

为进一步提高肿瘤个体化用药基因检测技术的规范化水平，7月31日，国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会，在广泛征求意见的基础上，制订了《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》。

### **为什么要制定《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》？**

肿瘤个体化治疗以疾病靶点基因诊断信息为基础，以循证医学研究结果为依据，为患者提供接受正确治疗方案的依据，已经成为现代医学发展的趋势。临床研究证实，通过检测肿瘤患者生物样本中生物标志物的基因突变、基因 SNP 分型、基因及其蛋白表达状态来预测药物疗效和评价预后，指导临床个体化治疗，能够提高疗效，减轻不良反应，促进医疗资源的合理利用。

肿瘤的个体化治疗基因检测已在临床广泛应用，实现肿瘤个体化用药基因检测标准化和规范化，是一项意义重大的紧迫任务。

《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》从诊断项目的科学性、医学实验室检测方法的准入、样本采集至检测报告发出的检测流程、实验室质量保证体系四个方面展开了相关论述，使临床医生能够了解所开展检测项目的临床目的、理解检测结果的临床意义及对治疗的作用；医学实验室为患者或临床医护人员提供及时、准确的检验报告，并为其提供与报告相关的咨询服务。检测技术的标准化和实验室准入及质量保证

对临床和医学实验室提出了具体的要求，以最大程度的保证检测结果的准确性。

### **《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》是如何修订问世的？**

《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》是参考现行相关的法规和标准以及当前认知水平下制定的，随着法规和标准的不断完善，以及肿瘤个体化治疗靶点基因的不断发现，本技术规范相关内容也将进行适时调整。

指南由中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室、苏州生物医药创新中心起草，经国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会、中国抗癌协会相关专业委员会、中华医学会检验医学分会、中华医学会肿瘤学分会的专家修订。起草人包括詹启敏、曾益新、王珏、姬云、钱海利、李晓燕、孙石磊。

### **《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》包括什么内容？**

《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》主要内容包括肿瘤个体化治疗检测分析前、分析中和分析后质量保证规范，从而使临床医生能够了解所开展检测项目的临床目的、理解检测结果的临床意义及对治疗

的作用，并指导临床个体化治疗，提高疗效，减轻不良反应，促进医疗资源的合理利用。

## **《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》适应于谁？**

指南由国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会制定，是国家卫生计生委个体化医学检测指南的重要内容，旨在为临床分子检测实验室进行肿瘤个体化用药基因的检测提供指导。本指南的主要适用对象为开展个体化医学分子检测的医疗机构临床分子检测实验室。

### **进行个体肿瘤诊断的样本类型**

肿瘤细胞是否存在，是开展肿瘤个体化治疗基因检测的重要前提。如果要确认肿瘤细胞存在，与病理诊断医生密切合作是非常必要的。《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》指出：鉴定个体肿瘤的样本包括新鲜组织(包括手术和活检组织)、石蜡包埋组织、胸腹水等细胞学样本、血浆样本这 4 种类型。

#### **新鲜组织(包括手术和活检组织)**

肿瘤新鲜冷冻材料可提取出最高品质的 DNA、RNA。在手术现场取样的情况也比较多，但需要在显微镜下确认肿瘤细胞含量。周围炎症严

重的肿瘤、黏液产生过高的肿瘤、病变中心广泛纤维化的肿瘤细胞不能采集，以免产生假阴性结果。切割后取其中一半，并利用另一半切面制作组织标本，然后进行确认。

手术切除的组织样本理想的保存方法是迅速置于液氮中，然后保存于液氮罐或-80℃冰箱，这一过程应在手术样本离体后 30 分钟内完成。由于组织样本通常需先进行病理学分析，在分析完成后应尽早将组织样本置于稳定剂中，避免核酸降解。

### **石蜡包埋组织 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)**

10%中性福尔马林固定手术切除样本，按病理学操作规范进行取材。制作石蜡切片时，切取 5 片连续切片，其中 1 片进行 HE 染色，确认肿瘤细胞的含量。在高灵敏度检测方法中，可考虑使用活检标本。

DNA 容易受固定的影响，长时间（1 周以上）浸泡在福尔马林中的样本的 DNA 会被片段化，不能检出突变。活检材料的固定时间一般是 24 小时，对于穿刺等活检样本，固定时间控制在 6~24 小时为佳。

### **胸腹水等细胞学样本**

用胸腹水中的肿瘤细胞用于基因检测时，必须确认肿瘤细胞，穿刺获得胸腹水样本提交给细胞病理检查之后，剩余液体冷藏/冷冻保存，也可在含有细胞成分的离心沉淀中加入含有蛋白质变性剂的缓冲液（AL 缓冲液，Qiagen 公司）等室温保存。由于细胞学样本的肿瘤细胞含量较低，因此必须使用高灵敏度检测方法。

## 血浆样本

循环 DNA(circulating free DNA, cfDNA)是存在于血浆中的游离 DNA, 肿瘤来源的 DNA 占血浆游离 DNA 的比例在不同肿瘤及病例中相差悬殊 (0.01~93%) , 从而限制了外周血在肿瘤分子检测时的应用。目前已有多篇文献证实可利用从血浆游离 DNA 检出突变，但需要使用 ARMS 法等灵敏度非常高的检测方法。

采集外周血提取血浆游离 DNA 进行检测，取样时应使用一次性密闭 EDTA 抗凝真空采血管，采集 6~10ml 全血，冷藏运输，6 小时内分离血浆，提取游离 DNA，保存到-80℃冰箱中，并避免反复冻融。如外周血需长时间运输，建议用商品化的游离 DNA 样本保存管，在常温条件下，cfDNA 在全血中可稳定保存 7 天。

## 9 大检测技术，孰优孰劣？

指南指出，肿瘤检测实验室按照《个体化医学检测质量保证指南》要求进行。在符合国家卫生计生委要求的个体化医学检测实验室和通过审核验收的临床基因扩增检验实验室完成。检测方法包括 Sanger 测序法、焦磷酸测序法（Pyrosequencing）、新一代测序（NGS）、扩增阻滞突变系统（ARMS）-PCR 法、高分辨率熔解曲线（HRM）法、数字 PCR（Digital PCR）、荧光原位杂交（FISH）、免疫组化（IHC）、荧光定量逆转录 PCR(Q-RT-PCR)这 9 种方法。

## **Sanger 测序法**

Sanger 测序法是 DNA 序列分析的经典方法，最直接的、可检测已知和未知突变的一种方法。由于该方法可直接读取 DNA 的序列，因此被认为是基因分型的金标准。

优点是测序长度较长，可发现新的变异位点，包括一些新的少见的突变形式及突变的确切类型，如点突变、片段缺失；局限性是灵敏度不高，突变等位基因需要超过 20%才能检出。对样本中肿瘤细胞的含量和比例要求较高，一般要求肿瘤细胞含量不低于 50%，如果肿瘤细胞比例低于 50%，则假阴性出现的概率会显著增加；不适用于活检或细胞学样本。

## **焦磷酸测序法（Pyrosequencing）**

焦磷酸测序技术是一种新型的酶联级联测序技术，其重复性和精确性可与 Sanger 测序相媲美，而测序速度则大大提高，非常适合对已知的短序列进行重测序分析。

主要优点是检测灵敏度为 10%，相对 Sanger 测序法高，对体细胞突变和甲基化等可实现定量检测；分型准确可靠，通量较高，实验设计灵活，可发现新的突变或遗传变异；局限性是测序长度较短，不能对长片段进行分析。检测灵敏度中等，难以检出低于 10%的突变。不适用于活检或细胞学样本。

## **新一代测序 (NGS)**

NGS 又称大规模平行测序 (MPS)，包含多种可以一次性产生大量数字化基因序列的测序技术，是继 Sanger 测序的革命性进步，采用平行测序的理念，能够同时对上百万甚至数十亿个 DNA 分子进行测序，实现了大规模、高通量测序的目标。不同厂家的产品测序原理不同，主要分为边合成边测序 (SBS)、基于“DNA 簇”和“可逆性末端终结”大规模平行测序、4 色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应测序和半导体芯片测序。

高通量测序技术不仅可以进行大规模基因组测序，还可用于基因表达分析、非编码小分子 RNA 的鉴定、转录因子靶基因的筛选和 DNA 甲基化等相关研究。

高通量测序技术有三大优点是传统 Sanger 测序法所不具备的：第一，它利用芯片进行测序，可以在数百万个点上同时阅读测序；第二，高通量测序技术有定量功能，样品中 DNA 被测序的次数反映了样品中这种 DNA 的丰度；第三、利用传统 Sanger 测序法完成的人类基因组计划总计耗资 27 亿美元，而现在利用高通量测序技术进行人类基因组测序，测序成本只需 1 千美金。

局限性是检测灵敏度和测序深度相关。一般来说，NGS 在肿瘤体细胞突变检测时，检测灵敏度为 10%；已知的与肿瘤相关驱动基因数量有限，疾病表型和基因型的关系还有赖于生物信息的解读，目前 NGS 应用于肿瘤细胞突变检测的标准化和质量控制尚未形成共识。

### **扩增阻滞突变系统 (ARMS) -PCR 法**

扩增阻碍突变系统 (ARMS) 是 PCR 技术应用的发展，也称等位基因特性 PCR (AS-PCR) 等，用于对已知突变基因进行检测，是目前实验室常用的基因突变检测方法。

主要优点是 ARMS-PCR 法检测灵敏度高,可检测肿瘤细胞中突变比例为 1%甚至更低的突变基因;局限性是只能检测已知的突变类型,不能发现一些新的、未知的突变;如果检测的突变位点或类型较多,则随着引物数目增加出现非特异性结合的概率也相应增加;当检测位点较多时,对 DNA 样本量的需求增加。

### **高分辨率熔解曲线 (HRM) 法**

高分辨率熔解曲线 (HRM) 是一种基于 PCR 新型技术,用于检测基因变异包括未知的基因变异、单核苷酸多态性以及基因甲基化。HRM 是基于在加热过程中双链变性为单链的原则,其分析不受碱基突变位点和种类的限制,可用于突变扫描、基因分型、序列匹配、DNA 甲基化等方面的研究。

主要优点是检测灵敏度 1%,特异性高,重复性好;封闭体系,减少污染的可能性;扩增和检测同时进行,无需 PCR 后进行处理;局限性是通过熔解曲线的图不能判断某一特异性的变异体,下游分析中检测需要有测序等补充。

### **数字 PCR (Digital PCR)**

数字 PCR 是一种核酸分子绝对定量技术。相较于 qPCR，数字 PCR 能够直接数出 DNA 分子的个数，对起始样品绝对定量，目前的应用包括稀有等位基因检测、基因表达绝对定量、核酸标准品绝对定量、二代测序文库绝对定量等。

主要优点是灵敏度可达 0.001~0.0001%，高特异性，可检测复杂背景下的靶标序列；可高度耐受 PCR 反应抑制剂；不必依赖对照品或标准品，可对目标拷贝数直接进行精确的鉴定，分析微小的浓度差异；实验数据分析便捷，每个微滴的检测结果以阴性、阳性判读，数据分析自动化；可统计突变率，通过统计分析可得出靶点的突变率。

不足的是，数字 PCR 仪通量较低，目前通常能检测的信号为 FAM 和 HEX。一般单个反应 2 重反应效果最佳；数字 PCR 优点是灵敏度高，但是对于 DNA 浓度大的样本处理就没有优势，而且核酸浓度高时，每个微滴里面包含的拷贝数不符合泊松分布；数字 PCR 虽然不依赖标准曲线，但是每次反应之间存在差异，短期内不能代替 qPCR，也不能代替其他金标准而作为首选方法。QX200 等数字 PCR 仪目前仅用于科研用途，数字 PCR 走向临床检验还需要一段时间。

## **荧光原位杂交 (FISH)**

荧光原位杂交(FISH)是通过荧光标记的 DNA 探针与细胞核内的 DNA 靶序列杂交,并在荧光显微镜下观察分析其结果的一种分子细胞遗传学技术,主要可对基因缺失、基因融合、基因扩增进行检测。

优点是可多种荧光标记,显示 DNA 片段及基因之间的相对位置与方向,空间定位精确;灵敏、特异性好,可同时分析分裂期和间期的多个细胞,并进行定量;可以检测隐匿或微小的染色体畸变及复杂核型;缺点是 FISH 检测对操作和判读技术要求较高,诊断医师必须经过严格的 FISH 操作和结果判读培训,只有经 FISH 操作经验丰富的医师判定的结果才具有可靠性;目前 FISH 检测的成本昂贵、通量低。

## **免疫组化 (IHC)**

免疫组化 (IHC) 分析利用抗体和抗原之间的结合的高度特异性,借助于组织化学的方法将抗原抗体结合的部位和强度显示出来,以其达到对组织或细胞中的相应抗原进行定性、定位或定量的研究。作为筛查工具优于 FISH,具有经济快捷的优点,尤其适用于大量样本的检测分析。影响 IHC 结果的因素主要包括抗体的选择、检测前组织的固定,观察者解释方面的差别等。

## **荧光定量逆转录 PCR(Q-RT-PCR)**

荧光定量 PCR 是检测拷贝数变化的一种快速且经济的技术方法，该方法技术可用于 RNA 表达水平检测该技术主要优点是检测快速、通量高、灵敏度好，主要不足是对肿瘤组织提取 RNA 的质量要求较高，在检测基因表达量时判读标准尚未统一。

### FISH、IHC 和 Q-RT-PCR 检测 ALK 基因重排的优缺点比较

	IHC	FISH	Q-RT-PCR
检测对象	蛋白	DNA	RNA
特异性	+	+	++++
发现的融合类型	已知、未知	已知、未知	已知
通量	++	+	++++
费用	+	++++	+++

指南指出，在检测方法选择策略上，实验室应优选国际和国内“金标准”的检测方法，同类方法中优先选择结果稳定性、重复性好、特异性高的技术，同时也应考虑样本量，检测项目的多少等，综合选择合适的方法。由于肿瘤组织的异质性，检测的组织样本中混有大量正常组织、石

蜡样本提取的 DNA 质量和数量有限，就检测灵敏度而言，目前 ARMS-PCR>焦磷酸测序>Sanger 测序。

在检测肿瘤基因突变时，不能一味追求检测方法的灵敏度，灵敏度高的检测方法对整个实验过程中的质控要求更为严格，需防止因污染而产生假阳性。

在肿瘤靶基因表达检测时，由于肿瘤样本的不可再生性，需谨慎选择使用的方法，如选用荧光定量 PCR 要求提取的总 RNA 量达 1 $\mu$ g 以上，如果肿瘤组织过小，提取的 RNA 量可能达不到检测要求，此时应考虑选用对样本量要求低的检测方法。

此外，药物基因组学也已成为指导临床个体化用药、评估严重药物不良反应发生风险、指导新药研发和评价新药的重要工具，部分上市的新药仅限于特定基因型的适应症患者，为此卫计委在颁发《肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行）》的同时，也同步颁发了制订了《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）》。