实验室需制定相关政策用来确定是否报告或者不报告临床意义不明的位点,并附上说明和参考数据库,并且要在报告中注明本实验室出具临床报告的规则。

3.3.4 DPYD 检测结果 中等代谢型患者,应基于活性分值降低起始剂量;慢代谢型应避免使用氟尿嘧啶及其前体药物。UGT1A1 检测结果中 UGT1A1* 28 和* 6 为纯合变异型或双杂合变异型的患者应降低伊立替康的剂量,推荐剂量为 150 mg/m²。

3.4 低丰度突变结果的处理 对样本进行 NGS 检测时如出现较低丰度的突变结果(通常组织学样本低于 5%,血液样本低于 1%或低于检测 LoD)时,建议综合评估 NGS 实验平台性能、测序深度以及肿瘤细胞比例等因素综合考虑。特别对于靶向治疗相关的基因建议使用其他检测方法进行进一步验证确认(如 Sanger ,dPCR 等)。

3.5 知情同意 建议提供患者手写或者在线版的知情书。

3.6 报告模板 实验室应根据检测项目,给出对应的检测报告模板(表 7),并形成 SOP 文件。模板中应明确列出检测报告中应提供的信息,如患者基本信息、样本信息、检测信息、检测结果、结果解释、实验室信息、检测方法的局限性以及其他内容等^[4, 28]。

表 7 结直肠癌 NGS 检测标准模板^[30]

患者信息:

姓名 XXX 性别 XX 病理诊断 XXX
送检医院 XXX 年龄 X yrs

标本信息:

标本编号
标本类型 新鲜手术组织 肿瘤细胞含量 X% DNA 含量及质控 XXX
取材部位 标本接收日期 2020-XX-XX 报告日期 2020-XX-XX

检测内容及范围: 使用 NGS 技术检测结直肠癌中 XX 个基因外显子突变。外显子和这些基因剪接位点附近的序列进行大规模平行测序。样本处理、文库构建、测序和分析均在 XX 实验室进行。检测平台为 XX, 分析软件为 XX。参考基因组为 GRCh38。详细技术说明及基因参见「附录 1 检测基因列表 检测方法和检测局限性」。

检测项目内容: 肠癌相关 XX 基因突变检测

检测方法: 高通量测序法

检测下限: X%

检测结果:

数据参数: XX ng 核酸构建测序文库; X% 目标区域有效测序至 XX 深度。

结果小结:

检测类型	检测结果
体细胞变异	共 1 个体细胞变异, 其中具有明确或潜在临床意义的变异有 1 个
具有临床意义的变异	Tp53 基因 p.Arg175His, PTCH1 基因
微卫星不稳定 (MSI)	微卫星稳定 (MSS)
胚系致病变异	未检出
样品总体质量评估	合格

1) 肿瘤体细胞突变的结果及解读

变异结果	丰度	变异解读	证据等级	药物推荐
明确临床意义的变异(I 类变异)				
未检出具有明确临床意义的变异				
潜在临床意义的变异(II 类变异)				
Tp53 基因(NM_001126112.2) 5 号外显子 p.R175H 错义突变 c.524G>A (p.Arg175His)	34%	Tp53 突变在转移性结直肠癌中可能与结直肠癌预后相关。	D 级	
临床意义尚不明确的变异(III 类变异)				
此样本未检出临床意义尚不明确的变异(III 类变异)				

2) 胚系突变的检测结果解读

基因	检测结果	纯合/杂合	ACMG 分级	临床意义
此样本未检出致病或可能致病的胚系变异				

3) 化疗药物基因组学检测结果

基因	检测位点	基因型	临床提示	证据等级
DPYD	rs3918290	c. [1905+1G>A]; [1905+1G>A]	患者二氢嘧啶脱氢酶活性分值为 0, 是二氢嘧啶脱氢酶慢代谢型, 应避免使用氟尿嘧啶、卡培他滨、替加氟等治疗药物。	1A
	rs55886062	c. [1679T>G]; [1679T>G]		
	rs67376798	c. [=]; [=]		
	rs75017182	c. [=]; [=]		
	rs1801265	c. [85T>C]; [=]		
	rs1801159	c. [=]; [=]		
	rs1801160	c. [=]; [=]		
UGT1A1	rs8175347	c. [-53_-52insTA]; [-53_-52insTA] (UGT1A1 * 28/* 28)	UGT1A1 * 6/* 28 双纯合变异型, 应降低伊立替康的剂量, 推荐剂量为 150 mg/m ² 。	1A
	rs4148323	c. [211G>A]; [211G>A] (UGT1A1 * 6/* 6)		

4) 样本主要质控

质量参数	数值	质控标准
病理评估	* 恶性肿瘤细胞占比	组织肿瘤占比>20%
DNA 质量评估	* DNA 总量	>30 ng
	DNA 片段降解程度	可设置 ABC 等级
	* 预文库总量	>300 ng
测序质量评估	* 平均测序深度	组织血液分别设置质控标准
	插入片段长度	组织血液分别设置质控标准
	碱基质量 Q30 占比	>80%
	* 序列回帖比率	>95%
	配对样本纯合子一致性	>90%
总体质量评估	合格/警戒/不合格	

注:* : 必须体现的质控参数 ,其余为可选参数

备注:

(1) 指南及共识推荐的肠癌基因检测背景:

A: 结直肠癌 NCCN 指南推荐检测的基因: K-Ras、N-Ras、BRAF、MSI/MMR、NTRK 融合、HER-2 扩增。

B: CSCO 结直肠癌诊疗指南 2020 版推荐检测的基因: MSI(I 级推荐) ,K-Ras、N-Ras、BRAF(II 级推荐) ,NTRK 融合、HER-2 扩增(III 级推荐) 。

C: CSCO 结直肠癌诊疗指南 2020 版中指出 ,使用 NGS 等定量检测方法检测 Ras 和 BRAF 突变时 ,建议以 5% 作为突变丰度的截断值^[4]。

(2) 在检测结果中列出具体的变异位点信息 ,包括基因名称、所参考的人类基因组版本号和转录本参考序列版本号。

(3) 根据人类基因组突变学会(HGVS) 基因突变命名法(www.hgvs.org) 以起始密码子 A 为第一核苷酸计数,“c.”表示 cDNA 序列,“p.”表示蛋白序列。

(4) 化疗药物证据水平划分依据参考 PharmGKB 数据库 ,共分为 1A/1B/2A/2B/3/4 这 6 个等级: 1A 级(由临床药物基因组学实施联盟(CPIC) 或遗传药理学指南认可 ,或者应用于其他主要卫生系统) ,1B 级(注释基于多项有统计显著性的研究) ,2A 级(注释基于多项重复研究 ,并且该基因为明确的药物代谢基因) ,2B 级(注释基于多项重复研究 ,但其中一些研究没有统计学意义或影响较小) ,3 级(注释仅基于一项有显著性差异的研究 ,或多项研究 ,但缺乏明显药效关联) ,4 级(注释仅基于病例报告 ,非权威性研究或体外分子功能研究) 。

(5) CPIC 指南中 ,二氢嘧啶脱氢酶活性评分是取活性分值最低的 2 个位点的分值之和(根据每个位点对酶活性的影响 ,活性分值为 0/0.5/1/3 种) ;活性分值(activity score) 为 2 的是正常代谢型 ,活性分值为 1 或 1.5 的是中等代谢型 ,活性分值为 0 或 0.5 的是慢代谢型。

(6) 附录: 检测基因列表、检测方法和检测局限性见附录 1 ,NGS 质量参数列表见附录 2 ,本检测所有突变和变异列表见附录 3。

本分析结果仅对试验样本负责。

技术员(签名) : XXX 日期: 年 月 日

审核人(签名) : XXX 日期: 年 月 日

4 NGS 实验室建设的要求

NGS 检测实验室的总体设计与要求应参考《分子病理诊断实验室建设指南(试行) 》、《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》、《个体化医学检测质量保证指南》、《肿瘤个体化治疗检测技术指南》、《个体化医学检测实验室管理办法》、《测序技术的个体化医学检测应用技术指南(试行) 》、《高通量测序技术临床检测规范化北京专家共识(2019 年版) 》进行^[31]。

4.1 人员资质 实验室应具有可满足开展结直肠癌基因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。报告签发人员应具备医学分子生物学和临床肿瘤学知识背景 ,了解结直肠癌的临床治疗指南、靶向治疗、化学治疗、免疫治疗及临床试验最新进展。对遗传性结直肠癌的基因检测 ,实验室应当根据需要配备具有遗传咨询资质的人员。签发报告人员应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 ,可由相关临床医师、病理医师、影像医师、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。实验室人员的数量应当满足开展项目的工作量需求。使用 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。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实验室内部培训,且经过人员能力评估后方可上岗^[27-28]。

4.2 实验室环境及设备 实验室根据拟开展的检测项目数量、检测技术流程、测序平台和工作量的大小来制定实验室分区设计方案,以防止污染。以杂交捕获法的 NGS 检测为例,应至少包括试剂准备区、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。在实验运行及实验室维护过程中,应注意实验室环境中的通风、洁净度、温湿度、震动和光照要求,以保证仪器设备的正常运行和实验过程的稳定性^[3]。

实验室应配备满足结直肠癌临床基因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、毛细管电泳仪、超声打断仪、生物分析仪、高通量测序仪、生物信息分析及数据存储服务器等。如果需要进行 NGS 后的验证实验,实验室仍需配备 Sanger 测序仪、ARMS-PCR 测序仪、数字 PCR 测序仪等。实验室应当建立仪器使用、维护和校准程序,以保证仪器设备正常运行。仪器设备维护和校准应保存记录。

4.3 试剂及耗材要求 实验室应优先选择 NMPA 批准的试剂,在使用前应进行性能验证。如果没有 NMPA 批准的试剂,在通过审核后可采用 LDTs 试剂,实验室所建立的 LDTs 试剂禁止商品化或者在其他实验室使用。LDTs 有以下 3 种情况:(1) 实验室通过购买或者定制试剂原材料,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) 实验室批准使用的商品化试剂,但对其预期用途、试剂组分或者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 SOPs。每批试剂在使用前应进行质检,并保存相应记录^[3]。

4.4 明确结直肠癌分子检测的临床预期用途 基于 NGS 的结直肠癌检测项目必须基于医学科

学证据,有明确的临床预期用途。如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,又如通过胚系突变筛选有遗传倾向的结直肠癌患者等。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。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,由临床医师根据相应的疾病诊疗指南选择治疗药物。

4.5 NGS 方法学建立及其关键环节优化 结直肠癌体细胞基因突变 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。胚系突变可用于分析遗传性结直肠癌^[32]。(1) 实验室应明确新鲜组织样本、FFPE 样本和血液样本的收样规范及样品数量,如 FFPE 切片至少需要 5 张,建立样本运输过程中的 SOPs,不同样本的运输条件,保证运送过程中的安全性。(2) 实验室应在提取前评估组织标本,FFPE 样本的肿瘤细胞含量应至少满足组织标本中肿瘤细胞含量在 20% 以上,对肿瘤细胞比例低的标本,必要时采用有效的富集方法,如纤维切割等,提高肿瘤细胞的比例。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。实验室需要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等。在制备文库前,应采用多种方法对核

酸质量进行评估,如纯度、浓度、是否有污染、完整性、片段长度和降解程度等^[27]。(3) 实验室无论采用杂交捕获建库或者扩增子建库,均需使用已经验证过的建库试剂,并在实验室建立建库过程中的 SOPs,PCR 的反应体系(聚合酶、引物、缓冲液和扩增反应条件等)会影响文库质量。尤其,针对 ctDNA 检测,可以采用基于双端 UMI 体系的技术,用于准确识别 ctDNA 突变,区别低频突变和检测过程中引入的错误。文库的质量会影响测序数据量产出,在上机测序前,应当采用 Qubit、荧光定量 PCR、2100 等方法,对文库进行质控。如实验室开展多个不同类型的结直肠癌检测项目,实验室应明确不同检测项目之间文库的质量标准^[30]。(4) 实验室开展结直肠癌基因检测项目时应优先选择 NMPA 批准的测序平台。实验室在选择平台时,应综合考虑测序读长、测序深度、测序区域、测序覆盖度、运行时间、数据产出等,选择合适的测序平台。测序过程中碱基的质量以 Q 值为参考标准,并且由于不同平台之间存在差异性,除了原始碱基识别的质量值,NGS 测序仪还需要参考覆盖深度、链偏倚等多种质控指标。(5) 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,提高对结直肠癌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。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。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、BAM-Surgeon 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 的细胞株 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。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^[33]。(6) 实验室应建立 SOPs 文件,明确不同阶段数据的保存格式,保存时间及保存位置,按照国际标准格式进行储存,并明确数据的管理方式。原始测序数据的保存应保证数据的安全性和患者隐私。原始数据是重要的检测过程记录,FASTQ(样本测序数据格式)文件和二进制比对文件(binary alignment map, BAM)应至少保存 2 年,变异注释文件(variant call format, VCF)建议长期保存。实验室必须建立本地变异数据库。

4.6 性能验证或性能确认 实验室应对待开展的结直肠癌基因检测项目进行实验室内部验证,如果是已经批准的高通量测序试剂,需要进行性能验证,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。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)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。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。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(positive percent agreement, PPA)和阴性符合率(negative percent agreement, NPA)来评价定性测定的准确度。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 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 等; 基因融合可以采用 FISH、实时荧光定量 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。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。如果是 LDTs 试剂, 则应通过试剂方法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 (分析前、分析中和分析后 SOPs), 建立试剂的分析性能指标及明确检测局限性。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^[33]。

4.7 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次检测弱阳性、阴性质控品和无模板对照样品。实验室可采用多个含有不同阳性结果的质控品, 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。如果质控品的检测与预期相符合, 报告可以发出; 如果质控品的结果和预期不相符, 则需要进行原因分析, 并保存相应记录, 在找不到合理解释的情况下, 实验室需要重新对样本进行检测^[3]。

4.8 室间质量评价或能力验证 实验室应定期参加室间质量评价 (external quality assessment, EQA) 或能力验证 (proficiency testing, PT), 如国际上的 CAP (College of American Pathologists)、CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments)、EMQN (European Molecular Genetics Quality Network); 国内的 NCCL (National Center for Clinical Laboratories) 和 PQCC (Pathology Quality Control Center) 等室间质量评价与能力验证项目, 来评估实验室的检测能力, 如有问题, 应采取措施改进。若该项目未开展 EQA/PT, 可以和外部实验室进行实验室间比对。EQA/PT 结果不合格或者实验室比对结果不符合者, 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^[3,34]。

专家组成员 (按姓氏拼音排名):

白 威 (山西省肿瘤医院)
郭增清 (福建省肿瘤医院)
胡晓桦 (广西医科大学第一附属医院)
李宇红 (中山大学肿瘤医院)
刘 静 (上海瑞金医院)
邱 萌 (四川大学华西医院)
王 峰 (中山大学附属肿瘤医院)
徐瑞华 (中山大学附属肿瘤医院)
应杰儿 (中国科学院大学附属肿瘤医院)
张艳桥 (哈尔滨医科大学附属肿瘤医院)
曾 珊 (中南大学湘雅医院)

撰写组成员 (按姓氏拼音排名):

陈 功 (中山大学附属肿瘤医院)
梁 莉 (南方医科大学南方医院)
梁智勇 (中国医学科学院北京协和医院)
邵建永 (中山大学附属肿瘤医院)
苏 丹 (中国科学院大学附属肿瘤医院)
唐 源 (四川大学华西医院)
王 峰 (中山大学附属肿瘤医院)
万德森 (中山大学附属肿瘤医院)
吴焕文 (中国医学科学院北京协和医院)
薛卫成 (北京大学肿瘤医院)
徐瑞华 (中山大学附属肿瘤医院)
应建明 (中国医学科学院肿瘤医院)
张 波 (北京大学第三医院)
周炜洵 (中国医学科学院北京协和医院)
周晓燕 (复旦大学附属肿瘤医院)

志谢 (按公司名首字母排序):

广州金域医学检验集团股份有限公司
广州燃石医学检验所有限公司
江苏先声医学诊断有限公司
南京世和基因股份有限公司
求臻医学科技 (北京) 有限公司
上海鹏远生物技术有限公司
上海睿昂基因科技股份有限公司
上海思路迪生物技术有限公司
无锡臻和生物科技股份有限公司
厦门艾德生物医药科技股份有限公司
因美纳 (中国) 科学器材有限公司
至本医疗科技 (上海) 有限公司

参考文献

[1] International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. [2021-01-10]. <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.

[2] Margaret E, Richard RS. Liver-directed therapies in metastatic colorectal cancer [J]. *J Gastrointestinal Oncol*, 2014, 5(5) : 374-387.

[3] 北京市临床检验中心,北京医学会检验医学分会,首都医科大学检验诊断学系,等.高通量测序技术临床检测规范化北京专家共识(第一版通用部分) [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(43) : 3393-3397.

[4] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南 2020 版 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2020: 1-115.

[5] 《结直肠癌分子生物标志物检测专家共识》编写组.结直肠癌分子生物标志物检测专家共识 [J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(4) : 237-240.

[6] Tarazona N, Henriksen TV, Carbonell-Asinset JA, et al. Circulating tumor DNA to detect minimal residual disease, response to adjuvant therapy, and identify patients at high risk of recurrence in patients with stage I-III CRC [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15 Suppl) : a4009.

[7] Koncina E, Haan S, Rauh S, et al. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: Updates and challenges [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2) : 319.

[8] Rossini D, Cremolini C, Conca E, et al. Liquid biopsy to predict benefit from rechallenge with cetuximab (cet) + irinotecan (iri) in RAS/BRAF wild-type metastatic colorectal cancer patients (pts) with acquired resistance to first-line cet+iri: Final results and translational analyses of the CRICKET study by GONO [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(15 Suppl) : a12007.

[9] Nicolazzo C, Belardinelli F, Caponnetto S, et al. Why the therapeutic impact of RAS mutation clearance in plasma ctDNA deserves to be further explored in metastatic colorectal cancer [J/OL]. *Front Oncol*, 2019 [2020-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921671/>.

[10] Benson AB, Venook AP, Mahmoud M, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN guideline) for rectal cancer version 2.020 [EB/OL]. [2020-12-15]. <http://www.nccn.org>.

[11] Benson AB, Vook AP, Mahmoud M, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN guideline) for colon cancer version 2.020 [EB/OL]. [2020-12-15]. <http://www.nccn.org>.

[12] Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103(2) : 210-216.

[13] Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(17) : 1596-606.

[14] Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline summary from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology [J]. *J Oncol Pract*, 2017, 13(5) : 333-337.

[15] Wang F, Zhao Q, Wang YN, et al. Evaluation of POLE and POLD1 mutations as biomarkers for immunotherapy outcomes across multiple cancer types [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(10) : 1504-1506.

[16] Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, et al. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(7) : 1096-1103.

[17] Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12) : 3012-3024.

[18] Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(3) : 133-150.

[19] Champiat S, Derclé L, Ammari S, et al. Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(8) : 1920-1928.

[20] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.中国结直肠癌诊疗规范(2020年版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(6) : 600-630.

[21] 中国临床肿瘤学会结直肠癌专家委员会,中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组,中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会.结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2019, 34(5) : 381-389.

[22] Provenzale D, Gupata S, Chen LM, et al. NCCN guidelines insights: Genetic/familial high-risk assessment: Colorectal, version 3.2019 [EB/OL]. [2020-10-20]. <http://www.nccn.org>.

[23] Stanich PP, Pearlman R, Hinton A, et al. Prevalence of germline mutations in polyposis and colorectal cancer-associated genes in patients with multiple colorectal polyps [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(10) : 2008-2015.

[24] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden [J/OL]. *Genome Med*, 2017 [2020-01-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395719/>.

[25] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组.肿瘤突变负荷检测及临床应用中国专家共识(2020年版) [J]. *中国癌症防治杂志*, 2020, 12(5) : 485-494.

[26] 中华医学会检验医学分会,国家卫生健康委员会临床检验中心.液体活检在临床肿瘤诊疗应用和医学检验实践中的专家

- 共识[J]. 中华检验医学杂志 2018 ,41(10) : 724-732.
- [27] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会 ,中国肿瘤驱动基因分析联盟. 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.
- [28] 黄 辉 沈亦平 顾卫红 ,等. 临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨[J]. 中华医学遗传学志 2018 ,35(1) : 1-8.
- [29] 北京市临床检验中心 ,北京医学会检验医学分会 ,首都医科大学检验诊断学系. 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) [J]. 中华医学杂志 ,2020 ,100(9) : 648-659.
- [30] Zhang X , Liang Z , Wang S , et al. Tumor Biomarker Committee OBOCSOCOC. Application of next-generation sequencing technology to precision medicine in cancer: joint consensus of the Tumor Biomarker Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology [J]. Cancer Biol Med 2019 ,16(1) : 189-204.
- [31] 《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测序检测专家共识[J]. 中华病理学杂志 2017 ,46(3) : 145-148.
- [32] Elena M , Stoffel MD , Erika K , et al. Germline genetic features of young individuals with colorectal cancer [J]. HHS Public Access 2018 ,154(4) : 897-905.
- [33] Fontanges Q , De Mendonca R , Salmon I , et al. Clinical application of targeted next generation sequencing for colorectal cancers [J]. Int J Mol Sci 2016 ,17(12) : 2117.
- [34] Endrullat C , Glökler J , Franke P , et al. Standardization and quality management in next-generation sequencing [J]. Appl Transl Genom 2016 ,10: 2-9.

收稿日期: 2021-02-03