



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1865—2022

BRCA 基因突变检测试剂盒及数据库通用 技术要求(高通量测序法)

General technical requirements for BRCA mutation detection kit and database

(High-throughput sequencing)

2022-10-17 发布

2023-10-01 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试剂盒要求 2

5 数据库的数据构成 3

6 数据库的数据规范 4

7 数据库的数据管理 6

8 解读标准 6

附录 A（资料性） BRCA 基因突变国家参考品 8

附录 B（资料性） BRCA 基因解读规则示例 10

附录 C（资料性） BRCA 数据库 15

参考文献 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专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会(SAC/TC 136)归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、深圳华大智造科技股份有限公司、广州市达瑞生物技术股份有限公司、北京市医疗器械检验研究院、北京吉因加科技有限公司、深圳华大基因股份有限公司、上海思路迪生物医学科技有限公司、厦门艾德生物医药科技股份有限公司、北京泛生子基因科技有限公司、广州燃石医学检验所有限公司、福建和瑞基因科技有限公司。

本文件主要起草人：曲守方、杨梦、杨学习、李达、易玉婷、王文靖、马静、李旭超、黄伟伟、汪浩、白健、邵康、李士森、吴英松、于婷、张文新、黄杰。

BRCA 基因突变检测试剂盒及数据库通用 技术要求(高通量测序法)

1 范围

本文件规定了 BRCA 基因突变检测试剂盒及数据库的试剂盒要求、数据库的数据构成、数据库的数据规范、数据库的数据管理和解读标准。

本文件适用于 BRCA 基因胚系突变检测试剂盒、BRCA 基因突变检测数据库和 BRCA 基因突变解读的质量控制。

本文件不适用于 BRCA 基因体细胞突变检测以及双脱氧法(Sanger)对 BRCA 基因突变进行检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械制造商提供的信息(标示) 第2部分:专业用体外诊断试剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

BRCA 基因突变检测数据库 BRCA variant database

基于针对乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene, BRCA)进行高通量测序的测序数据,使用规定的流程进行分析,并对突变结果进行解读,将检测到的变异分为致病、可能致病、意义未明、可能良性和良性5类,将测序数据、突变信息、解读结果等信息汇总在一起形成的数据库。

3.2

编码序列 coding sequence

编码一段蛋白产物的序列,始于起始密码子,终于终止密码子。

[来源:GB/T 34798—2017,3.2]

3.3

测序深度 depth of sequencing

待测样本中某个指定的核苷酸被检测的次数。

[来源:GB/T 30989—2014,3.31]

3.4

FASTQ 格式 FASTQ format

FASTQ 是基于文本的、保存生物序列(通常是核酸序列)和其测序质量信息的、每四行表示一条序列的标准格式。

[来源:GB/T 35890—2018,3.9]

3.5

位置 location

一个或一段碱基在另一段较长碱基上的相对坐标位置。

[来源:GB/T 34798—2017,3.6]

3.6

测序读长 read length of gene sequencing

测序能测得的最长基因片段的长度,通常以碱基数表示。

[来源:GB/T 30989—2014,3.24]

3.7

SAM/BAM 格式 SAM/BAM format

SAM 是基于文本的、存储核酸序列和其测序质量信息的、以每一行表示一条序列、每行以制表符分割成 11 列的标准格式,测序质量信息使用 ASCII 字符表示,BAM 是 SAM 格式的二进制格式。

[来源:GB/T 35890—2018,3.10]

4 试剂盒要求

4.1 外观

试剂(盒)应符合制造商规定的外观要求;试剂(盒)各组分应齐全、完整,无液体渗漏。标签应符合 GB/T 29791.2 的要求。

4.2 建库质量

使用国家参考品或企业参考品进行检测,应规定明确的文库构建失败率。

对于附录 A 中的国家参考品,文库构建失败率应不超过 2.0%,对于临床样本的失败率宜根据临床数据统计后给出。

注:本文件中所涉及国家参考品可参考附录 A。

4.3 准确性

使用国家参考品或企业参考品进行检测,BRCA 基因突变检测试剂盒应检出标示变异位点,且按照 BRCA 基因解读规则进行解读,解读规则可参考附录 B,结果应符合相应的评判要求。

参考品的设置应遵循以下原则:

- a) 参考品应包括 BRCA1/2 基因的突变位点;
- b) 参考品应包括致病、可能致病、意义未明、可能良性和良性 5 类变异。

试剂盒 BRCA 基因的检测靶区域宜不小于编码序列(coding sequence,CDS)±15 bp。

4.4 特异性

使用国家参考品或企业参考品进行检测,BRCA 基因突变检测试剂盒不应检出其他非标示的致病或可能致病的突变位点。

4.5 重复性

使用国家参考品或企业参考品进行检测,使用同一批次试剂盒重复检测 3 次,3 次试验结果均应满足 4.3 和 4.4 的要求。

4.6 BRCA 基因变异解读能力评价

解读规定的数据库数据,数据库解读结果应符合相应的要求。

注:解读已确认的 BRCA 基因 750 个突变位点的数据库可参考附录 C。

5 数据库的数据构成

5.1 测序平台

数据库建立者应明确数据来源的测序平台,包括可逆末端终止法测序的平台、联合探针锚定连接法测序的平台和半导体测序法的平台等。

5.2 测序方式

数据库建立者应规定测序数据的测序方式(双端测序/单端测序)和测序读长。

5.3 数据采集

数据采集应至少包括表 1 所列信息。

表 1 数据采集信息

序号	名称	信息内容
1	样本编号(sample ID)	提供原始样本编号,与 FASTQ 文件或 BAM 文件匹配
2	状态(condition)	提供受检者的状态,如果为肿瘤患者,提供肿瘤类型,如乳腺癌、卵巢癌等;如果为非肿瘤患者,填写“健康人”
3	胚系突变/体细胞突变(origin)	明确提交的突变为胚系突变或体细胞突变,如果是采用单样本检测无法区分二者的情况,填写“不详”
4	样本类型(sample type)	明确样本类型,如全血、口腔拭子或石蜡包埋组织等
5	参考基因组(reference genome)	宜统一使用 hg19/GRCh37
6	染色体(chromosome)	提供识别变异的绝对唯一的信息,染色体位置宜使用起始为 1(1-based)的坐标系
7	染色体位置(chromosome position)	
8	参考基因组碱基(reference)	
9	突变的碱基(alternative)	
10	纯杂合性(zygosity)	适用于胚系突变,不适用于体细胞突变
11	突变频率(allele frequency)	适用于胚系突变/体细胞突变
12	基因(gene)	BRCA1/2
13	外显子/内含子区域(ExIn_ID)	提供突变所在的外显子、内含子等位置信息,如外显子 1(exon 1)、内含子 1(intron 1)

表 1 数据采集信息 (续)

序号	名称	信息内容
14	功能改变(function)	提供突变的功能改变类型,如同义突变、非同义突变、移码突变、非移码突变、终止密码子获得、终止密码子丢失等
15	转录本(transcript)	转录本为 BRCA1:NM_007294.3;BRCA2:NM_000059.3
16	碱基改变(cHGVS)	宜按照人类基因组变异协会(Human Genome Variation Society, HGVS)命名法规范基因序列变异的命名
17	氨基酸改变(pHGVS)	
18	临床意义(clinical significance)	宜按照美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)解读规则,将变异分为 5 类,分别为致病、可能致病、意义未明、可能良性和良性
19	证据等级(evidence level)	宜按照 ACMG 规则对证据等级进行罗列
20	变异解读(variant interpretation)	宜按照 ACMG 规则对变异的详细情况进行描述
21	提交者(submitter)	提供检测机构名称
22	检测方法(detection method)	提供测序方法的信息,如靶向捕获测序或扩增子测序
23	检测平台(platform)	提供使用测序仪的厂商和型号
24	提交日期(date of submission)	提供数据提交的日期

6 数据库的数据规范

6.1 测序数据格式

数据格式应为 FASTQ 或 BAM 格式,质量值体系宜采用 Sanger 体系,应完成接头序列去除和数据质量值过滤。

6.2 测序数据的质量控制

6.2.1 BRCA 基因测序数据的质量控制

对 BRCA 基因检测靶区域的覆盖率应达到 100%,目标区域(不小于 CDS±15 bp)的平均测序深度宜 $>150\times$,测序的碱基质量值 Q30 或 Q20(或类似碱基质量值表述方式)宜不低于 75%,原始数据的 GC 含量宜在 45%~60%区间内。

6.2.2 靶向捕获测序的质量控制

目标区域(不小于 CDS±15 bp)的 50×覆盖度宜 $>99\%$ 。

宜满足检测实验室设置的其他质量控制要求。

6.2.3 扩增子测序的质量控制

目标区域(不小于 CDS±15 bp)的测序深度均一性(uniformity)宜 $\geq 90\%$ 。

目标区域(不小于 CDS±15 bp)的 50×覆盖度宜>99%。

宜满足检测实验室设置的其他质量控制要求。

6.3 信息分析流程

信息分析应核对样本信息以及原始数据路径,确认后进行分析。信息分析流程应包括过滤、比对、变异检测和注释。

示例: 使用 BWA 作为比对工具配合 SAMtools 进行 BAM 文件的生成和预处理,选用 hg19/GRCh37 作为参考序列进行序列比对、排序、归并和构建索引等步骤,使用 Picard-tools 的 MarkDuplicates 工具标记光学重复与 PCR 重复的 reads,对 BAM 进行质量控制(QC),得到深度、覆盖度、均一度等信息,使用变异检测软件(比如 GATK 等)对 SNP、Indel、CNV 进行变异检测。最后以 VCF 的格式输出变异检测结果,并使用注释软件进行注释。数据提供者根据不同的测序平台在信息分析流程中设置相应的质量控制(QC)指标,包含样本的 GC 含量、深度、覆盖度和均一度等,以及其他检测方法,如质谱、多重连接探针扩增技术(MLPA)等与高通量测序比对一致率等。

6.4 变异解读

6.4.1 变异注释参考信息

变异注释参考信息应包括以下内容:

- a) 参考基因组版本宜选择候选版本:GRCh37 (hg19),GRCh38 (hg38)。
- b) 参考的注释数据库版本宜选择候选版本:NCBI Annotation Release 104 或 105 对应 GRCh37; NCBI Annotation Release 106, 107, 108 对应 GRCh38。
- c) 参考的基因与转录本(转录本应标注版本信息)宜采用 BRCA1: NM_007294.3;BRCA2: NM_000059.3。
- d) 目标区域宜不小于 CDS±15 bp。

6.4.2 变异解读流程

对序列变异的临床意义判定和解析,应制定相关解读策略和流程,见图 1。按照遗传变异分类规则不同证据的判断标准进行变异分级时,判断变异在公共人群数据库的突变频率,收集变异在不同数据库及文献中报道的特定表型或家族史、群体对照、家系共分离、新发变异、等位基因相位及功能学实验的证据,确定针对特定变异类型的计算机预测结果及结构域信息。最后结合以上所有信息,按照遗传变异分类联合标准规则对结果进行加权计算,得到最终的致病、可能致病、意义未明、可能良性和良性的分级结果。在变异分级解读过程中各实验室可以根据实际情况调整优化分级流程步骤,部分变异不必走完全部解读流程,确保搜集的相关证据足以支持得出准确分级即可。

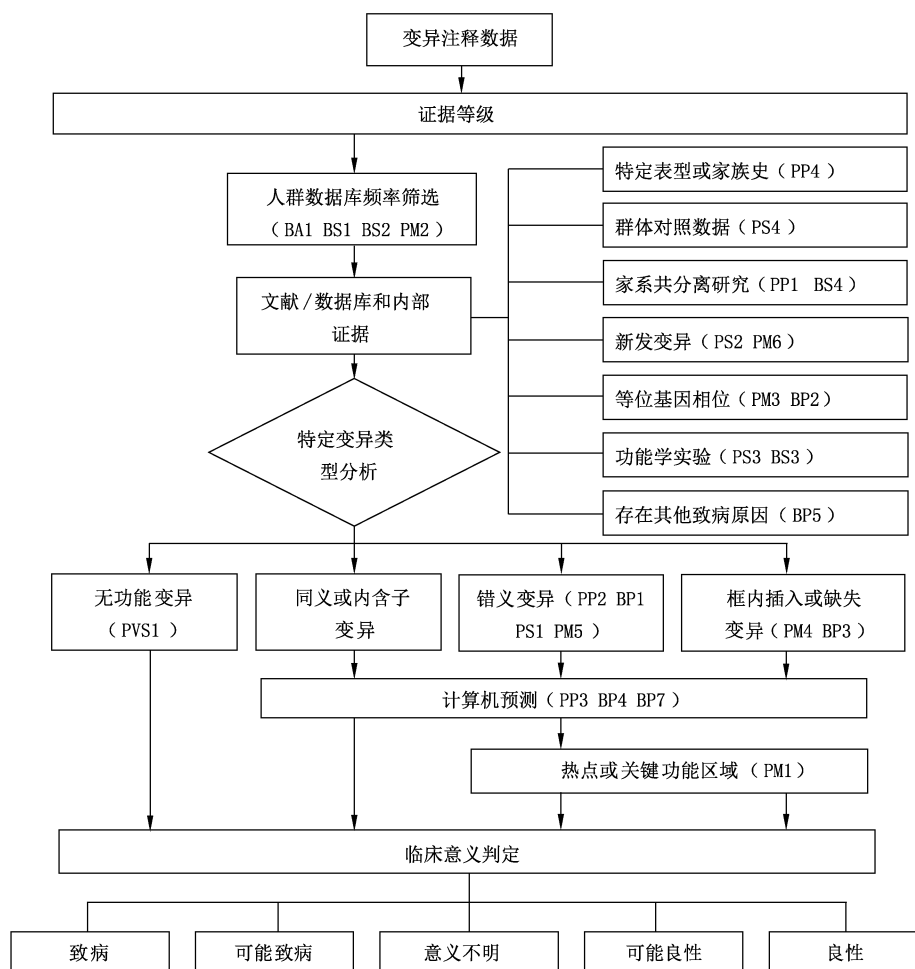


图 1 变异解读流程

7 数据库的数据管理

数据库构建时应确保数据的安全性、稳定性,并制定维护与升级方案和异常情况处置方案。

安全性方面,基因检测数据属于受检者的隐私,数据应保密,需要杜绝未经授权单位对数据的非法访问。数据库中的数据应在安全、稳定的介质中进行备份。

稳定性方面,应规定需要储存的数据内容,如 FASTQ、BAM、VCF 文件和最终的结果数据等,并给出建议保存时长,以确保在时限内可追溯核心数据。数据文件可以在本地或云端保存,如有本地存储,应说明本地存储所需要具备的能力和存储备份的时间表及建议。

数据库应具有完整的维护及升级方案,并针对可能发生的数据丢失、损坏、泄密等风险建立相应的预防措施和预防机制。

重要提示:人类遗传资源数据的管理应符合相应法规的要求。

8 解读标准

8.1 证据分级

在获得突变列表和家族史及表型信息后,应先将变异按照解读标准和规范进行证据分级,包括非常

强致病证据 (very strong evidence of pathogenicity, PVS), 强致病证据 (strong evidence of pathogenicity, PS), 中等致病证据 (moderate evidence of pathogenicity, PM), 支持致病证据 (supporting evidence of pathogenicity, PP), 独立良性证据 (stand-alone evidence of benign impact, BA), 强良性证据 (strong evidence of benign impact, BS), 支持良性证据 (supporting evidence of benign impact, BP)。

注 1: 解读标准和规范可根据美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 发布的遗传变异分类标准与指南及其他国内外解读相关文献制定, 参见附录 B。

注 2: 证据分级具有较好的灵活性, 基于收集到的证据和专业判断, 可以把某些证据用到不同的证据水平中去。

8.2 致病性判断

获取证据分级之后, 可以对每个变异获得的证据进行加权计算, 并按照遗传变异分类联合标准规则 (见 B.3) 分为致病、可能致病、意义未明、可能良性和良性 5 类。

8.3 参考数据库

变异解读时应使用参考数据库。判断等位基因频率应使用正常人群数据库, 包括但不限于外显子测序项目数据库 (NHLBI Exome Sequencing Project, ESP)、千人基因组数据库 (1000 Genomes Project)、外显子组整合数据库 (Exome Aggregation Consortium, ExAC)、gnomAD 数据库。判断已有文献证据应使用突变和疾病信息数据库, 包括但不限于 ClinVar 数据库、人类基因突变数据库 (Human Genome Mutation Database, HGMD)、Leiden 开放突变数据库 (Leiden Open Variation Database, LOVD) 和 BRCA Exchange 数据库 (BRCA Exchange database)。

附 录 A

(资料性)

BRCA 基因突变国家参考品

A.1 性状

DNA 样本。

A.2 用途

用于 BRCA 基因突变检测试剂盒的性能评价,适用于一代测序和二代测序,且在二代测序中适用杂交捕获建库和扩增子建库方法(除 25 号样本不适合扩增子建库外)。

A.3 组成及突变位点

参考品共 25 支样品,组成和突变位点信息见表 A.1。

表 A.1 参考品信息

编号	标示	基因	外显子分布	突变位点
1	BRCA1;K1183R_1	BRCA1	EX10	p.Lys1183Arg
		BRCA1	EX10	p.Asp435Tyr
		BRCA2	EX11	p.Asn1784Thrfs
2	BRCA2;V2466A_2	BRCA2	EX14	p.Val2466Ala
		BRCA2	EX18	p.Ile2675Aspfs
3	BRCA1;R1443STOP_3	BRCA1	EX12	p.Arg1443Ter
		BRCA2	EX11	p.Asn1784Thrfs
		BRCA2	EX11	p.Lys1691Asnfs
4	BRCA2;p.T3030fs_4	BRCA2	EX23	p.Thr3033Leufs
		BRCA1	EX10	p.Asn810Thr
5	BRCA1;K1780_splic_5	BRCA1	IVS19	c.5277+1G>A
6	BRCA2;p.T582P_6	BRCA2	EX10	p.Thr582Pro
7	BRCA2;p.R2318*_7	BRCA2	EX13	p.Arg2318Ter
8	BRCA2;p.T3357R_8	BRCA2	EX27	p.Thr3357Arg
9	BRCA1;c.981_982delAT_9	BRCA1	EX10	p.Cys328Terfs
10	BRCA2;c.5718_5719delCT_10	BRCA2	EX11	p.Leu1908Argfs
11	BRCA2;c.3109C>T_11	BRCA2	EX11	p.Gln1037Ter
12	BRCA1;c.3333_3333delA_12	BRCA1	EX10	p.Glu1112Asnfs
13	BRCA2;c.5171delT(p.Ile1724Lysfs)_13	BRCA2	EX11	p.Ile1724Lysfs
14	BRCA2;c.9274_9277delTATT(p.Tyr3092Cysfs)_14	BRCA2	EX25	p.Tyr3092Cysfs

表 A.1 参考品信息 (续)

编号	标示	基因	外显子分布	突变位点
15	BRCA2:c.6445_6446delAT(p.Ile2149Terfs)_15	BRCA2	EX11	p.Ile2149Terfs
		BRCA1	EX2	p.Met18Val
16	BRCA2:c.3883C>T(p.Gln1295Ter)_16	BRCA2	EX11	p.Gln1295Ter
17	BRCA1:c.5470_5477delATTGGGCA(p.Ile1824Aspfs)_17	BRCA1	EX23	p.Ile1824Aspfs
18	BRCA1:c.3800T>G(p.Leu1267Ter)_18	BRCA1	EX10	p.Leu1267Ter
19	BRCA:正常_19	—	—	—
20	BRCA2:c.988delA_20	BRCA2	EX10	p.Ile332Phefs
21	BRCA1:c.5156delT_21	BRCA1	EX18	p.Val1719Glyfs
22	BRCA2:c.275dupA_22	BRCA2	EX3	p.Ser93Ilefs
23	BRCA1:c.4013delA_23	BRCA1	EX10	p.Lys1338Argfs
24	BRCA1:c.68_69delCT_24	BRCA1	EX2	p.Glu23Valfs
25	BRCA2:21-27 号外显子杂合缺失_25	BRCA2	EX21_27	EX21_27 Del
注 1: 参考品说明书会根据参考品的批次进行变更。 注 2: “—”表示未检测到致病和可能致病的变异。				

附 录 B
(资料性)
BRCA 基因解读规则示例

B.1 变异临床意义分类

按照美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)解读规则,将变异分为 5 类,分别为致病(Class5)、可能致病(Class4)、意义未明(Class3)、可能良性(Class2)和良性(Class1)。

B.2 致病证据等级**B.2.1 致病证据等级****B.2.1.1 非常强致病证据(very strong evidence of pathogenicity,PVS):**

PVS1:无功能变异(无义突变、截短型移码突变、经典±1 或±2 的剪接突变、起始密码子丢失突变、单个或多个外显子缺失),且该基因的功能缺失(loss of function,LOF)是已知的致病机制。

BRCA1 第 1855 位氨基酸和 BRCA2 第 3309 位氨基酸前发生的无义突变或移码突变,可以作为 PVS1 证据支持。若为 1855 和 3309 氨基酸后发生的无义突变或移码突变需要结合文献情况进行综合判断。

对于经典±1 或±2 的剪接突变,部分剪接突变会导致框内 RNA 异构体,这类异构体可能会修复基因功能,不构成 PVS1 证据,见表 B.1。

对于任意外显子重复突变,如果该变异导致 BRCA1 第 1855 位氨基酸和 BRCA2 第 3309 位氨基酸前发生移码突变,可以作为 PVS1 证据支持。

对于 BRCA1/2 单个基因的缺失,在没有其他中等或支持证据情况下,可以独立使用 PVS1 证据判为致病。

为防止证据重复计算,PM4、PP3 与 PVS1 不能同时使用。

表 B.1 考虑为意义未明的已知或预测的 BRCA1/2 基因外显子交界区域变异

基因	选择性剪切事件	变异位点
BRCA1	$\Delta 8p$	c.442-1 (IVS7-1) c.442-2 (IVS7-2)
	$\Delta 9,10$	c.548-1 (IVS8-1) c.548-2 (IVS8-2) c.593 to non-G c.593+1 (IVS9+1) c.593+2 (IVS9+2) c.594-1 (IVS9-1) c.594-2 (IVS9-2) c.670 to non-G c.670+1 (IVS10+1) c.670+2 (IVS10+2)
	$\Delta 11q, \Delta 11$	c.4096 to non-G c.4096+1 (IVS11+1) c.4096+2 (IVS11+2)

表 B.1 考虑为意义未明的已知或预测的 BRCA1/2 基因外显子交界区域变异 (续)

基因	选择性剪切事件	变异位点
BRCA1	Δ13p	c.4186-1 (IVS12-1) c.4186-2 (IVS12-2)
	Δ14p	c.4358-1 (IVS13-1) c.4358-2 (IVS13-2)
BRCA2	Δ12	c.6842-1 (IVS11-1) c.6842-2 (IVS11-2) c.6937 to non-G c.6937+1 (IVS12+1) c.6937+2 (IVS12+2)
注 1: 已知或预测的 BRCA1/2 基因外显子交界区域变异会导致自发框内 RNA 异构体,可能对基因功能具有修复作用,除非另有证据,这些位点变异考虑为意义未明。 注 2: “Δ”表示缺失,如 Δ11 指外显子 11 缺失、Δ11q 指外显子 11 的 3'端部分缺失、Δ13p 指外显子 13 的 5'端部分缺失。 注 3: 表中采用的 BRCA1 基因的外显子编号方式是跳过外显子 4。		

B.2.1.2 强致病证据(strong evidence of pathogenicity,PS):

- a) PS1:变异和已经报道的致病变异有相同的氨基酸改变,但核苷酸改变不一样。例如:c.34G>C(p.Val12Leu)和 c.34G>T(p.Val12Leu)。

若已经报道的致病变异是通过影响剪接致病,PS1 证据需要谨慎使用。

已知致病变异需要按照 ACMG 指南谨慎评估各项证据并对其致病性进行分类,疾病数据库结论不可作为致病性唯一标准。

- b) PS2: 经双亲验证的新发变异,且无家族史。

需要排除领养、捐卵、代孕、胚胎移植等非生物学因素影响。

对于新发变异标准的使用,患者的表型需要与变异基因异常引起的表型相吻合,当病人的表型与基因疾病一致但不是高度特异性的,建议降级。

- c) PS3:有公认的体内或体外功能实验结果支持变异常能导致基因或者基因产物产生破坏性影响。

功能实验是要能被验证的,可重复的,且是在临床诊断实验室被广泛成熟运用的。能直接评估突变对蛋白活性影响的证据力度强于间接评估方法,评估所采用的实验方法精度越高的力度越强,蛋白表达载体和人亲缘关系越近的力度越强,体内实验结果支持力度强于体外实验。

- d) PS4:变异在患病群体中的频率显著高于健康对照人群中的频率(P 值小于 0.05;对于患者和对照中相对风险值 RR(relative risk)或比值比 OR(odds ratio)>5 且置信区间不包含 1 时可使用该证据)。

某些非常罕见的变异在病例对照研究无显著统计学差异,在多个相同表型且无亲缘关系的患者中观察到而对照中未观察到(人群数据库中无报道)可以作为中等致病证据。根据观察到的患者人数差异可以进行升级或降级使用。

B.2.1.3 中等致病证据(moderate evidence of pathogenicity,PM):

- a) PM1: 位于突变热点区或者非常明确的功能结构域,且该区域无任何良性变异。

- b) PM2:变异在 ESP 数据库、千人基因组数据库、ExAC、gnomAD 人群数据库中无记录或频率极低。

临床基因组资源(ClinGen)的变异解读工作组(SVI)认为该证据被赋予过高权重,降级为支持致病

证据,为避免 PM2 降级潜在影响其他分类规则,工作组提出一个非常强的证据和一个支持证据可判定为可能致病。

各实验室可按情况设置频率极低,频率极低可为 <0.0003 。

c) PM4:非重复区域的框内缺失/插入突变引起的蛋白质长度的改变以及终止密码子丢失导致的蛋白质长度改变。

d) PM5:新的错义变异导致氨基酸变化,此变异之前未曾报道,但同一位置上其他氨基酸改变为已报道的致病变异。例如:检测出 Arg156Cys 变异,该位置的 Arg156His 为已知致病变异。

已知致病变异需要按照 ACMG 指南谨慎评估各项证据并对其致病性进行分类。

若已报道的致病变异是通过影响 mRNA 剪接致病,除有体外实验证明目标突变也导致 mRNA 剪接时发生跳跃,否则 PM5 证据需要谨慎使用,见表 B.2。

e) PM6:未经双亲验证的新发变异。

表 B.2 已知会影响剪接的 BRCA1/2 基因的变异

变异名称	mRNA 改变	预测的蛋白改变
BRCA1 R1495M (c.4484G>T (p.Arg1495Met))	r.[4358_4484del, 4358_4675del]	p.(Ala1453GlyfsTer10)-predominant transcript
BRCA1 E1559K (c.4675G>A (p.Glu1559Lys))	r.[4665_4675del]	p.(Gln1366AlafsTer13)
BRCA1 A1623G (c.4868C>G (p.Ala1623Gly))	r.[4868_4986del]	p.(Ala1623AspfsTer16)
BRCA1 D1692N (c.5074G>A (p.Asp1692Asn))	r.[4987_5074del, 5074_5075ins5074+1_5074+153]	p.(Val1665SerfsTer8)-predominant transcript
BRCA2 R2659K (c.7976G>A (p.Arg2659Lys))	r.[7806_7976del]	p.(Ala2603_Arg2659del)
BRCA2 R2659T (c.7976G>C (p.Arg2659Thr))	r.[7806_7976del]	p.(Ala2603_Arg2659del)
BRCA2 P3039P (c.9117G>A (p.Pro3039Pro))	r.[8954_9117del]	p.(Val2985Glyfs*4)

B.2.1.4 支持致病证据(supporting evidence of pathogenicity,PP):

a) PP1:变异在家系中和疾病呈现共分离。

共分离家系成员越多,支持度越强,可以提升到中等或强致病证据。

家族史信息准确性、家系存在多个致病变异或环境等非遗传因素引发的拟表型现象都可能对共分离数据产生干扰,需要谨慎判断。

b) PP3:多种计算机软件预测变异会对基因或者基因产物功能有害,包括进化、保守性、剪接影响等(判断时不作为证据等级,但可写在报告中)。

若所有的预测软件结果一致可以作为一个证据;如果预测结果不一致则不可作为一个证据。常用错义突变预测软件为 SIFT、Polyphen2、MutationAssessor、MutationTaster 和 REVEL 等。常用剪接突变预测软件为 SpliceAI、MaxEntScan、NNSPLICE 和 Human Splicing Finder 等。

c) PP4:携带变异的患者表型或家族史与疾病的临床特征具有高度的一致性。

若满足以下条件,可以考虑作为支持证据。1) 临床检测灵敏度高,大多数带有该基因致病突变的

患者都被检测为阳性。2) 患者有某种明确的综合征的症状,与其他临床表现几乎无重叠。3) 该基因通常不存在太多的良性变异。4) 家族史与疾病遗传方式一致。考虑到肿瘤的异质性,此条证据需谨慎使用。

d) PP5:可信的报道认为是致病变异但无独立的实验室实验结果加以证明。

ClinVar 或 BRCA Exchange 数据库等,若不同数据库对 1 个突变的判断结果是跨级别的(Class 4 和 Class 5 归为一个级别;Class 1,Class 2 和 Class 3 归为一个级别),则该证据不能使用。

B.2.2 良性证据等级

B.2.2.1 独立良性证据(stand-Alone evidence of benign impact,BA)与强良性证据(strong evidence of benign impact,BS):

a) BA1:变异在 ESP 数据库、千人基因组数据库、ExAC 数据库、gnomAD 数据库或者中国人的基线数据库中的等位基因频率 $\geq 1\%$ 。

BA1 可将变异快速判读为良性,但需要注意没有任何标准适用于所有变异或种群,有些情况存在例外,对于特定人群的始祖突变(founder mutation),使用该证据需要谨慎。

2015 年 ACMG 指南将 BA1 中等位基因频率的阈值设置为 5%,英国癌症变异解释工作组 BRCA1/2 基因特异性推荐指南(Cancer Variant Interpretation Group UK,CanVIG-UK)等将该阈值设置为 0.1%,各实验室可按情况设置阈值,使用过程中要平衡好过度排除导致去除致病变异、过低排除导致剩余过多待解读位点的问题。

b) BS1:等位基因频率大于疾病发病率。

英国癌症变异解释工作组 BRCA1/2 基因特异性推荐指南及文献将该阈值设置为 0.01%,可供参考。

c) BS2:对于早期完全外显的疾病,在健康成年人中发现该变异(隐性遗传病发现纯合、显性遗传病发现杂合,或者 X 连锁半合子)。

BRCA1/2 基因相关的遗传性乳腺癌及卵巢癌综合征并不是早期完全外显的疾病,此条证据不适用。

d) BS3:体内或体外蛋白功能实验结果显示变异对蛋白功能或 mRNA 剪接无影响。

e) BS4:在一个家系成员中缺乏共分离。

需要考虑复杂疾病和外显率问题,比如在家系中缺乏共分离现象可能是非遗传因素或疾病未外显引起的,使用该证据需要谨慎。

B.2.2.2 支持良性证据(supporting evidence of benign impact,BP):

a) BP1:变异基因相关疾病的主要致病变异类型为无功能变异,但检出的为错义突变。

b) BP2:在显性遗传病中同时发现另一条染色体上同一基因的一个已知致病变异,或者是任意遗传模式遗传病中同时发现同一条染色体上同一基因的一个已知致病变异。

c) BP3:变异为框内缺失/插入,且变异所在位置为非重要功能的重复区域。

d) BP4:多种计算机软件预测变异对基因或者基因产物功能无影响(保守性、进化、对剪接影响等)。

e) BP6:可信的报道认为变异为良性但无独立的实验室实验结果加以证明。

f) BP7:变异为同义突变,且软件预测变异不会影响剪接或产生新的剪接位点,且变异所在位置氨基酸不保守。

B.3 遗传变异分类联合标准规则

按照遗传变异分类联合标准规则对结果进行分析,获得变异分级结果,见表 B.3。

表 B.3 遗传变异分类联合标准规则

类别	其他表述	证据
致病	Class 5	$1PVS + \geq 1PS$
		$1PVS + \geq 2PM$
		$1PVS + 1PM + 1PP$
		$1PVS + \geq 2PP$
		$\geq 2PS$
		$1PS + \geq 3PM$
		$1PS + \geq 2PM + \geq 2PP$
		$1PS + \geq 1PM + \geq 4PP$
可能致病	Class 4	$1PVS + 1PM$
		$1PS + 1PM$ 或 $1PS + 2PM$
		$1PS + \geq 2PP$
		$\geq 3PM$
		$2PM + \geq 2PP$
		$1PM + \geq 4PP$
意义未明	Class 3	不满足其他分类标准
		良性或致病性标准相互矛盾
可能良性	Class 2	$1BS + 1BP$
		$\geq 2BP$
良性	Class 1	1BA
		$\geq 2BS$

附录 C
(资料性)
BRCA 数据库

使用中国食品药品检定研究院建立的 BRCA 数据库时,将数据库的 VCF 文件导入企业的 BRCA 基因突变分析流程中,按照企业的生物信息分析流程进行分析,给出相应突变位点的解读结果。

C.1 解读结果报告要求

要求报告 CDS±15bp 以内的所有变异。
转录本宜采用 BRCA1: NM_007294.3 与 BRCA2:NM_000059.3。
报告结果至少包含表 C.1 中内容。

表 C.1 报告结果内容

编号	内容
1	样本编号(sample ID)
2	转录本(transcript)
3	碱基改变(cHGVS)
4	氨基酸改变(pHGVS)
5	突变频率(allele frequency)
6	临床意义(clinical significance)
7	变异解读(variant interpretation)

C.2 解读结果的评判规则

BRCA 基因突变结论分为两类:阳性(Positive),检出致病变异和/或可能致病变异,解读结果的临床意义为致病(Class 5)和可能致病(Class 4);阴性(Negative),未检出致病变异和可能致病变异,解读结果的临床意义为意义未明(Class 3)、可能良性(Class 2)和良性(Class 1)。
Class 5 和 Class 4 对于临床决策的影响不存在差异,因此以是否会对临床决策造成影响作为最终的判定依据,可按照表 C.2 对解读结果进行评判。

表 C.2 解读结果的评判规则

分类	不纳入解读错误	纳入解读错误
Class 5	Class 4	Class 3,Class 2,Class 1
Class 4	Class 5	Class 3,Class 2,Class 1
Class 3	Class 2	Class 5,Class 4,Class 1
Class 2	Class 3,Class 1	Class 5,Class 4
Class 1	Class 2	Class 5,Class 4,Class 3

C.3 数据库解读结果的判定

按照纳入解读错误的结果进行罚分统计，罚分规则见表 C.3。对数据库记录条数中具有相同位点突变的解读结果应一致，如结果不一致且出现纳入错误解读结果的变异解读结果，每一位点计罚分 5 分。数据库解读结果罚分应不大于 10 分，罚分不大于 10 分判定为解读通过评价，罚分大于 10 分判定为解读未通过评价。

注：数据库包括 BRCA 基因 750 个突变位点。数据库会进行变更，解读结果需要符合变更后的相应要求。

表 C.3 罚分规则

分类	不纳入解读错误	纳入解读错误	罚分
Class 5	Class 4	Class 3	5
Class 5	Class 4	Class 2,Class 1	5
Class 4	Class 5	Class 3	5
Class 4	Class 5	Class 2,Class 1	5
Class 3	Class 2	Class 5,Class 4	5
Class 3	Class 2	Class 1	2
Class 2	Class 3,Class 1	Class 5,Class 4	5
Class 1	Class 2	Class 5,Class 4	5
Class 1	Class 2	Class 3	2

参 考 文 献

- [1] GB/T 34798—2017 核酸数据库序列格式规范
- [2] GB/T 35890—2018 高通量测序数据序列格式规范
- [3] GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程
- [4] YY/T 0316—2016 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用
- [5] YY 0466.1—2016 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分:通用要求
- [6] 王秋菊, 沈亦平, 陈少科, 等. 遗传变异分类标准与指南. 中国科学: 生命科学. 2017, 47(6): 668-688.
- [7] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心. BRCA1/2 数据解读中国专家共识(2021 版). 中华病理学杂志. 2021, 50(6): 565-571.
- [8] Zhang J, Yao Y, He H, et al. Clinical Interpretation of Sequence Variants. Curr Protoc Hum Genet. 2020, 106(1): e98.
- [9] ENIGMA Consortium. ENIGMA BRCA1/2 gene variant classification criteria[EB/OL]. Version 2.5. [2017-06-29].
- [10] Larsson N, Borg Å, Hodgson S, et al. EMQN Best Practice Guidelines for Molecular Genetic Analysis in Hereditary Breast/Ovarian cancer. 2008.
- [11] Richardson ME, Hu C, Lee KY, et al. Strong functional data for pathogenicity or neutrality classify BRCA2 DNA-binding-domain variants of uncertain significance. Am J Hum Genet. 2021, 108(3): 458-468.
- [12] A Garrett, L Loong, L King, et al. CanVIG-UK Gene Specific Recommendations; BRCA1/BRCA2. Version 1.12.
-