

ICS 点击此处添加 ICS 号

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

CCS 点击此处添加 CCS 号

基于循环肿瘤 DNA 高通量测序的实体瘤分子残留病灶（MRD）检测技术指南

guidelines for Solid Tumor Molecular Residual Lesion (MRD) detection based on high throughput circulating tumor DNA

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发 布

目录

前 言.....	4
检测方法规范	5
1 范围	5
2 规范性引用文件	5
3 术语和定义	6
4 缩略语	7
5 检测原理	8
6 检测环境	9
7 试剂、仪器与耗材	9
8 样本采集、运输及保存	11
9 检测流程	12
10 结果判定	14
11 检测方法的局限性	17

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由 XXXX 提出。

本标准由 XXXX 归口。

本标准起草单位：XXXX。

本标准主要起草人：XXXX

基于循环肿瘤 DNA 高通量测序的微小残留病灶 检测方法规范

1 范围

本标准提出了基于目标区域杂交捕获方式高通量测序技术的微小残留病灶（Minimal Residual Disease, MRD）检测的检测原理、检测技术方法、试剂、仪器、高通量测序、数据分析、结果报告等环节的建立过程以及检测流程重点环节的质量控制要求等。

本文件适用肿瘤患者围手术期血浆样本循环肿瘤 DNA 检测，基于基因变异，提供患者 MRD 状态等信息，不适用于全基因组高通量测序法（WGS）、甲基化水平改变等检测的方法检测 MRD。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的规范性应用是必不可少的。对于标注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件；对于不标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 27025-2019 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37872-2019 目标基因区域捕获质量评价通则

GB/T 38576-2020 人类血液样本采集与处理

GB/T 38736-2020 人类生物样本保藏伦理要求

SZDB/Z 91-2014 人类样本库建设与管理规范

SZDB/Z 186-2016 用于高通量测序研究的人类血液样本采集、处理、运输和储存规范

SZDB/Z 244-2017 生物样本库中人类组织样本收集、处理、运输和储存规范
医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则（2010 版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 目标区域 **target region**

对于提供给用户的结果里的特征(如某基因或某表型)、以及用户诉求且获得承诺的特征(如某基因或某表型), 其在基因组上的关联区域, 叫作目标区域, 即这些区域的变异与上述特征存在已知的相关性。检测 HRD 的目标区域需包含可供 HRD 检测分析使用的特定 SNPs 位点的集合。

[参考: T/SZGIA 2-2018, 3.28。有改动, 增加了对 HRD 检测目标区域的描述]

3.2 杂交捕获 **hybridization capture**

目标基因区域捕获 **target region capture**

根据待富集的目标区域设计相应探针, 通过探针与待测基因组 DNA 进行杂交反应, 从而针对性捕获富集待测样本中的目标区域基因片段。

[参考: GB/T 37872-2019, 3.1.6]

3.3 高通量基因测序 **high-throughput gene sequencing**

区别于传统 Sanger (双脱氧法) 测序, 能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术, 通常一次测序反应能产生不低于 100Mb 的测序数据。

[参考: GB/T 30989-2014]

3.4 微小残留病灶 (MRD)

肺癌分子残留病变, 指经过治疗后, 传统影像学 (包括 PET/CT) 或实验室方法不能发现, 但通过液体活检发现的癌来源分子异常, 代表着肺癌的持续存在和临床进展可能。

[参考: 非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识]

3.5 读长 **read length**

测序的下机数据里, 每一条序列的平均长度。以碱基(bp)为单位, 常见的读长有 50bp、90bp、100bp、150bp 等。HRD 检测中常用的读长为 100bp 或 150bp。

[参考: T/SZGIA 2-2018, 3.8。]

3.6 测序质量 **Q20, Q30**

高通量测序中, 每测一个碱基会给出一个相应的质量值, 这个质量值用来衡

量测序准确度。碱基的质量值 20 的错误率为 1%，30 的错误率为 0.1%。行业中 Q20 与 Q30 则表示质量值 ≥ 20 或 30 的碱基所占百分比。

[参考：T/SZGIA 3-2018，3.5]

3.7 有效数据量

高通量测序所获得的数据通过质控、比对、去重复后比对到基因组上唯一位置，能够用于分析的有效的序列（reads）数量。

注：本标准中有效数据量的单位词头用 G 表示，1M 代表 1 000 000 000.

3.8 基因组覆盖率

高通量测序获得的有效数据覆盖基因组的物理长度占参考基因组总长度的比例。

3.9 阳性判断值 **cutoff value**

用作被测量对象阳性和阴性结果之间决定点的定量值。

根据试验设计选择一定的实验个体，经过对一定数量参考个体的观测和观察获得检验结果。通过对检验结果的统计，评估样本数据参考值的分布。通过方法或模型的建立，阳性判断值来源于参考值的分布，采用统计学方法如受试者工作特征曲线(ROC)划定并确定灰区（如适用）。

临床上应用时用于描述认识疾病程度及决定处理措施时的某一检验项目的分界值。

[参考1：体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则（征求意见稿）-参考值(参考区间)，附件10（2019版），有改动]

[参考3：REGULATION (EU) 2017/746 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MRD：微小残留病灶（minimal residual disease）

ctDNA：循环肿瘤DNA（Circulating tumor DNA）

cfDNA: 细胞游离DNA (cell-free DNA)

SNV: 单核苷酸位点变异 (single nucleotide variants)

Indel: 小片段的插入或缺失序列 (Insertion and Deletion)

CNV: 拷贝数变异 (copy number variation)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

bp: 碱基对 (base pair)

FFPE: 福尔马林固定石蜡包埋 (formalin fixed paraffin embedded)

BAM: 二进制比对文件 (binary alignment map)

NCBI: 美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)

LDT: 实验室自建项目 (laboratory developed test)

5 检测原理

多项高水平研究表明, 基于靶向捕获的高通量测序 (next generation sequencing, NGS) 可用于癌症患者术后血液的ctDNA检测, 动态监测MRD状态。MRD监测可对癌症患者的预后状态进行分层: MRD阳性患者预后较差, 复发风险高, MRD阴性预后良好, 复发风险低, 其有效性已在肺癌、结直肠癌和乳腺癌等多种实体瘤中得到证实。2021年NCCN指南指出“术后ctDNA被认为是I-III期结肠癌复发风险升高的标志物”。同年, 《结直肠癌分子检测高通量测序中国专家共识》也表明“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”。我国《非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识》也推荐“早期非小细胞肺癌患者根治性切除术后, MRD阳性提示复发风险高, 需进行密切随访管理, 建议每3~6个月进行一次MRD检测”。同时, 多项以MRD作为标志物的干预性临床研究也正在开展, 有望为MRD的临床应用积累更多证据。

目前主流的MRD检测策略主要包括固定panel策略和个性化定制策略。固定panel策略是指使用预先设计及实验验证的, 固定的探针检测面板对血液进行检测, 通过监测来源于肿瘤组织或者肿瘤相关的ctDNA变异在血液中的状态, 进行MRD检测。固定panel应使用目标癌种人群的肿瘤大数据进行设计, 包含癌种特

异的驱动基因、高频突变基因和肿瘤耐药进化相关基因。个性化定制策略是先对肿瘤组织进行全外显子（WES）或固定大 panel 测序以鉴定肿瘤患者的特异基因组变异图谱，然后设计探针定制个性化 panel，对患者血浆进行超高深度 ctDNA 测序以监测 MRD 状态。由于个性化定制策略每位患者使用独特的 panel，因此应严格遵守探针设计规范，并进行严格质控，以保证探针的捕获性能。

使用探针对血浆进行“单样本”检测，或同时使用外周血白细胞样本进行配对“双样本”检测。采用“双样本”分析时使用配对样本作为对照，而“单样本”分析时需要用正常样本构建检测的参考集作为对照。

使用相应的核酸提取试剂从血浆样本或配对的对照样本中提取 DNA，对提取得到的 DNA 样本进行打断（血浆 cfDNA 样本不需要打断），获得片段大小相对集中的随机基因组片段。对片段化后的基因组 DNA 进行末端修复、加“A”、接头连接，再经 PCR 扩增获得杂交前文库（即 pre-PCR 文库）。文库中的 DNA 片段和带有生物素标记的目标区域探针进行杂交捕获，通过生物素-亲和素反应使目标 DNA 片段结合在亲和素磁珠上，洗脱去除非目标区域 DNA 后，特异性捕获富集的目标区域 DNA 经 PCR 扩增获得杂交后文库（post-PCR 文库）。杂交后文库经过上机前处理，通过基因测序仪进行高通量基因测序。下机数据经过过滤、比对、去重、质控后输出突变结果，用于分析血液 MRD 状态。

6 检测环境

实验室环境和设施设置应符合 GB 19489-2008 中对生物安全二级实验室设计、设施、设备和管理的要求，医疗机构检测实验室还应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则（2010）》的要求。

高通量测序实验室工作条件宜符合《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识（2017版）》、《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）（2020版）》、GB/T 30989-2014 附录 B 等共识和标准中的要求。

7 试剂、仪器与耗材

7.1 检测概述

检测中涉及的设备、计量溯源性、外部提供的产品和服务的要求可参考GB/T

27025-2019。除特别说明以外，本文件所用试剂均用无DNA/RNA酶污染的容器分装，不同批号产品的组分之间不可以混用或互换。

7.2 提取试剂

7.2.1 核酸提取试剂

可采用经相关药品监督管理部门备案的核酸提取试剂，或其他等效提取试剂盒，按照试剂盒操作说明对FFPE样本、冷冻组织样本或外周血样本进行提取。

7.2.2 核酸定量试剂

可采用荧光定量仪（如Qubit）、分光光度计（如Nanodrop）配套的检测试剂，或其他等效定量试剂盒。按试剂或对应方法的操作说明对核酸进行定量。

7.2.3 核酸质控试剂

样本提取的核酸可采用凝胶电泳法检测DNA条带分布及RNA污染情况。

构建的DNA文库可采用微流控生物分析仪（如Agilent 2100、Caliper或Qsep）配套的检测试剂，或其他等效方法进行质量判断。按试剂或对应方法的操作说明对DNA文库进行质控。

7.2.4 MRD检测试剂

主要试剂包括末端修复酶及末端修复缓冲液、加A酶及加A缓冲液、连接酶及连接缓冲液、PCR反应液、接头、引物、目标区域探针、杂交反应缓冲液、杂交封闭液、杂交反应洗脱液、纯化磁珠、杂交捕获磁珠、DNA溶解液、无核酸酶水等。

其中，目标区域探针的优良设计和良好性能是关键影响因素。探针设计时应考虑以下因素：

a) 对于固定 panel MRD 检测，探针区域应包含癌种特异的驱动基因、高频突变和肿瘤耐药进化相关突变。推荐使用 Cosmic、TCGA 或自有数据库进行探针目标区域的筛选，监测的突变应符合我国肿瘤的分子遗传学特征。

b) 对于个性化定制 MRD 检测，由于根据每个患者肿瘤组织中检出的突变进行 panel 定制，应对严格遵守探针设计规范，并对每条探针进行严格质控，以保

证捕获性能。

c) 需保证目标区域探针可合成、并确保合成质量。

注：部分区域因结构复杂或不能确保良好的特异性等原因，供应商无法合成。

d) 需要保证区域具有良好的捕获效率和覆盖度，不具有明显的偏好性。

7.3 仪器与耗材

7.3.1 仪器

文库构建中使用的主要仪器包括PCR仪、离心机（台式或掌式离心机）、漩涡振荡器、恒温混匀仪、垂直混匀仪、浓缩仪、磁力架等。

核酸定量及质控使用的主要仪器包括荧光定量仪（如Qubit）、分光光度仪（如Nanodrop）、琼脂糖凝胶电泳系统、凝胶成像及分析系统、微流控生物分析仪（如Agilent 2100、Caliper或Qsep）等。

注：若文库构建采用物理超声打断法还需要超声打断仪。

7.3.2 耗材

主要耗材包括荧光定量反应管、移液器配套吸头（10 μ L、100 μ L、1000 μ L）、离心管（1.5mL、2mL、0.2mL及八连管）等。

8 样本采集、运输及保存

8.1 通则

样本采集应符合伦理要求，样本供方对样本捐赠的目的和研究用途等需明了和认可，供方自愿同意参与，并与检测机构共同签署知情同意书。伦理要求应符合GB/T 38736-2020。

外周血样本的取样建议参考《肿瘤组织标本库常用实验技术手册》等临床规范要求进行。样本的采集、保存及运输建议参考GB/T 37864-2019、SZDB/Z 91-2014等的要求。采集完成的样本标记好样本名称（或编号），将样本条码竖直粘贴到采样管上，并且在采样管上用记号笔标记清晰患者姓名、采样时间等信息。将另一份相同标签粘贴在采集表中（可手工录入患者完整信息，并再次校对），通过扫码枪扫描样本管或信息表上的条形码，在电脑上准确录入患者详细信息。

8.2 样本采集及处理

本检测技术涉及“单样本”和“双样本”检测两种原理，“单样本”检测仅血浆样本，“双样本”检测还需要同时检测对应的白细胞样本。需按照相应的要求对本检测技术中可能使用的样本进行采集和处理。

外周血样本采集参考医疗机构参考《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）（2015版）》、GB/T 38576-2020、SZDB/Z 186-2016等要求进行外周血样本的采集和处理。全血样本检测核酸时不使用肝素钠采血管，建议可采集血液样本于EDTA抗凝管中，采集量需满足检测项目起始量的要求，建议采集量20mL，轻轻颠倒5~8次，充分混匀，避免血液凝固及溶血。如近期有输血或移植操作，以及化疗后严重骨髓抑制等情况的患者不适合进行本检测的血液样本采集。

8.3 样本运输

EDTA抗凝管采集的外周血样本使用冰袋或其它制冷剂在2℃~8℃条件下密封运输，建议运输时间不超过5天，或按照相应采集管要求条件进行运输。

8.4 样本保存

待测外周血样本在0℃~4℃条件下暂存，储存前处理的时间建议不超过12个小时。若需长期保存应置于-80℃以下，应避免反复冻融（建议冻融次数不超过5次）。

9 检测流程

9.1 样本 DNA 提取

在样本制备区进行，参照核酸提取试剂盒的说明书取相应量的待检样本进行DNA提取。建议所提取的cfDNA总量大于30ng。

9.2 文库构建

参考建库说明书要求，对cfDNA进行末端修复及加“A”，然后再经过接头连接、纯化、捕获前PCR（Non-C-PCR）以及纯化的过程，得到捕获前中间文库。将中间文库浓度质控合格样本进行后续的杂交洗脱。建议所构建的pre-PCR文库浓度≥ 25 ng/μL，产量大于750ng。

9.3 上机测序

按照测序试剂盒的要求进行高通量基因测序反应。上一步的文库经上机前处理后加载至测序芯片上，按上机要求开展测序反应。上机测序的策略为双端测序，测序读长不小于 100bp（PE100）。

注：双端测序（pair end sequencing），也叫双向测序。将 DNA 样本处理成片段后，把引物序列连接到片段的两端，然后在引物序列末端加上接头。对加了引物序列和接头的两端都进行测序。两端序列成对存在，中间的距离叫插入长度（insert length）。可分为 PE50、PE90、PE100 等，分别表示每一端的读长均为 50bp、90bp、100bp（参考 T/SZGIA 2-2018，3.9.2）。

9.4 信息分析

将测序得到的原始数据进行质控及标签序列（barcode）拆分后，与人类参考基因组进行序列比对。人类参考基因组建议采用NCBI来源的GRCh37.p13版本，或UCSC来源的hg19版本。基于UMI（unique molecular identifier）对比对结果进行去重纠错。UMI可以区分由同一DNA分子扩增而来的多个DNA分子副本，并通过这些副本间序列比较去除扩增过程引入的碱基错误。通过比对（mapping）、局部重组装（local assembly）的方法，进行单/多核苷酸变异（single- and multiple-nucleotide variants）和结构变异（structural variation）的检测。通过基于深度比较的方法进行拷贝数变异（copy number variation）检测。

注1：标签序列（barcode），指高通量测序文库制备过程中，引入的一段已知碱基排布情况的外源核苷酸序列，通过这段序列区分不同的文库或样本。

注2：序列比对（sequence alignment），指比较两个或两个以上核苷酸或氨基酸序列间相似性的过程（参考GB/T 29859-2013）。

注3：UMI（unique molecular identifiers），指高通量测序文库制备过程中，DNA分子未进行扩增前引入的一段唯一核苷酸序列，通过这段序列可以区分不同的DNA分子。

10 结果判定

10.1 结果分析条件设定

10.1.1 基本要求

根据质控标准是否达到，以及阴性和阳性对照品的检测情况来判断整体实验与信息分析结果是否达到预期要求。对通过质控的样本进行MRD检测。

10.1.2 数据分析要求

基于高通量测序的微小残留病灶检测（MRD）检测技术的数据分析流程如下。

a)将原始下机数据比对到人类参考基因组（推荐GRCh37.p13或hg19），得到比对后的BAM文件。

b)根据UMI区分由于PCR过程中产生的过量扩增重复序列，通过比较重复序列间的序列一致性，对扩增带来的错误进行纠错，保留纠错后唯一的序列，得到用于后续分析的BAM文件。

注1：也可以在标注重复序列后加入重比对、碱基质量值校正（Base Quality Score Recalibration, BQSR）等步骤。

注2：碱基质量值校正（BQSR），指建立统计模型，通过校准测序仪的系统误差来调整每个碱基的质量分数。

注3：UMI可分为单端和双端，单端UMI支持单链序列的去重和纠错，双端UMI支持单链和双链序列去重纠错，双链序列纠错可以去重扩增过程中第一轮扩增引入的错误。

c)用变异检测软件(如Mutect2、VarScan等)，对进行单/多核苷酸变异（single- and multiple-nucleotide variants）和结构变异（structural variation）的检测，得到样本的单/多核苷酸变异和结果变异的信息。通过检测样本和正常样本的深度比较的方法检测拷贝数变异（copy number variation）。

d)针对既往检出过的变异（既往组织或血浆）和其他变异使用不同的阳性判断策略，过滤检出变异。

e)根据单/多核苷酸变异、结构变异和拷贝数变异检测结果给出MRD检测结果。给出的检测结果也可包括循环肿瘤DNA的含量，可以为百分比或绝对含量（hGE/mL、ng/mL、MTM/mL）。

注1: hGE (haploid genome equivalent) 为单倍体基因组当量, MTM (mean tumor molecules) 为平均肿瘤分子数, 均为常用循环肿瘤DNA分子绝对定量单位。

10.1.3 阳性判断值 (cutoff) 设定

通过信息分析检测待测样本的单/多核苷酸变异、结构变异和拷贝数变异, 再综合综合这些信息得到MRD结果。首先分别确定及验证单/多核苷酸变异、结构变异和拷贝数变异的阳性判断值, 再确定样本层面上判断样本样本的阳性判断值。单/多核苷酸变异、结构变异、拷贝数变异以及最终的样本层面的阳性判断值, 需在使用MRD检测试剂及其配套的数据分析流程 (或软件) 的条件下, 经其他技术 (如ddPCR) 验证过的标准品进行验证, 样本层面的阳性判断值还需在临床样本集中进一步验证。在后续应用实践中, 需始终确保经验证的试剂和分析流程 (或软件) 的配套使用, 否则需重新进行阳性判断值的验证。本MRD检测技术中的阳性判断值设定, 分为以下两个层面。

a) 生物学层面的阳性判断值的确认:

1) 变异层面阳性判断值确定: 使用变异及其突变频率已知的阳性标准品和确定不含目标变异的阴性标准品作为训练集, 阳性标准品应该由已知变异的多个频率梯度, 每个梯度应该包含多个重复的样本。在训练集中使用P-R曲线确定变异的阳性判断值, 要求为目标变异频率下, 变异检测的灵敏度 $\geq 95\%$, 特异性 $\geq 95\%$

2) 样本层面阳性判断值确定: 使用肿瘤细胞来源DNA含量已知的阳性标准品和确定不含肿瘤细胞来源DNA的阴性标准品作为训练集, 阳性标准品应该由多个肿瘤细胞来源DNA含量的梯度组成, 每个梯度应该包含多个重复的样本。阳性标准品可以使用两个细胞系按照一系列比例混合得到, 其中一个细胞系作为阳性样本, 另一个细胞系作为阴性样本。基于变异的结果, 确定样本层面的阳性判断条件, 要求目标肿瘤细胞DNA含量情况下, 样本层面的灵敏度 $\geq 95\%$, 特异性 $\geq 95\%$ 。

3) 临床队列的阳性判断值的验证: 以特定癌种中, 有治疗后随访信息的真实世界临床样本作为验证集, 验证上述生物学阳性判断值的复发预测效果, 从而得到经临床验证的阳性判断值。评价指标应为MRD检测结果能否有效预测复发, 包括复发样本集的灵敏度和提前时间、未复发样本集中的特异性、MRD

阳性和MRD阴性样本集的复发时间是否有显著差异。若生物学阳性判断值通过验证，则可作为特定癌种中的MRD检测最终阳性判断值；若需通过临床疗效结果进行调试，得到新的阳性判断值，则需在该特定癌种的新的临床疗效验证集中再次验证。

10.2 质控要求

10.2.1~10.2.4的质控要求应在同一次检测中同时满足，否则本次检测为无效，应重新进行检测。

10.2.1 数据质控

预处理后得到的BAM文件，需要进行质控。其主要指标如下：

a)测序数据应满足样本测序质量值 $Q30(\%) \geq 80\%$ 。

b)基因组比对率 $\geq 95\%$ 。

注：比对率（mapping ratio），指样本测序结果中，比对上参考基因组的 reads 数占该样本总测序 reads 数的比例。

b) MRD探针的捕获特异性（捕获效率）不低于20%

c) d)检测样本的有效平均覆盖深度应达到性能确认时建立的标准。建议血浆样本的有效平均覆盖深度 $\geq 3000 \times$ ，“双样本”时对照白细胞样本的有效平均覆盖深度 $\geq 1000 \times$ 。

e)MRD 监测应对检测样本的污染率进行评估，建议血浆样本的污染率 $< 1\%$ 。

注 1：有效平均覆盖深度（effective average depth of coverage），指高通量基因测序结果中，去除重复序列后基因组上待测目标区域中所有位点的平均覆盖深度。

注2：“平均覆盖深度”的定义参见GB/T 30989-2014中，定义3.32。

若不满足以上数据质控要求，应考虑重新建库或重新测序。

10.2.2 阴性质控品

满足数据质控要求，每次检测结果应满足阴性质控品检测结果为阴性，否则检测结果为无效，应重新检测。

推荐使用已通过其他方法检测，确定不会为阳性的阴性标准品或临床样本。

10.2.3 阳性质控品

满足数据质控要求，每次检测结果应满足阳性质控品检测结果为阳性，否则

检测结果为无效，应重新检测。

推荐使用已通过其他方法检测，确定为阳性的标准品或临床样本。

10.2.4 待测样本

满足数据质控要求，根据突变检出结果判断 MRD 阴阳性。

10.3 结果描述及判定

根据设定的阳性判断值进行检测项目的结果判定。若检测项目的阳性判断值未经过临床验证，则判定得到的结果仅体现为检测项目技术层面分析性能本身的结果，不代表具有临床上伴随诊断层面的推荐意义。

10.3.1 阴性判定

对于通过质控的待测样本，若分析得到的突变数量 $< \text{cutoff}$ ，则判定为 MRD 阴性。

10.3.2 阳性判定

对于通过质控的待测样本，若分析得到突变数量 $\geq \text{cutoff}$ ，则判定为 MRD 阳性。

注：若用于结果判定的 cutoff 值未经临床验证，则判定结果仅能代表技术层面的 MRD 阴阳性划分；检测结果临床上以 LDT 的形式参考使用。建议技术层面确定的 cutoff 进一步完成临床层面验证，在具体癌种中针对性开展，得到最终可用于临床结果预测的 cutoff 值。

11 检测方法的局限性

（1）检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

（2）肿瘤具有异质性，组织检测到的变异可能无法完全反映病灶部位全部细胞变异情况，不应仅因检测结果评估判断肿瘤是否消失或复发。

（3）MRD 检测结果阴性时不排除可能是由于样本中核酸过度降解或扩增反应体系中肿瘤细胞释放的游离 DNA 浓度低于检测下限（LoD）所致，低于 LoD 的样本再次检测时也可能无法检出。

（4）血浆中循环 DNA 源自病灶部位细胞释放入血液，并非所有病变细胞的变异都能释放入血，因此血浆中可检测到的变异可能无法完全反映病灶部位全部

细胞变异情况。

（5）不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

参考文献

- [1] 《结直肠癌分子检测高通量测序中国专家共识》（2021版）
- [2] 《非小细胞肺癌分子残留病灶专家共识》（2021版）