

组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂

（高通量测序法）

技术评价指南

目录

一、前言	- 1 -
二、适用范围	- 2 -
三、设计开发要求	- 2 -
1. 预期用途.....	- 3 -
2. 检测方法学.....	- 3 -
3. 主要原材料研究.....	- 3 -
4. 主要生产工艺及反应体系.....	- 4 -
5. 推荐配套使用的试剂和软件.....	- 4 -
6. 企业参考品.....	- 5 -
7. 企业质控品.....	- 5 -
四、TMB 检测试剂的性能评价要求	- 6 -
1. 测序平台的适用性.....	- 6 -
2. 文库制备和测序策略.....	- 6 -
3. 检测的数据量.....	- 7 -
4. 性能.....	- 7 -
4.1 TMB 检测一致性	- 7 -
4.2 TMB 位点检测准确性	- 8 -
4.3 TMB 检测重复性	- 8 -
4.4 与全外显子测序（WES）一致性	- 8 -
五、质量控制要求	- 9 -
1. 检测分析前质量控制.....	- 9 -
2. 检测分析中质量控制.....	- 9 -
2.1 样本制备的质量控制.....	- 10 -

2.2 文库制备的质量控制.....	- 10 -
2.3 上机测序的质量控制.....	- 10 -
2.4 数据分析的质量控制.....	- 11 -
3. 检测分析后的质量控制.....	- 13 -
3.1 报告的输出和系统链接.....	- 13 -
3.2 结果的报告和解释.....	- 13 -
4. 检测方法的局限性.....	- 14 -
六、名词解释	- 14 -
参与起草单位与人员	- 15 -
参考文献	- 16 -

一、前言

肿瘤免疫治疗是通过激发或调动机体的免疫系统，改善肿瘤免疫微环境和增强抗肿瘤免疫反应的方式，达到调控和杀伤肿瘤细胞的目的，包括免疫检查点抑制剂（Immune Checkpoint Inhibitor, ICI）、过继细胞免疫疗法（Adoptive Cellular Immunotherapy, ACI）及肿瘤新生抗原疫苗（Neoantigen）等。免疫检查点抑制剂药物（ICIs）是指通过抑制肿瘤细胞发出的阻断 T 细胞活化信号以恢复 T 细胞杀伤肿瘤细胞功效的一类抗肿瘤药物。在众多免疫检查点中，细胞程序死亡分子及其配体（Programmed Cell Death-1/Programmed Death-ligand 1, PD-1/PD-L1）为代表的免疫检查点抑制剂（ICIs）疗法在多种癌症中为有响应的患者带来了长期的生存获益。

肿瘤突变负荷（Tumor Mutational Burden, TMB）是每兆碱基（Mb）中发生置换、插入、缺失的体细胞突变总数。TMB 作为新兴的免疫治疗生物标志物，因其对 ICIs 临床疗效评估的预测意义而备受关注。采用适宜的方法，在临床适用的肿瘤类型中进行 TMB 检测，可对患者是否适用于免疫治疗，提供必要的医学指导信息。美国 FDA 已于 2020 年 6 月批准了帕博利珠单抗（Pembrolizumab）单药用于治疗不可切除或转移性的肿瘤组织样本突变负荷高（TMB-H, $\geq 10\text{Muts/Mb}$ ）的成人和儿童实体瘤患者（既往治疗后疾病进展且没有更佳替代疗法），无需考虑癌症类型。

本指南旨在规范对组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）的产品设计开发、产品性能评价和质量控制等方面的要求，并为技术审评部门对试剂盒注册申报资料的技术审评提供参考，不代替注册申报资料准备及撰写的指南和规范。本指南是指导性文件，应在遵循相关法规的前提下使用本指南。

本指南仅作为技术指导性文件使用，需根据技术的发展和实际需要适当的更新，本指南不具有法律强制性。

二、适用范围

本指南适用于组织肿瘤突变负荷检测试剂（高通量测序法），基于靶向捕获二代高通量测序方式，对人体肿瘤组织样本的肿瘤突变负荷（TMB）进行检测和质量评价。

对于第三代单分子测序或其他测序方法，在文中并未涉及。但高通量测序技术发展迅速，如有此类测序方法检测 TMB 的技术，在企业参考品设置、性能评估等方面若适用，可以参照本技术指导执行并证明实质等效性。

适用检测类型：肿瘤组织样本的肿瘤突变负荷检测，以高、低肿瘤突变负荷形式（TMB-H、TMB-L）进行报告。

检测试剂适用人群：对癌症患者进行肿瘤突变负荷检测，其结果仅提供临床参考，不作为癌症患者是否适用于免疫治疗的唯一标准。

伦理学问题：符合相关标准规范要求，禁止泄露受试者的个人信息。

人类遗传资源：样本采集、保存和数据的管理应符合人类遗传资源相应法规的要求。

三、设计开发要求

检测试剂的通用设计开发流程按照相关质量体系法规要求进行。本指南所述的组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）包含 TMB 实验检测流程和生物信息分析流程，不同环节的影响因素均可能对最终的 TMB 结果产生影响：如 TMB 实验检测环节可能受到样本质量、建库方法、测序平台、测序数据量等因素的影响；计算环节可能受到突变分析流程、检测目标基因（Gene-Targeted）panel 大小、TMB 纳入方案等因素影响。肿瘤组织的肿瘤突变负荷检测试剂（高通量测序法）的设计开发要求至少要考虑到以下几个方面：

1. 预期用途

明确组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）的预期用途，包括定性或定量检测、适用人群、肿瘤类型、样本类型、被测物质、检测结果和临床指导建议等。检测试剂的目的的一般是对肿瘤组织提取的 DNA 进行检测，以判断癌症患者的肿瘤突变负荷状态，从而帮助临床医生评估患者是否适用于免疫治疗。描述方式可按照《体外诊断试剂说明书编写指导原则》进行，介绍临床适应症及背景，说明相关的临床或实验室诊断方法等。明确试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为患者免疫治疗的唯一依据，临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

2. 检测方法学

阐明组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）的设计原理和方法学，需要重点指出设计原理和方法的关键点，以及产品预期达到的检测性能：

- (1) 详细说明检测 panel 目标捕获区域设计和大小，以及 TMB 计算区域的范围等；
- (2) 详细说明实验过程（如被测物类型、起始量、靶向目标区域文库构建方法及原理等）；
- (3) 详细说明数据分析和 TMB 计算过程（如阳性判断值、最低检测限、生信分析流程和原理等）；
- (4) 详细说明实验和数据分析过程中的质量控制。

3. 主要原材料研究

在产品的设计开发中说明主要原材料选择和确定的依据和方案。组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）主要原材料一般包括：建库试剂（标签接头、末端修复酶、DNA 连接酶、缺口修复酶及相应的缓冲液等）、靶向捕获探针及杂交缓冲液、扩增试剂（引物、酶及相应的缓冲液等）、纯化试剂（磁珠及相应的缓冲液等）、质控品/对照品等。

企业应提供完整的研究资料，如原材料的选择与来源、验证数据和质量标准等。应提供主要原材料如引物、探针、质控品/对照品的选择与来源、制备过程、质量分析和质控标准等相关研究资料。若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并提交工艺验证报告；如主要原材料购自其他供货商，应提供的资料包括：供货方提供的质量标准、出厂检定报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。

4. 主要生产工艺及反应体系

在产品的设计开发中说明主要生产工艺及反应体系确定的依据和方案。组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）生产工艺及反应体系研究一般包括：建库试剂（标签接头、末端修复酶、DNA 连接酶、缺口修复酶及相应的缓冲液等）中各主要反应步骤的酶和缓冲液用量、反应时间及温度等；靶向捕获探针及杂交缓冲液用量、反应时间及温度、以及杂交洗脱反应条件测试等；扩增试剂中引物、酶及相应的缓冲液等的使用配比、反应温度、时间；纯化试剂（如磁珠及相应的缓冲液等）的用量和洗涤次数；质控品/参考品/真实样本的投入量等。

企业应提供完整的研究资料，包括各反应步骤的测试方案，根据实际测试结果优化出最佳反应体系和条件，并做好相关记录。同步建立好初步的标准品体系，并使用标准品和小量临床样本完成预实验，进行检测试剂初步的性能分析。便于后续使用临床样本和标准品（或企业参考品），确定检测试剂的阳性判断值，以及进一步开展检测试剂的分析性能及稳定性测试。

5. 推荐配套使用的试剂和软件

组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）除了建库捕获试剂以外，还需推荐配套使用的重要试剂耗材和软件，可包括如下几个部分：

- (1) 样本采集时所需要的试剂或材料；
- (2) 肿瘤组织的保存、运输和储存相关的试剂或材料；

- (3) DNA 提取纯化相关的试剂或材料；
- (4) 核酸定量相关的试剂或材料；
- (5) 核酸片段大小评估相关的试剂或材料；
- (6) 通用测序试剂或材料；
- (7) 实验过程中使用的其它试剂或材料；
- (8) 生物信息分析软件。

推荐配套使用的试剂和软件必须在说明书中说明而且是在整个实验流程中得到充分验证的试剂和软件，可以是检测试剂的一部分也可以分开申报，但是肿瘤突变负荷检测试剂以及推荐配套使用的试剂和软件应该作为整体评估。

6. 企业参考品

应根据产品性能验证的实际需要设计企业参考品，包括阳性参考品、阴性参考品和重复性参考品。基于目标区域捕获测序方法的组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）应满足国家参考品或经过标化的企业参考品的检测要求，企业参考品的设置应参照国家参考品进行；如采用其他原理的组织肿瘤突变负荷检测试剂，若国家参考品不适用，企业则需提供企业参考品，并且证明其实质等效性。

7. 企业质控品

质控品是指在检测流程中加入的质控物质。其成分应该均一和稳定，与检测患者样本的基质相似或一样。其目的是用于控制实验流程的重复性或效率，保证检测的有效性等。例如：

阴/阳性质控品：应设置过程控制阴/阳性质控品，能够监控从样本 DNA 片段化到最终测序结果全过程。阴性质控品和阳性质控品的浓度根据测序平台的需求确定。建议每个检测 run 或测序进行阴性和阳性质控品的检测。

四、TMB 检测试剂的性能评价要求

体外诊断试剂检验结果的准确性、不同厂家同类产品检验结果的一致性产品质量的关注点。产品的质量评价一般要考虑与产品性能密切相关的准确度、特异性、重复性和检测限等指标。

1. 测序平台的适用性

目前商业上常用的第二代测序平台根据测序原理可分为光学技术（Illumina 公司、华大基因公司为代表）和半导体技术（Thermo Fisher Scientific 公司为代表）。每个测序平台都有各自的特异性参数，包括仪器大小、通量、读长、运行时间及测序成本等，企业应结合具体的临床应用需求选择合适的二代测序平台并进行评估。

2. 文库制备和测序策略

本指南主要针对基于目标区域靶向捕获的二代测序方法检测肿瘤突变负荷进行技术指导，但在给予企业参考品一定的考虑和设计以后，本指南也可能适用于其它基于非二代测序平台方法或其它高通量测序方法（如适用）的检测手段。不同的测序平台要求的检测方法和文库制备方法也有所不同，与测序方法相对应的文库制备方法应该给予充分的考虑，特别是要求和预期用途匹配。

文库制备的方法学应阐明其相应的变量和测序策略的结合情况，如：测序类型（如单末端测序 SE 或双末端测序 PE）；测序的序列组成，长度和方向；测序的样本标签、组合标签或者其他有用的拆分标签；样本或者文库的混合方法（Pooling）；文库的扩增和纯化情况；样本 DNA 是否有预扩增和处理等。

鉴于目前高通量测序技术的复杂程度，在文库制备、测序等技术过程中发生认为错误或意外的情况不能完全避免，应针对文库制备失败率进行限定。对现行的肿瘤突变负荷国家参考品检测，文库制备失败率应不高于 1%。

3. 检测的数据量

肿瘤突变负荷检测对样本测序深度有一定要求，在保证测序质量和准确率的前提下，测序有效深度越高，检测越准确。通过综合考虑其他因素，如实验间波动、人员操作系统差异等，设定合理的数据量要求及其他质控标准。

在现行的肿瘤突变负荷国家参考品中，考虑到降低数据量可能导致假阴性和假阳性发生，单个肿瘤样本有效测序深度的要求不低于 500×。由于各测序平台读长不一样，所需的 reads 数量可能会有差异，但应该满足上述覆盖度和有效数据的最低要求。

4. 性能

4.1 TMB 检测一致性

组织肿瘤突变负荷应该根据试剂盒的性能合理的设置企业参考品并规定参考品检测的阴阳性符合率。模拟真实样本的参考品可以采用正常细胞和不同癌种的癌细胞等多种类型细胞系，要求所提取的 DNA 量和片段大小等物理性能指标尽可能模拟真实肿瘤组织。

阴性参考品可以采用健康人正常细胞系，阳性参考品可以采用不同癌种的癌细胞系的模拟样本。应设置一定数量的阴性参考品，阴性参考品应不得检出肿瘤相关驱动突变。若 TMB 检测试剂预期用途适用于泛癌种检测，则设置的阳性参考品应该尽量涵盖不同癌种类型，并包括高、低肿瘤突变负荷值（TMB value）的样本。

在现行国家参考品中，阳性参考品为采用肿瘤细胞系基因组 DNA 按一定比例与正常细胞系基因组 DNA 混合的模拟样本。对肿瘤突变负荷国家参考品中用于 TMB 检测的参考品进行检测，TMB-5%和 TMB-10%参考品的标准 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90%预测区间的比例应不少于 90.0%；或对企业 TMB 参考品进行检测，结果应为相应的 TMB 状态。

4.2 TMB 位点检测准确性

点突变（Single Nucleotide Variants, SNVs）和插入/缺失（Insertions and Deletions, InDels）突变的检测性能直接影响肿瘤突变负荷检测性能，因此需要在参考品中考虑和设置。为了评估 SNVs 和 InDels 突变的检测准确性，现行国家参考品采用不同健康人的正常细胞系以一定比例梯度混合配置了差异性 SNVs 和 InDels 参考品。对肿瘤突变负荷国家参考品中高置信 SNVs 或 InDels 位点标准集的参考品进行检测，TMB-14-2%、TMB-14-5%和 TMB-14-10%参考品的突变检测准确性应分别不低于 40.0%、80.0%、90.0%。

4.3 TMB 检测重复性

为考察试剂检测结果的重复性，应建立重复性考核指标。应对指标的评价标准做出合理要求，如一致性、标准差或变异系数的范围等。对 TMB 重复性参考品进行检测，用同一批次试剂盒重复检测 10 次，结果均应为相应的 TMB 状态。

4.4 与全外显子测序（WES）一致性

目前 TMB 的检测方法主要为全外显子（Whole Exome Sequencing, WES）测序和目标基因（gene-targeted panel）靶向测序，而 WES 是公认的 TMB 检测金标准。Panel 靶向测序方法存在一定挑战，随着检测平台不同（Illumina 平台、Proton 平台及华大基因测序平台），各家试剂盒所检测的靶向基因不同，其阳性判断值（Cut-off 值）也会出现差异。为了评价 panel 靶向测序试剂盒与 WES 检测的一致性，使用临床样本进行肿瘤突变负荷检测，WES 的 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90%预测区间的比例应不少于 90.0%。

五、质量控制要求

1. 检测分析前质量控制

样本的采集和处理应该有相关验证。需说明肿瘤组织的采集和处理过程，说明样本保存要求，适用样本和质量要求，应用合规的组织采集仪器和耗材。注明样本的包装，保存和运输的流程及条件。

需指出肿瘤组织和/或配对癌旁组织样本的采集方法，处理条件（如福尔马林固定石蜡包埋、液氮冷冻），保存条件（温度、时间长度），运输条件；冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求等。

配对外周血样本（如需）：外周血样本的采集管，保存条件（温度、时间长度），运输条件，处理条件；冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求等。

样本应详细记录是否有测试局限性所规定的样本类型或特殊情况，如试剂盒是双样本分析流程但分析时无配对检测的癌旁组织样本；或近期输注异体血制品的外周血样本。

建立并记录标本接收和拒收的标准，如是否有以下情况：1）样本出现反复冻融的情况；2）样本标签不清晰的情况；3）样本信息与临床信息不符的情况；4）样本管出现裂管、开盖、泄漏或样品外溢情况等；5）样本有污染现象等。

2. 检测分析中质量控制

组织肿瘤突变负荷（TMB）检测试剂（高通量测序法）主要检测流程是：提取肿瘤组织和配对样本（如需）基因组 DNA、DNA 片段化、文库构建、上机测序。获得样本的测序数据，然后运用生物信息学软件分析获得癌症患者的点突变（SNVs）和插入/缺失（InDels）突变，最后通过统计分析得到肿瘤突变负荷状态。

应该对从检测样本到检测结果的检测周期给予质控要求说明，包括 DNA 提取、文库构建、上机测序、数据分析和报告的流程。

2.1 样本制备的质量控制

应说明 DNA 提取的样本起始量，说明可能会影响 DNA 提取效率的因素，比如裂解酶，干扰物质等；对检测过程质控的质控品、参考品和模拟样本的提取和制备过程也应进行说明。

基因组 DNA 提取应当在标本制备区进行，各项操作应当符合标准操作流程和说明书要求。

应当建立提取后 DNA 的质量控制标准，如 DNA 质量、纯度等要求。

2.2 文库制备的质量控制

文库制备应当严格按照标准操作流程或者试剂说明书进行。

文库制备的基本流程：DNA 片段化处理-末端修复-接头连接-片段纯化-文库扩增（杂交前文库）-探针杂交-磁珠捕获-文库第二轮扩增-片段纯化（杂交后文库）。

文库制备流程中应说明 DNA 片段化的方法，如超声法或酶切法等，比如超声法的功率、时间、温度等参数；使用酶切法的，应说明酶的使用量和反应时间，是否存在干扰物质等；应说明 DNA 片段化的 DNA 起始量，说明可能会影响 DNA 片段化效果（如片段分布、浓度、纯度等）的因素。

应建立文库质量控制的标准，包括文库检测浓度和/或文库片段分布范围的指标并验证。如有必要，测序文库的上机量应根据所使用的测序平台和芯片设立参考值，应规定装载测序芯片需要的测序文库使用量。可采用荧光定量，如 Qubit 等方法进行浓度的检测；可采用生物分析仪 2100、4200 和 Labchip 等方法分析片段分布。

2.3 上机测序的质量控制

不同测序仪有不同的质控方法，需根据不同的测序仪器和方法，建立测序仪的主要质量控制参数，如 Illumina 平台中使用簇密度（Cluster Density）、簇通过率（Cluster Passing Filter）对测序质量进行质控。在固定读长的情况下，影响

数据产出和测序质量 Q30 的主要因素是簇密度（Cluster Density）、簇通过率（Cluster Passing Filter）、碱基不平衡。华大 DNBSEQ 平台中使用加载的 DNB 数目（loaded DNB）、ESR（effective spot rate）等对测序质量进行质控。影响数据产出和测序质量 Q30 的主要因素是加载的 DNB 数目（loaded DNB）、ESR（effective spot rate）、碱基不平衡等。

2.4 数据分析的质量控制

生物信息分析流程一般包括下机数据的预处理、序列比对、去除重复序列、变异识别和注释、变异过滤、TMB 计算。根据产品的设计要求，选择合适的生物信息分析流程。生物信息学分析流程应描述清晰，包括每一步骤使用软件的名称、版本、参数设置要求、软件源（如自主开发、第三方开发）、原理等，并对使用软件的版本控制详细说明。数据分析流程可以首先使用模拟数据进行测试，但必须使用性能研究中真实产出的标准品和临床样本数据对其进行验证或校正。

在下机数据的预处理环节对应建立合理的质量控制指标并验证。测序下机后的原始数据，首先需要说明下机数据的格式（如 BCL 或 FASTQ），如需要对下机数据进行格式转换（如使用 bcl2fastq）也应进行说明和记录，根据样本的标签进行数据拆分，去除测序长度不达标或低质量的序列，才能进行序列比对。数据分析过程中应对测序片段进行碱基识别和质量评分分析并记录，质量评分分析可以采用各种适用的方式，如 Q 值（如 Q30 百分比）、数据量（例如 reads 的数量或碱基数量）等。

在序列比对和去重环节，使用比对软件（如 BWA、SOAP 等）将下机预处理后的数据比对到人类参考基因组（如 NCBI build37）；去除重复比对的序列后进行后续分析。应建立比对和去重的质量控制标准，设置对应指标的阈值并进行记录。可以采用的指标有：reads 对比参考基因组的百分比，reads 对比目标区域的百分比，目标覆盖率，目标覆盖深度、有效覆盖深度、重复率、覆盖均一性等技术指标中一个或多个进行组合。

在变异检测和过滤环节，使用突变检测软件（如 gatkMutect2、sentieonTNscope、VarDict 等）得到捕获区域内 SNVs 和 InDels 突变的位置、突变 reads 支持条数、

突变频率等信息。使用突变注释软件（如 VEP、ANNOVAR 等）注释突变所在的基因、功能区域等信息；注释中使用的数据库版本和来源应详细说明，若为自建数据库或新数据库，应说明自建数据库或者新数据库的适用性，并明确所使用的数据库版本。应建立变异检测的阳性判断值（如突变频率、突变支持数等），详细说明该阳性判断值的确立和验证研究过程。按照阳性判断值进行过滤，根据人群中的发生频率、位点突变频率（配对样本中的突变频率）等信息区分体细胞突变和胚系突变。最后得到真实的 SNVs 和 InDels 体细胞突变结果。建立变异结果输出的判断标准，以及变异注释和输出的格式标准，并明确其中的质量控制要求。

明确 TMB 计算的位点筛选标准，纳入肿瘤突变负荷计算的突变集合一般是基因功能区域的体细胞突变（SNVs 和 InDels）。需在研究数据的支持下，建立纳入 TMB 计算的体细胞突变位点的质控标准，如是否通过阳性判断值的所有体细胞突变均纳入 TMB 计算，或需要通过一定频率（如 1%、2% 等频率过滤）进行过滤后再纳入 TMB 计算；或说明是否将功能类型为错义突变、移码突变、非移码插入缺失突变、无义突变、起始位点改变突变、终止位点改变突变、剪接位点突变的非肿瘤驱动基因突变均纳入肿瘤突变负荷计算，或其他的纳入规则及其依据。将符合筛选标准、纳入肿瘤突变负荷计算的体细胞 SNVs 和 InDels 突变进行计数，该突变数量与目标编码区大小（Mb）的比值即为目标基因组区域内的肿瘤突变负荷值，单位为平均每 Mb 区间的突变数量（Muts/Mb）。需说明目标编码区大小是否是整个 panel 的大小范围，如果进行了 panel 区域筛选，需详细说明筛选规则和验证依据。应确定 TMB 结果判断的阳性判断值的算法，并详细阐述选择该算法作为依据的原因（如权威文献、行业共识等），详细阐述计算公式和各参数代表的意义，并提交采用不少于规定数量的真实临床样本对阳性判断值进行试验验证的资料。由于目前肿瘤突变负荷存在多种计算方式，且更好的算法和数据处理方式仍在不断开发中，如采用新计算方式，应充分说明其科学合理性，并进行充足的真实试验数据验证。

检测数据应当进行安全备份。规定可追溯原始序列的核心数据保存的期限。详细说明并记录数据存储路径，如有本地存储，应该说明本地存储所需要具备的

能力，和存储备份的时间表和建议。应说明数据库是否为云端存储，以及数据库更新的流程和管理模式。

3. 检测分析后的质量控制

TMB 检测结果建议形成规范的正式报告。报告建议包括以下信息：样本基本信息如样本编号、临床诊断信息；肿瘤组织的采样日期、报告日期及肿瘤细胞含量；检测的项目和检测方法，如检测人员、检测项目设定阈值、检测结果、结果解释和建议。

（1） 检测有效性

应建立检测有效性的评价指标。如同时检测阴、阳性质控品，以阴、阳性质控品的结果反映检测的有效性。如阴性质控品结果必须为阴性，阳性质控品结果必须为阳性，说明此反应体系结果有效。

（2） 结果判断

应给出肿瘤突变负荷检测值、患者对应癌种的阳性判断值、肿瘤突变负荷高低判断结果。

（3） 结果描述与建议

检测结果应如实描述检测到的肿瘤突变负荷情况，但是检测结果仅供临床医生参考，不作为患者是否使用免疫治疗的唯一依据。

3.1 报告的输出和系统链接

报告的输出应该可以溯源到原始数据，如果报告输出是可以通过网络链接的，应该建立该方式确认和批准的流程。

3.2 结果的报告和解释

应建立标准化的结果报告格式，报告内容至少应该包括：a) 受检者基本信息：包括受检者姓名、性别、出生日期（或年龄）、临床诊断信息等；b) 样本信息：样本编号，样本类型，采样时间和部位，检测时间等；c) 检测项目：检

测产品/项目名称、panel 大小和阈值、检测仪器设备和试剂等；d) 检测结果和解读；e) 实验室信息：实验室名称和联系方式，检测人员等；f) 局限性说明。

报告中应注明本检测结果不作为唯一的临床诊疗依据，临床医生应综合受检患者的其他临床信息和具体情况进行诊断。

4. 检测方法的局限性

应注明检测方法存在的局限性。可从检测原理的局限性、分析有效性（如肿瘤细胞含量）和受试者的个体化差异等方面进行分析汇总后给出，并注明其对结果造成的影响。

（1） 检测原理局限性

肿瘤突变负荷检测试剂（高通量测序法）仅统计人类参考基因组中的可比对序列区域，可能还存在其它较为复杂的基因组序列或结构，导致在该区域不能正确检出突变，造成一定概率的假阴或假阳性。

（2） 分析有效性

鉴于当前医学检测技术水平的限制，有下列情形的癌症患者进行检测时，可能影响结果准确性或本检测方法不适用。包括：1) 无法采集肿瘤组织；2) 肿瘤细胞含量低；3) 肿瘤组织保存时间过长或者保存条件不当；4) 肿瘤异质性较大；5) 对照样本中存在肿瘤细胞污染；6) 肿瘤组织样本存在其他患者肿瘤细胞污染；7) 不合理的样本采集、转运及处理；8) 不当的实验操作和/或实验环境；9) 提取的核酸过度降解或保存不当；10) 医师认为有明显影响结果准确性的其他情形。

（3） 受试者的个体化差异

鉴于当前医学检测技术水平的限制和癌症患者个体差异，可能存在影响检测结果的情况，如无法获取原发灶肿瘤样本，只能使用转移灶进行检测的情况；或接受临床治疗后再进行检测的情况等。

六、名词解释

1. 肿瘤突变负荷（Tumor Mutational Burden, TMB）：

TMB 为肿瘤基因组区域中每兆碱基（Megabase, Mb）发生的碱基替换突变和插入缺失突变的数量总和，单位为 muts/Mb。

2.文库：

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等所得到的的一个重建分子群，如基因组文库、互补 DNA 文库、噬菌体展示肽文库等。

[来源：GB/T 30989-2014, 3.5]

3.目标基因 Panel：

针对某种疾病（如癌症）中的相关基因进行选择和设计，通过对所组成的基因面板（Panel）进行检测和分析，可以同时评估相应疾病中多种潜在的遗传变异原因。

4. 碱基识别质量：

衡量碱基正确识别的概率。通常以数字值直接表示。

[来源：GB/T 30989-2014, 3.29]

常用 Q20 或 Q30 表示。

参与起草单位与人员

中国食品药品检定研究院

曲守方 张文新 孙楠 李丽莉 黄杰

北京吉因加科技有限公司

陈晨 易玉婷 刘涛

南京世和基因生物技术股份有限公司

那成龙

深圳华大基因股份有限公司

于竞 林木飞

江苏先声医学诊断有限公司

秦勇 邓望龙

北京泛生子基因科技有限公司

杨洁

广州燃石医学检验所有限公司

汪浩

广州市达瑞生物技术股份有限公司

杨学习 吴英松

厦门艾德生物医药科技股份有限公司

董华 李旭超

福建和瑞基因科技有限公司

白健 王寅

参考文献

- [1] 刘巍,李婧婧,丁娅,等.PD-1 抗体联合替莫唑胺治疗晚期黑色素瘤的疗效及安全性分析[J]. 中山大学学报(医学科学版).2020, 41(3):452-459.
- [2] 吕萌萌,沈扬,卢锦,等.PD-1/PD-L1 抑制剂在妇科肿瘤中的研究进展[J].临床肿瘤学杂志. 2019, 24(12):1139-1144.
- [3] LEE M, SAMSTEIN R M, VALERO C, et al. Tumor mutational burden as a predictive biomarker for checkpoint inhibitor immunotherapy[J].Hum Vaccin Immunother.2020, 16(1): 112-115.
- [4] 吴鹏,赵玉梅,杨玲麟.肿瘤突变负荷作为非小细胞肺癌免疫疗效预测标志物的研究进展 [J].中国免疫学杂志.2019, 35(19):2414-2418.
- [5] Noskova H, Kyr M, Pal K, et al. Assessment of Tumor Mutational Burden in Pediatric Tumors by Real-Life Whole-Exome Sequencing and In Silico Simulation of Targeted Gene Panels: How the Choice of Method Could Affect the Clinical Decision[J]. Cancers (Basel). 2020,12(1):230.
- [6] Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers[J].J Clin Oncol. 2019,37(12): 992-1000.
- [7] Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, et al. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges[J].J Immunother Cancer. 2019,7(1):183.
- [8] Merino DM, McShane LM, Fabrizio D,et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project[J]. J Immunother Cancer. 2020; 8(1): e000147.
- [9] 石海林,何天基,刘峰,等. 基于 TCGA 数据库分析肿瘤突变负荷在肌层浸润性膀胱癌预后评估中的价值[J]. 癌变 畸变 突变,2020,32(6): 430-437+443.
- [10] 王军委,许昱,魏素菊.肺癌免疫治疗中肿瘤突变负荷(TMB)临床指导意义的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(14):1784-1790.
- [11] Hellmann MD,Ciuleanu TE,Pluzanski A,et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden[J]. N Engl J Med,2018,378(22):2093-2104.
- [12] Newman J,Seetharamu N,Saif MW. Burden of Proof:Evaluating the Efficacy of Tumor Mutational Burden(TMB)inPredicting Response to Immune Checkpoint Inhibitors[J].Cancer Med J,2020,3(Suppl 2):17-21.
- [13] Hatakeyama K,Nagashima T,Ohshima K, et al. Characterization of tumors with ultralow tumor mutational burden in Japanese cancer patients[J]. Cancer Sci,2020,111(10):3893-3901.
- [14] 童琳,丁宁,李佳旻,等. 晚期非小细胞肺癌患者肿瘤突变负荷与靶向治疗疗效相关性[J]. 中国临床医学,2019,26(4): 538-542.
- [15] 郭伟,尹高菲,段翰源,等. 头颈部鳞状细胞癌肿瘤突变负荷相关因素分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2020,27(1):13-16.

- [16] 李鑫,李梦玮,张依楠,等. 常用肿瘤基因分析方法及基于 TCGA 数据库的分析应用[J]. 遗传,2019,41(3):234-242.
- [17] Woodhouse R,Li M,Hughes J,et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin[J]. PLoS One,2020,15(9):e0237802.
- [18] Zhong Y,Xu F,Wu J,et al. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine[J]. Ann Lab Med,2021,41(1):25-43.
- [19] Budczies J,Allgäuer M,etal. Optimizing panel based tumor mutational burden(TMB)measurement[J].AnnOncol,2019,30(9):1496-1506.
- [20] Gao J,Ciriello G,Sander C,et al. Collection,integration and analysis of cancer genomic profiles:from data to insight[J]. Curr Opin Genet Dev,2014,24: 92-98.
- [21] 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.
- [22] 中国临床肿瘤学会血管靶向治疗专家委员会,中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专家委员会.肿瘤突变负荷应用于肺癌免疫治疗的专家共识[J].中国肺癌杂志,2021, 24(11): 743-752.
- [23] 《体外诊断试剂注册与备案管理办法》.国家市场监督管理总局令第 48 号, 2021 年 10 月 1 日.