

将二代测序（NGS）融入到主流实验室测试

保持行业领先地位在当今时代十分重要。作为创新的测序平台，二代测序（NGS）可以同时执行数百乃至数百万个测序反应，并分析测序结果数据。最近，美国联邦医疗保险和补助服务中心（CMS）最终决定将为晚期癌症患者使用的NGS诊断实验室测试纳入其中。这一决定无疑将加速NGS在临床诊断中的应用。

商用版实验室信息管理系统（LIMS）于1982年上市。此前数年，科学家就已经开始DNA测序，以帮助控制实验室流程，跟踪样本、实验室工作流程和数据。在本文中，我们将讨论DNA测序如何发展到NGS，以及现代化的实验室测试如何提供更高质量的诊断测试和更有效的流程，以帮助简化DNA测序过程。

四十年前，DNA测序还是一个劳动密集型的手动过程，使用放射性物质，并只生成分离的DNA分子的序列。需要事先知道至少一小段DNA的碱基对序列，并将其作为引物，即测序酶的初始结合位点，然后生成此前未知的序列。新序列的末端将作为下一轮测序的引物。通过这种被称为桑格

测序的方法，一段完整的基因可以同时进行几百个碱基对的测序。平均每段基因有1万到1.5万个碱基对长，因此不难理解这有多耗时，即便是在1987年的自动化技术出现之后。

NGS平台最早出现于本世纪初，它建立在桑格测序方法（扩增测序）的基础上，但能够同时执行数百到数百万个测序反应，还能同时分析生成的测序数据。与早期的DNA测序相比，今天的NGS平台生成大量数据，速度极快且相对便宜。成本的不断下降促进了NGS这一自动化DNA测序方式多种新的应用。就在十年前，这些应用的成本仍非常高。

如今，NGS已进入医疗领域，并越来越多地应用于临床诊断（即诊断测试）。常用的NGS过程，包括全外显子组测序、DNA靶向测序、RNA测序和染色质免疫沉淀测序，已经应用于研究或以患者为中心的创新过程的开发和发明中。

NGS拓宽了临床诊断测试的领域

应用NGS的临床诊断领域包括遗传疾病诊断、肿瘤、遗传咨询和传染病管理。FDA首次批准的NGS测试用于遗传疾病，具体是Illumina的MiSeqDx囊性纤维化139变异测试和MiSeqDx囊性纤维化临床测序分析。在临床肿瘤领域，NGS被用于肿瘤描述，以提供对疾病预后的洞察，并帮助给出治疗措施。NGS还为个性化医疗方法的开发提供支持，这些方法使用基于NGS的伴随诊断检测，并与已开发并被批准仅用于特异遗传性肿瘤患者的药物配合使用。因此，该技术也有助于更好地进行基因调控。

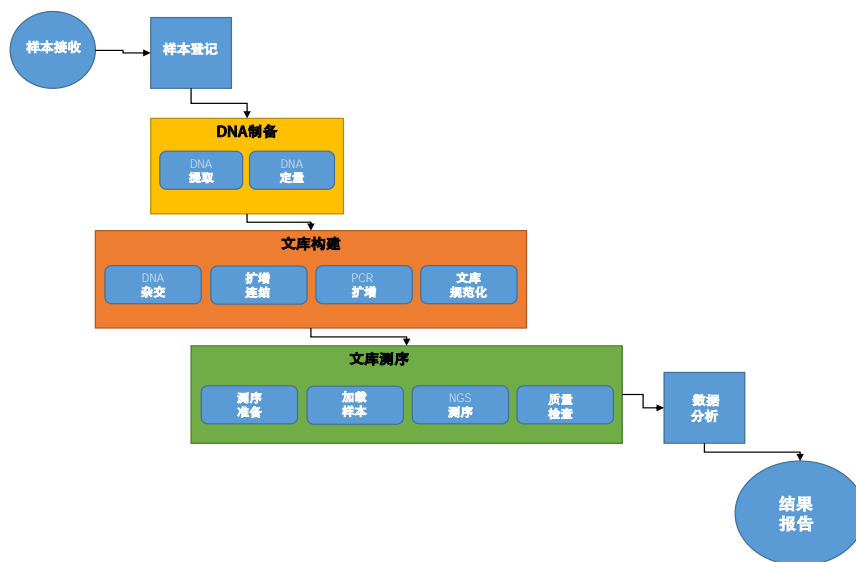
获得FDA批准的第一个NGS伴随诊断是Foundation Focus的CDxBRCA，其用于识别患有BRCA突变的卵巢肿瘤，且正在考虑使用Clovis Oncology的Rubraca (rucaparib) 进行治疗的患者。FDA随后批准的两个NGS伴随诊断分别是Illumina的Praxis Extended RAS Panel，

用于识别有资格接受Vectibix治疗的结直肠癌患者，以及Thermo Fisher Scientific的Oncomine Dx靶标试验，用于选择有特定基因突变的非小细胞肺癌（NSCLC）患者。

FDA批准的测试需要遵循专门开发和验证过的方案。但即便是FDA批准的最直接的NGS测试方案也涉及复杂的、包含多个步骤和程序的工作流。一个基本的NGS工作流可能涉及多个实验室，它们执行不同的功能，包括样本制备、DNA库制备和扩增子测序。在此之前，需要进行样本的接收和录入；在此之后，必须先对结果数据进行分析再发布结果。

监管机构努力紧跟NGS的步伐

在美国，临床实验室受到多种监管机构的监督。医疗保险和补助服务中心通过《临床实验室改进修正案》（CLIA）规范实验室检测。此外，某些州一级的要求可能还更严格。还有美国病理学家协会（CAP）等实验室专业组织，为临床实验室制定最佳实践指南。随着分子技术的发展，美国医学遗传学和基因组学学院（ACMG）和分子病理学协会（AMP）等组织也进入该领域。



2015年，美国医学遗传学和基因组学学院和分子病理学协会发布了关于临床诊断基因检测解释的联合指南。¹ 这些指南强烈建议在《临床实验室改进修正案》（CLIA）认证的实验室进行临床分子遗传学检测，同时涵盖了谁可以解释结果的具体内容。¹ 此外，这些指南还指出了进行结果确认的必要，如其所述，序列变异被认为是致病性的或可能是致病性的。¹ 该联合指南引用了美国医学遗传学和基因组学学院于2013年发布的一套专门针对NGS（自动DNA测序）的指南，其推荐了确证性试验的方法，并对开发、测试和验证方法以及报告标准提供了指导。²

除美国医学遗传学和基因组学学院以外，美国病理学家协会于2014年在其分子病理学检查表中新增了18项实验室认可的检查要求。³ 这些要求适用于基于NGS的多个疾病领域的检测，包括遗传性疾病、分子肿瘤和传染病。³ 这些要求还区分实验室的干湿区，并涉及关于NGS的众多主题，包括确证性诊断测试。³

LIMS系统需要满足NGS工作流的复杂性要求，包括多方面的样本处理和实验室的多种规范。但它未必能被配置以管理完整的工作流。为了得出最终结果，NGS严重依赖于数据分析，其取决于扩增测序软件的初始评估。初步分析要求确定核苷酸链的各个拷贝的确切序列，将短读与重叠的较长读进行比对，然后比较各个读数以确认变体，同时考虑信号强度、错误和其他质量指标。临床NGS实验室应为识别的变体设定阈值，并解释这些变体是否具有临床意义或为良性。² 为实验室开发的诊断测试应保持高标准，具体而言，即保证低误报率。

根据美国医学遗传学和基因组学学院的二代测序临床实验室标准，“建议所有以疾病为重点的和/或诊断检测都使用伴随技术进行最终结果的验证。”² 期望将来只有使用成熟的且经过验证算法的、最有经验的NGS实验室可以考虑使用正交技术而免除验证性测试。因此，实验室转而采用桑格测序这一DNA最常用的技术，而不是执行所有类别变体都要求的、或许被视为NGS技术应用的广泛的验证。

如同基因PANEL检测和其他靶向富集检测，“当前，建议所有以疾病为重点的高产基因检测完全覆盖每个被检测患者”²，桑格测序因此尤其有用。同时，可以使用重复测试来验证其他检测，其常见于肿瘤组织分析或镶嵌变体，或在原位杂交（FISH）中使用荧光等伴随技术。

LIMS满足NGS工作流

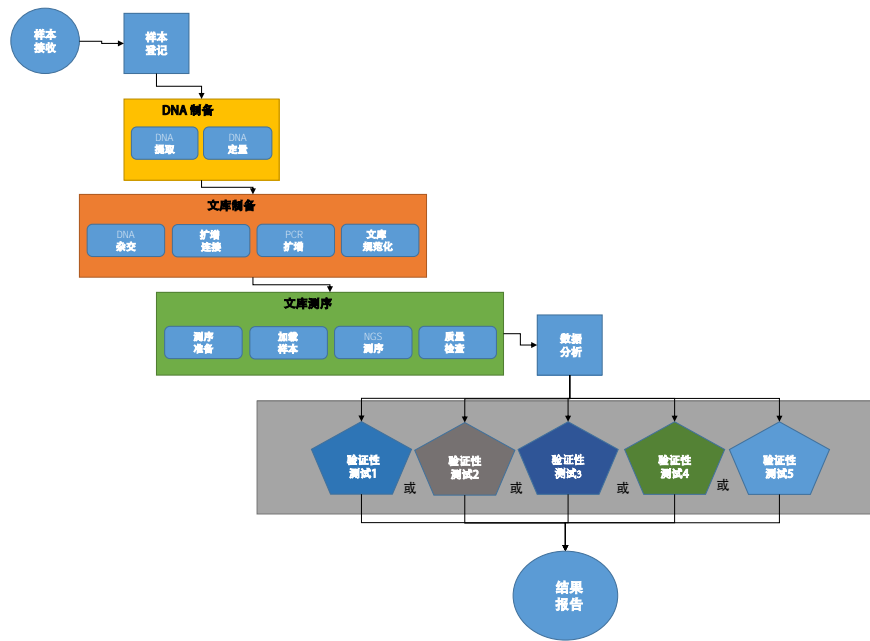
许多实验室已经实施了LIMS以管理其NGS工作流，包括记录突变结果。无论是使用单一LIMS还是组合多个系统，最终目标都是利用信息技术来管理完整的NGS过程。从样本提取、文库创建和扩增，到自动DNA测序，实验室如今开始将数据分析关联到工作流。然而，验证性测试通常不包含在工作流中。相反，它通常被视为单独的检测，甚至可能在LIMS中不包含在管理验证性测试之前的完整工作流中。然而，美国医学遗传学和基因组学学院建议，验证性测试应提前计划²，而美国病理学家协会的检查表则指出，实验室必须制定相关政策以实施必要的验证性测试。³

此外，在提供预计的检测交付时间时，实验室应考虑验证性测试所需的时间。如果要在验证性测试之前发布初步结果，建议在报告中指出尚待进行的验证性测试。例如，“以下结果尚未被其他方法或重复测试所验证。”¹

利用LIMS满足NGS的法规要求

示例

根据美国病理学家协会和美国医学遗传学和基因组学学院的指南，在包含20段基因的PANEL中发现的突变和新的变体，满足质量要求后还需要用桑格测序进行验证。假定检测到突变和新变体的患者比率为10%，PANEL内20段基因的验证性测试可分为5种方案。因此，一个每天运行数百个患者样本的高通量实验室可能需要对其10%的样本进行某种形式的验证性测试。进一步而言，在500个患者样本中，50个样本需要采用5种可能的方法之一，进行20种可能的验证性测试中的一种。



为了匹配LIMS中的验证性测试，可以设置规则，根据返回的结果进行下一个测试或触发另一测试。理想情况下，这将是无缝式工作流的一部分，无需将新样本重新提交至实验室并手动监督方法的选择。相反，它应该遵循既定规则，自动将测试重定向到验证方法，并在最终报告发布之前等待验证结果。

使用多基因癌症PANEL检测评估患者样本的高通量实验室面临着极具挑战性的工作流。桑格测序（扩增测序）是最常用的验证性测试的方法，它允许在同一平台上使用不同的引物对，但不太可能同时评估与一个NGS基因PANEL相关的所有引物对。使用LIMS管理可能需要验证性测试的样本数量会容易得多，可以设置规则，将样本导向不同的测试，识别哪些测试可以同时执行，而不必手动添加测试并在事后与原始样本关联。

NGS方法允许开发先进的临床测试，以提供更有针对性、更有效的患者护理方案。然而，临床环境中基于NGS的检测和结果分析的复杂性意味着实验室可能需要进行验证性测试。临床和非临床试验的实验室将验证性测试纳入LIMS过程是一件顺理成章的事。可以在新测试开发后配置工作流，并添加额外的验证方法。

利用LIMS，将基于预定逻辑的实验室样本检测方法结合起来，必将有助于提高实验室效率。随着NGS方法在过程和数据复杂性方面的发展，无论是在临床或研究环境中，还是在DNA测序的其他应用中，LIMS自动化和管理工作流、过程、结果分析和报告的能力将变得更加重要。

其益处是多方面的。自动化对基于规则的验证性测试方法的选择、样本安排和结果报告可以显著地降低成本，节省时间，同时减少手动数据输入和出错的可能。NGS的自动DNA测序能力可以发挥促进作用。LIMS的自动化还降低了忽略单个样本的验证性测试的可能。使用单一平台管理所有样本并整合第一轮测试和验证性测试以及最终的结果报告，可以提供更完整的视角，并方便通过单一访问点访问数据存储库，并能更快地向内科医生和临床医生发送保密的报告。

1. 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. *Genet Med.* 2015; 17: 405-424.
2. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013; 15: 733-747.
3. Aziz N, Zhao Q, Bry L, et al. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests. *Arch Path Lab Med.* 2015; 139: 481-493.

starlims.com



美国

电话: +1 954 964 8663

亚太区

电话: +852 2793 0699

加拿大

电话: +1 888 455 5467

法国

电话: +33 1 61 37 02 00

德国

电话: +49 2302 915 245

中国

电话: 010-6802 8080-189

拉丁美洲

电话: +1 954 964 8663

荷兰

电话: +31 72 511 8100

西班牙

电话: +34 91 663 67 64

英国

电话: +44 161 711 0340