

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0800

文章编号 1671-8852(2026)09-1234-08

高通量测序临床报告中遗传变异正交实验验证的 规范化建议

王京伟^{1,2} 乔斌¹ 顾剑² 张艳¹ 吴茜¹ 周方元² 郑红云¹ 包安裕² 徐万洲² 童永清^{1,2}

¹武汉大学人民医院检验医学中心 湖北 武汉 430060;

²武汉大学临床分子诊断研究所 湖北 武汉 430060

摘要 高通量测序(NGS)技术在临床分子遗传学检验领域应用日益广泛,已成为支撑临床分子诊断的核心工具,但其检测结果有效性验证的标准化问题仍亟待解决。尽管美国分子病理学协会(AMP)与全国遗传咨询师协会(NSGC)于2023年联合成立NGS变异验证工作组,推动验证流程标准化建设,然而业内对变异验证的必要性、验证范围界定及效益成本评估仍存争议,且国内相关规范体系尚未完善。本研究系统整合国内外指南、专家共识、文献综述及实验室实践经验,针对NGS变异正交实验验证(简称“正交验证”)提出12项实践建议,覆盖技术标准、医学决策、生物信息学流程及质量管理等关键环节。这些建议不仅为实验室制定兼顾检测效能与临床需求的个性化验证策略提供框架,更旨在精准平衡检测效能与临床价值的基础上,构建符合中国临床实践特点的NGS验证体系,为精准医学的规范化发展提供支撑。

关键词 高通量测序;遗传变异;正交实验验证;技术标准;临床价值标准

中图分类号 R446

文献标志码 A

Standardized recommendations for orthogonal experimental validation of genetic variants identified in clinical next-generation sequencing reports

WANG Jingwei^{1,2}, QIAO Bin¹, GU Jian², ZHANG Yan¹, WU Qian¹, ZHOU Fangyuan²,
ZHENG Hongyun¹, BAO Anyu², XU Wanzhou², TONG Yongqing^{1,2}

¹Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China;

²Clinical Molecular Diagnostics Center of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) technology has been increasingly applied in clinical molecular genetic testing and has become a core tool supporting clinical molecular diagnosis. However, the standardization of test result validation remains an urgent issue. Although the Association for Molecular Pathology (AMP) and the National Society of Genetic Counselors (NSGC) jointly established the NGS Variant Validation Working Group in 2023 to promote the standardization of validation processes, controversies remain in the field regarding the necessity of variant validation, the scope of validation, and cost-benefit assessments. Furthermore, relevant standardization systems in China remain to be improved. By integrating domestic and international guidelines, expert consensus, literature reviews, and laboratory practical experience, this study proposes 12 practical recommendations for orthogonal experimental validation (hereafter "orthogonal validation") of NGS-

作者简介:王京伟,女,1986—,医学博士,副主任医师,主要从事分子诊断个体化研究,E-mail:sophia_wang03@whu.edu.cn。

通信作者:童永清,E-mail:tytsing@whu.edu.cn。

identified genetic variants. These recommendations encompass critical aspects including technical standards, clinical decision-making, bioinformatics workflows, and quality management. These recommendations not only provide a framework for clinical laboratories to develop personalized validation strategies that balance testing performance with clinical utility, but also aim to establish an NGS validation system aligned with Chinese clinical practice by precisely balancing testing performance and clinical value, thereby supporting the standardized development of precision medicine.

Key Words Next-Generation Sequencing; Genetic Variation; Orthogonal Experimental Validation; Technical Standards; Clinical Value Standards

高通量测序(next-generation sequencing, NGS)技术凭借卓越的灵活性、可扩展性、高效性及经济性,已成为支撑临床分子诊断的核心工具。但其存在读长短、原始数据错误率较高等局限。与金标准 Sanger 测序相比,NGS 在插入和缺失(insertions and deletions, Indels)检测中假阳性率增加 15%~30%,在基因组复杂区域(如高 AT/GC 区、串联重复区、基因组同源区)的系统误差率可达常规区域的 3~5 倍^[1-2]。

测序技术的假阳性(False Positive, FP)错误可分为系统错误与随机错误。系统错误多见于基因组复杂区域,随机错误则可能均匀分布于不同质量区域。尽管系统误差根源已被量化分析,可助力识别高风险系统性 FP 并采取验证措施,但其仍为当前 NGS 应用中 FP 的主要原因^[3]。无论是真阳性(True Positive, TP)还是 FP 结果,均会直接影响临床决策,导致误诊、不当治疗,甚至过早终止对患者疾病真正病因的探寻。因此,对 NGS 变异实施正交实验验证(下文简称“正交验证”)至关重要。正交验证是指引入与主流 NGS 技术具有不同系统误差特性的独立技术平台或实验方法,对变异结果进行交叉验证。由于正交技术间的误差曲线重叠度最低,相互验证可有效排除各自系统误差引入的 FP,为检测结果准确性提供关键保障。我国《定性测定性能评价指南》(WS/T 505—2017)也明确,临床医生可依据经验证的筛查或诊断试验结果直接诊断^[4]。

然而,正交验证会增加时间成本、操作复杂性与经济负担,其必要性和综合效益常受质疑(尤其当 NGS 变异检出质量较高时),因此,NGS 实验室在明确哪些变异应纳入正交验证流程时往往面临巨大挑战,盲目扩大验证范围会加剧资源消耗,过度缩减则可能遗漏关键变异导致诊疗风险。因此,决策时需兼顾技术质量指标与临床实际需求。

NGS 质量标准是判断变异是否需要正交验证

的前提与基础,只有符合质量标准的变异才具备正交验证价值。建议实验室采用两级或多级变异过滤规则筛选变异:一级过滤为相对宽松的初级质量过滤规则,以测序深度(如体细胞变异 $\geq 30\times$ 、germline 变异 $\geq 100\times$)、变异质量值(QS ≥ 20 或 Phred 值 ≥ 30)、比对准确性(无重复序列/高 GC 区干扰、比对率 $\geq 90\%$)等核心指标为过滤标准,通过自动化生物信息学流程快速筛除 70%~80% 的低质量或明显 FP 变异(如碱基偏好、接头污染导致的变异),初步锁定符合技术质量标准的候选变异;二级过滤为严苛的技术标准,整合多个稳健的质量指标区分高置信度 TP 与低置信度 FP(图 1),重点审查通过一级过滤但位于基因组复杂区域的变异,或触发警告的变异[如新发变异、平台首次检出变异、等位基因比率偏离理想孟德尔比率的变异、Indels、移码、拷贝数变异(copy number variations, CNVs)、外显子边界 ± 5 bp 区域等]^[4],旨在进一步缩小正交验证范围或标记可疑变异(需人工复审)。

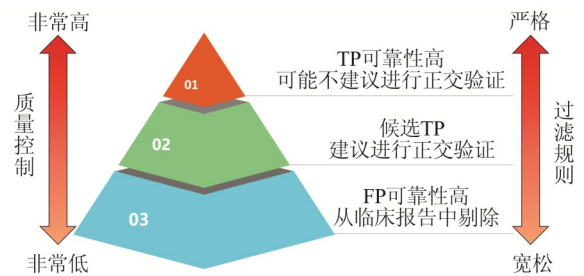


图 1 不同技术标准在甄别高质量 NGS 变异与分析潜在假阳性中的关键作用

两级或多级技术标准过滤规则结合正交验证方法可提高特异性和整体敏感性。实验室还可根据自身经验及已有数据建立假阳性热点图谱,规避重复验证。需要注意的是,宽松过滤规则往往伴随较高假阳性率与灵敏性,严格过滤规则虽牺牲一定灵敏性,却能有效降低 FP 率。因此,实验室在实际

操作中,需结合研究目标对敏感性或特异性的优先需求,通过优化过滤规则的严格程度,并搭配正交验证与假阳性热点图谱的应用,实现测序结果准确性与验证效率的平衡。

除技术层面外,还需参照变异的“临床价值标准”确定验证优先级,优先筛选对患者诊疗决策(如疾病确诊、治疗方案选择)、健康管理(如生育风险评估)、预后判断有直接影响的关键变异,具体包括:1)与患者检测指征紧密关联的高或中等外显率的致病性(pathogenic, P)和可能致病性(likely pathogenic, LP)变异,此类变异直接支撑疾病确诊、病因定位或治疗方案选择,结果准确性对临床判断至关重要;2)与患者检测指征高度相关且高度怀疑有害的意义未明变异(variant of uncertain significance, VUS),尽管其致病性尚未完全明确,但结合临床表型、家系信息等线索显示潜在临床影响,需通过验证进一步确认结果可靠性以辅助后续诊疗

评估;3)对患者长期健康(如肿瘤易感风险)或生育规划(如隐性遗传病携带者风险)有重大影响的次要发现(secondary findings, SFs),此类变异虽非检测主要目标,但关乎健康预警与生育决策,需验证以确保信息可信;4)阳性的非侵入性产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)结果,因 NIPT 本质为筛查技术,阳性结果需通过更精准的诊断性检测(如羊水穿刺等)进行正交验证,方可作为产前干预决策的依据^[5]。上述变异的筛选均应基于循证医学证据、临床经验或专业共识。

总而言之,正交验证的候选变异筛选作为正交验证流程的核心前置环节,需遵循“质量优先,临床导向”的逐级递进流程,既避免对无意义变异过度验证造成的资源浪费,也防止遗漏核心变异引发的诊疗风险,最终实现正交验证流程与临床实际需求的精准适配,为高通量测序临床报告的准确性与可靠性提供针对性保障(图2)。

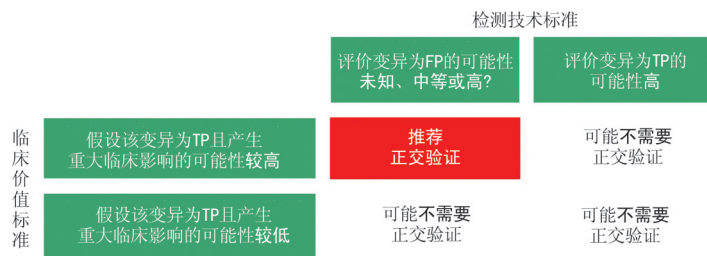


图2 临床价值标准与技术标准在正交验证决策中的关键作用

NGS检测结果的正交验证流程涵盖样本选择、变异筛选、正交技术选择、实验执行、结果比对、判断与记录,以及特殊情况处理和持续优化等关键环节。规划科学合理的流程及严格的质量控制,既能高效验证NGS检测结果的精准度,支撑实验室建立经验证的本地化阴性/阳性变异数据库,准确甄别变异属性;也能规范验证结果不一致时的处理策略(如排查肿瘤组织异质性或产前标本多点采样),同时为持续质量监控与本地数据库建设提供支撑(图3)。

为规范NGS临床报告中变异正交验证流程,本文整合国内外专业组织出版物、指南、专家共识及实验室实际工作经验^[6-12],结合国内临床实验室的实践情况,提出12条适用于国内临床实验室的最佳实践建议,详见补充表S1(手机扫描本文OSID二维码可见)。

建议1:制定并落地NGS变异正交验证标准化书面文件

NGS实验室需针对性地制定变异正交验证标准化书面文件,将其正式纳入实验室质量管理手册

或标准作业程序(standard operating procedure, SOP),经实验室主任签署确认后,实施规范化管理与定期更新,确保文件的权威性与时效性。

文件编制需综合覆盖检测内容、NGS平台特性、变异类型与分类、质量指标及临床影响等维度,由具备专业资质的分子生物学人员建立统一适用的正交验证标准,明确验证启动条件、范围及全程记录机制,在保障验证质量达标的基础上,兼顾结果精确性与流程效率^[13]。

建议2:由资深认证医学分子专家主导验证策略的制定与监督

实验室正交验证策略需由具备深厚NGS技术功底、丰富临床实践经验及正规资质认证的医学分子专家牵头制定,并全程监督落地。专家需以遗传学理论为核心支撑,通过持续参与专业培训、学术交流等方式,深化对行业规范、指南及共识的理解,动态跟踪领域前沿进展,为验证策略的科学性、清晰性及可操作性提供权威指导。

策略制定过程中,可邀请分子病理学家、实验

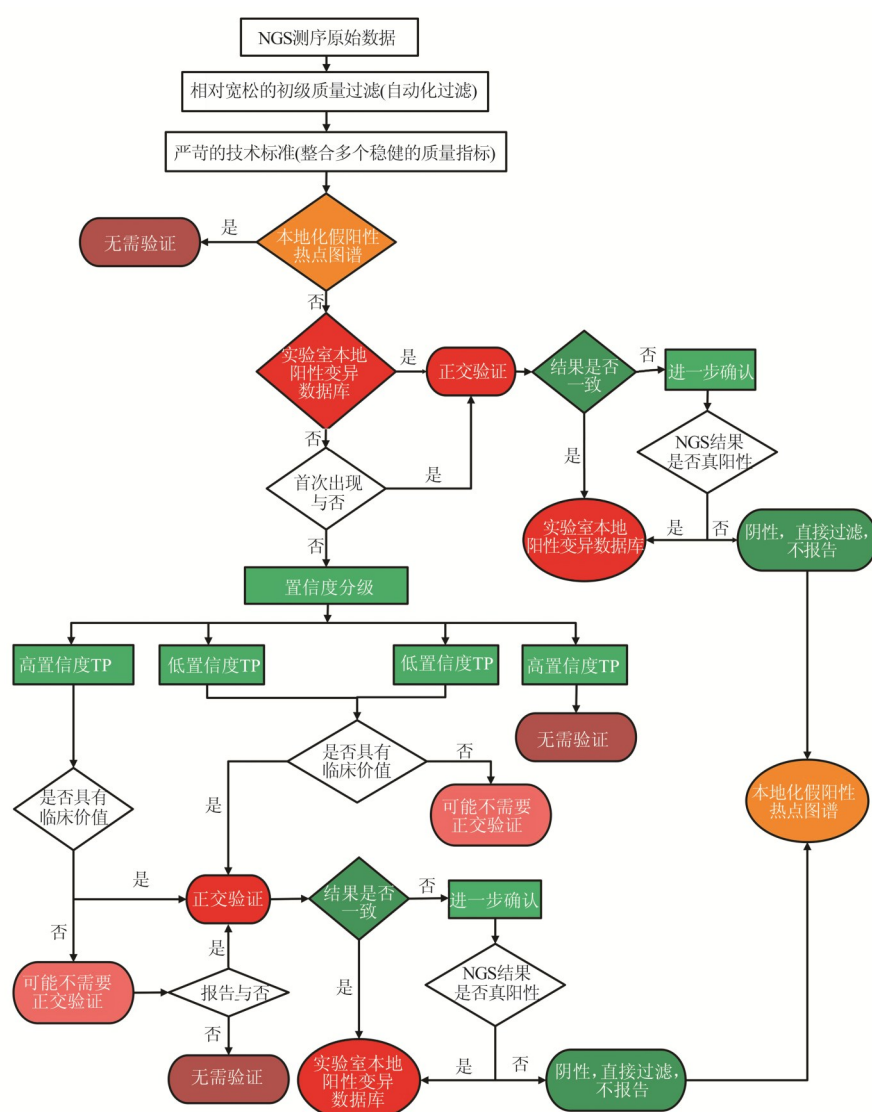


图3 NGS检测中正交验证流程

室遗传学家、技术人员、管理层及生物信息学专家等利益相关方参与讨论,但核心环节执行需依托兼具实验操作能力与信息学分析技能的专家团队,医学分子专家对策略的严谨性与临床适用性承担最终责任。

建议3:规范验证方法、平台及生物信息学工具的验证、维护与监管流程

实验室需将验证方法、技术平台及相关生物信息学工具纳入统一规范的监管框架,实施持续验证与维护,其重视程度需与其他检测关键环节保持一致。所有验证方法的分析验证需独立开展,或纳入NGS检测整体验证流程,严格遵循相关监管要求与认证指南。

针对NGS平台、软件、数据库及生物信息学流程的快速迭代特性,实验室可根据变更内容的影响

范围,针对性地为特定步骤或后续环节重新建立性能标准,如当仅生物信息学流程变更时,无需对湿实验环节进行重新验证,详见建议6,以维持验证体系的稳定性。

建议4:确保所选验证方法具备正交性

实验室需根据标本类型、变异类型及特征,遵循“误差特性无关联”原则,结合不同方法的灵敏度差异综合权衡,自主选择适配的正交技术,详见补充表S2(手机扫描本文OSID二维码可见)。对于需反复通过替代方法验证的变异(如同源区域内的重复扩增、复发性变异等),建议采用首选替代技术验证,以保障结果的准确性^[14]。若缺乏合适正交技术,可在不同CNAS认可实验室中,利用相似或不同NGS技术开展独立重复检测,但需避免采用相同核心测序技术或文库制备方法,且简单重复初级

NGS检测或将原始数据经不同生物信息学流程重新分析,均不满足正交技术要求。

当验证结果与NGS结果不一致时,需展开深入调查并妥善处理,不预设原始或验证结果必然无误,因为肿瘤标本或多点采样的产前诊断样本中,部分SNVs差异可能源于组织异质性和/或瘤内异质性,而非检测错误^[15]。目前指南多侧重阳性结果验证,易忽略阴性结果(野生型结果)验证,此做法可能引入偏倚,从而影响测试性能评估。实验室临床分子遗传学专家需审慎判断是否报告结果不一致的变异,若选择报告,需在报告中详尽阐述验证性检测结果并给出合理解释。

若因客观原因需外包变异验证工作,主实验室需负责外包方的选择与评估,审核外包方资质并明确监管链条,保留相关记录证明合规性。同时需明确双方责任归属,制定规程维护监管链完整性,保障流程顺畅与结果可靠,实验室主任或其指定人员需审查并批准外包实验室开展的所有与方法相关的验证工作。

建议5:对报告中报道的具有重大临床意义且符合技术标准的变异实施正交验证

实验室筛选需正交验证的变异时,需以“技术达标为前提,临床需求为核心”构建双重筛选框架。一方面,设定严格的NGS技术质量阈值,综合测序深度、变异质量值、比对准确性等多维度指标,识别高置信度变异^[16],从技术层面排除低质量、高假阳性风险的变异,确保仅对具备验证价值的变异启动流程。另一方面,锚定临床实际需求,优先验证可能影响患者诊疗决策(如肿瘤EGFR 19del、遗传病CFTR Δ F508等致病/可能致病性变异)、健康管理(如隐性遗传病携带者风险、肿瘤易感风险的次要发现)及预后判断的变异,同时剔除美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)评级为良性变异、可能良性变异或临床价值较低的意义未明变异(VUS),避免资源浪费。

需特别注意,无论基于技术标准判定“具备验证价值”,还是基于临床标准判定“需优先验证”,实验室均需在最终临床报告中清晰标注变异的验证状态(如“已正交验证”、“建议进一步验证”或“无需验证”),为临床医生解读结果、制定后续方案提供明确依据。

建议6:建立标准化生物信息学流程并完善数据存储管理体系

NGS生物信息学流程涉及工具繁多、操作环节

复杂,实验室需构建标准化生物信息学流程,并配套完善的数据存储管理体系,通过规范分析流程保障结果一致性,为临床决策提供可靠支撑^[17]。

开展临床样本检测前,需采用包含多种变异类型的已知序列样本或参考材料,对生物信息学流程进行性能验证,重点优化算法参数,确保流程在敏感度、特异性、阳性预测值等核心指标上达到临床诊断要求。流程标准确立后,需详细记录所有生物信息学流程组件,如比对软件、变异检测(Variant Calling)工具及操作步骤,实施授权管理与全程追踪。任何参数调整或流程变更(如软件版本更新),均需重新开展验证并完整记录,确保NGS数据的准确性与可重复性。

若使用网络软件工具或公共数据库,需实时跟踪资源更新情况(如数据库版本迭代、工具算法优化)并做好记录。条件允许时,对无在线存档或版本控制的工具进行本地化部署,便于实现版本固定、操作记录与结果追溯,保障分析结果的特异性、准确度及精密度^[18]。此外,须按照法律法规及实验室管理要求,制定数据灾难恢复计划,应对硬件故障、软件崩溃等突发情况,确保数据安全与可访问性^[19];建议共享正常人群变异数据,建立包含变异频率、致病性证据的本地化变异数据库,辅助变异解读工作^[20],同时设定合理的数据保存期限(如至少15年),满足临床追溯与合规管理需求。

建议7:遵循实验室认可规范及国际相关规范建立并执行全面质量管理计划

NGS实验室日常运作中易受不确定性因素、偏差及错误影响,需严格遵循实验室认可机构最新规范[如美国《临床实验室改进法案修正案》CLIA、美国病理学家协会CAP标准及国际通用规范(如ISO15189:2022)],制定并严格执行覆盖全流程的质量管理计划,核心需包含内部质量控制(internal quality control, IQC)、能力验证(proficiency testing, PT)和室间质量评价(external quality assessment, EQA)三大关键模块^[21]。

其中,IQC程序需确保每次检测至少设置1个阳性质控、1个阴性质控或空白对照,聚焦测试方法性能与临床应用适配性,同时需与变异验证环节明确区分,避免流程混淆。PT/EQA需通过实验室间结果比对,持续监测实验室在特定检测领域的表现,若缺乏正式PT计划,需采用样本交换等替代评估方式,且所有质控活动需与常规样本同步开展,贯穿样本接收、处理、检测至报告的全环节。

按 CLIA 要求,实验室需对每种临床检测项目每年开展 2 次 PT 或替代评估;若特定分析物没有 EQA 方案时,需通过样本拆分重复测试、实验室间比对等方式补充质控,建议积极参与符合资质的 PT/EQA 计划,保障检测质量稳定性。

建议 8:对所有拟报告变异严格执行细致目视检查

鉴于 NGS 技术生成的变异数据量大、遗传分析流程高度依赖专业判断,实验室需以 ACMG 指南为核心依据,制定详尽的数据解读 SOP,仅授权经系统培训与考核合格的专业人员负责数据解读与报告编制。

通过 NGS 技术指标初筛、结合临床价值复筛,锁定核心候选变异后,需进一步通过人工复审与数据库校验甄别真阳性。利用 IGV 可视化工具重点审查二级筛选后仍存疑的变异(如同源假基因区变异、低嵌合率变异),并结合家系遗传模式、人群数据库频率(如实验室本地化阴性/阳性变异数据库)及患者临床表型关联性展开综合验证,排除假阳性干扰。对首次检出的临床相关变异或已知假阳性热点变异(如 CAG 重复序列变异),为确认真实性,需参考经 CAP/ISO15189 认证的本地化变异数据库^[22-23],最终明确需正交验证的真阳性候选变异,避免过度验证浪费资源或遗漏关键变异引发诊疗风险。

建议 9:在书面材料中明确阐述正交验证策略、标准与方法

实验室需在正式书面材料(如 SOP、质量管理手册)中,详尽说明正交验证的具体策略、判定标准与操作方法,明确需纳入正交验证的变异类型、因技术限制(如无适配验证方法)排除的变异范围,以及验证结果与 NGS 结果不一致时的调查流程(如重复实验、换用其他验证技术)。需特别注意,阴性正交验证结果不可直接判定为 NGS 假阳性,需结合变异临床相关性综合评估,必要时开展第二次正交验证进一步确认^[24]。

书面材料需动态更新,及时反映策略修订内容(如技术升级导致验证标准调整),同时需完整说明验证技术清单、性能指标及参考依据,标注标准策略的例外情形(如紧急救治场景下的简化验证流程),并在测试干扰因素(如样本污染影响验证结果)发生变化时,及时向临床客户同步更新信息。

建议 10:临床测试报告中总结正交验证策略并标注例外情形

实验室出具所有 NGS 临床报告时,需以精炼概述或直接引用实验室正交验证标准的形式,全面总

结正交验证策略,清晰界定需经历验证流程的变异范围(如“致病性变异均经 Sanger 测序验证”);若未制定明确验证策略或未开展验证,需在报告中如实声明,避免临床误解。

若因技术限制(如变异位于复杂基因组区域无法设计验证引物)或资源不足未能完成验证,需在报告中明确标注“该变异未完成正交验证”,并提示后续验证建议(示例:“该变异未达到实验室 NGS 置信度阈值,建议送具备长读长测序技术的实验室进一步验证,本报告变异准确性参考范围为 $x\% \sim y\%$ ”);若判定变异无需验证(如 ACMG 良性变异和可能良性变异),需记录判定理由及支持数据(如人群数据库中频率 $>5\%$)。此外,若正交验证需求随技术进步或时间推移变化(如新增高灵敏度验证方法),需在报告中说明调整依据,保障结果透明度。

建议 11:充分考量特殊样本类型及结果解析复杂性

实验室制定正交验证策略时,需针对特殊样本特性与结果解析难点专项设计方案,重点覆盖样本身份确认、Indels 解析、嵌合体变异、线粒体变异、肿瘤样本检测、家族样本分析及单倍体分型/基因定相等场景,确保验证结果准确可靠。

在样本管理环节,需构建完善样本追踪体系,通过性别一致性鉴定、SNP 指纹图谱比对、监控低频变异异常升高情况等方式,排查样本污染或错配风险,保障样本与数据精准匹配。在变异解析环节,针对长片段 Indels、het-alt 变异、同源假基因区变异、复杂基因组结构变异、低等位基因频率嵌合体、线粒体异质性变异、肿瘤组织异质性变异等复杂情况,可采用长程 PCR 或长读长测序技术排除基因组结构或 NGS 技术局限影响,或通过多部位取材(如肿瘤原发灶与转移灶)和选用高灵敏度验证方法(如 ddPCR)提升正交验证准确性^[25-26]。

解读罕见常染色体隐性(autosomal recessive inheritance, AR)疾病变异时,需对先证者及家系成员同步检测,通过孟德尔遗传规律分析、统计推理或特定确认实验辅助单倍体分型/基因定相(明确变异顺式/反式关系);需特别注意的是,不可将多样本中观察到的相同变异直接作为 NGS 验证依据,三人家系-全外显子测序(Trio whole-exome sequencing, Trio-WES)或三人家系-全基因组测序(Trio whole genome sequencing, Trio-WGS)中发现的新发变异需排除收养、非生父、配子捐献等非生物学关系,避免误判^[27]。

建议 12:制定意外发现的处理规范与正交验证策略

WES 或 WGS 中可能会检出与患者本次检测指征无直接关联但具有潜在医疗价值的“次要发现(secondary findings, SFs)”,实验室需制定专项规范,明确 SFs 的筛选、验证与报告流程,确保临床价值最大化^[28]。

实验室可遵循 ACMG 指南框架,结合测试准确性、变异致病证据强度、疾病严重程度(如是否为致死性疾病)、临床可操作性(如是否有干预措施)、伦理风险(如隐私保护)及风险-获益比等,制定个性化验证策略,如确定 SFs 验证优先级(如优先验证致病性/可能致病性 SFs)^[29-30]。在检测前需通过知情同意书明确告知患者 SFs 的报告范围、验证方式及报告政策,并提供遗传咨询服务,保障患者自主选择权。

此外,需参考 ACMG 发布的 SFs“最低报告清单”,涵盖 48 种疾病的 81 个基因,详见补充表 S3(手机扫描本文 OSID 二维码可见),对清单内基因的致病性/可能致病性变异强制开展正交验证(如 BRCA1/2 变异需经 Sanger 测序确认),助力遗传性疾病风险早识别、早管理,降低发病风险。

NGS 技术虽显著提升遗传变异筛查效率、支撑精准医疗发展,但仍面临双重挑战。一是测序体系固有的技术复杂性(核酸打断偏好、PCR 扩增偏倚等)导致系统性误差;二是海量数据使生物信息学分析中的假阳性问题突出,尤其是检测大片段 Indels、CNVs 及复杂结构变异时,常规流程的灵敏度与特异性往往难以达到临床质控要求。

正交验证体系在此背景下展现独特价值,不仅能显著降低 NGS 假阳性率、保障报告可信度,更可通过比较不同测序平台、生信算法及建库方法的性能差异,构建多维度技术评估框架与“质量闭环”,动态优化 NGS 检测流程,为临床诊断路径优化提供依据。在精准医疗时代,基于正交验证的质量控制范式,已成为 NGS 技术临床转化的核心支撑。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] SEALOCK J M, IVANKOVIC F, LIAO C, et al. Tutorial: Guidelines for quality filtering of whole-exome and whole-genome sequencing data for population-scale association analyses[J]. *Nat Protoc*, 2025, 20(9): 2372-2382.
- [2] MOON Y, KIM Y H, KIM J K, et al. Evaluation of false positive and false negative errors in targeted next generation sequencing [PP/OL]. *bioRxiv* (2024-07-22) [2025-07-17]. <https://doi.org/10.1101/2024.07.22.603478>.
- [3] LINCOLN S E, TRUTY R, LIN C F, et al. A rigorous interlaboratory examination of the need to confirm next-generation sequencing-detected variants with an orthogonal method in clinical genetic testing[J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(2): 318-329.
- [4] MU W B, LU H M, CHEN J, et al. Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing[J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(6): 923-932.
- [5] PALUOJA P, TEDER H, ARDESHIRDAVANI A, et al. Systematic evaluation of NIPT aneuploidy detection software tools with clinically validated NIPT samples[J]. *PLoS Comput Biol*, 2021, 17(12): e1009684.
- [6] CROOKS K R, FARWELL HAGMAN K D, MANDELKER D, et al. Recommendations for next-generation sequencing germline variant confirmation: A joint report of the association for molecular pathology and national society of genetic counselors[J]. *J Mol Diagn*, 2023, 25(7): 411-427.
- [7] DEIGNAN J L, ASTBURY C, CUTTING G R, et al. CFTR variant testing: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)[J]. *Genet Med*, 2020, 22(8): 1288-1295.
- [8] REHDER C, BEAN L J H, BICK D, et al. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [J]. *Genet Med*, 2021, 23(8): 1399-1415.
- [9] BAUER P, KANDASWAMY K K, WEISS M E R, et al. Development of an evidence-based algorithm that optimizes sensitivity and specificity in ES-based diagnostics of a clinically heterogeneous patient population[J]. *Genet Med*, 2019, 21(1): 53-61.
- [10] HOLT J M, KELLY M, SUNDLOF B, et al. Reducing Sanger confirmation testing through false positive prediction algorithms[J]. *Genet Med*, 2021, 23(7): 1255-1262.
- [11] HUME S, NELSON T N, SPEEVAK M, et al. CC-MG practice guideline: Laboratory guidelines for next-generation sequencing[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(12): 792-800.
- [12] 中国医师协会医学遗传医师分会, 中国妇幼保健协会出生缺陷与分子遗传分会, 上海市医师协会临床遗传专业委员会, 等. 遗传病基因变异全外显子组测序技术规范应用专家共识[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2025, 42(1): 1-11.
Medical Genetics Branch of the Chinese Medical Doctor Association, Birth Defects and Molecular Genetics Branch of the China Maternal and Child Health Associa-

- tion, Clinical Genetics Committee of the Shanghai Medical Doctor Association, et al. Expert consensus on standardized application of whole exon sequencing technology for genetic diseases[J]. *Chin J Med Genet*, 2025, 42(1): 1-11.
- [13] AZIZ N, ZHAO Q, BRY L, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2015, 139(4): 481-493.
- [14] JENNINGS L J, ARCILA M E, CORLESS C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: A joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of American pathologists[J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(3): 341-365.
- [15] 朱鲲鹏, 袁梦馨, 王京伟, 等. 肿瘤基因测序技术在非小细胞肺癌临床分子诊断中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2024, 47(11): 1242-1247.
- ZHU K B, YUAN M X, WANG J W, et al. Application of tumor gene sequencing technology in clinical molecular diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Lab Med*, 2024, 47(11): 1242-1247.
- [16] ROY S, COLDREN C, KARUNAMURTHY A, et al. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: A joint recommendation of the association for molecular pathology and the college of American pathologists[J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(1): 4-27.
- [17] MCDEVITT T, DURKIE M, ARNOLD N, et al. EMQN best practice guidelines for genetic testing in hereditary breast and ovarian cancer[J]. *Eur J Hum Genet*, 2024, 32(5): 479-488.
- [18] YANG Z Y, YANG X, SUN Y, et al. Test development, optimization and validation of a WGS pipeline for genetic disorders[J]. *BMC Med Genomics*, 2023, 16(1): 74.
- [19] GARGIS A S, KALMAN L, LUBIN I M. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical microbiology and public health laboratories[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(12): 2857-2865.
- [20] 中国抗癌协会肿瘤基因诊断专业委员会, 中国抗癌协会整合肿瘤学分会. 肿瘤基因诊断二代测序生物信息学分析平台本地化建设中国专家共识(2024年版)[J]. *中国癌症防治杂志*, 2024, 16(6): 638-649.
- Tumor Gene Diagnosis Committee of the China Anti-Cancer Association, Integrative Oncology Branch of the China Anti-Cancer Association. Chinese expert consensus on the localization of bioinformatics analysis for tumor genetic diagnosis using next-generation sequencing(2024 edition)[J]. *Chin J Oncol Prev Treat*, 2024, 16(6): 638-649.
- [21] RACA G, ASTBURY C, BEHLMANN A, et al. Points to consider in the detection of germline structural variants using next-generation sequencing: A statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)[J]. *Genet Med*, 2023, 25(2): 100316.
- [22] MATTOCKS C J, MORRIS M A, MATTHIJS G, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests[J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(12): 1276-1288.
- [23] DE CARIO R, KURA A, SURACI S, et al. Sanger validation of high-throughput sequencing in genetic diagnosis: Still the best practice? [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 592588.
- [24] TRUTY R, ROJAHN S, OUYANG K R, et al. Patterns of mosaicism for sequence and copy-number variants discovered through clinical deep sequencing of disease-related genes in one million individuals[J]. *Am J Hum Genet*, 2023, 110(4): 551-564.
- [25] MANDELKER D, DONOGHUE M, TALUKDAR S, et al. Germline-focussed analysis of tumour-only sequencing: Recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(8): 1221-1231.
- [26] CUSHMAN-VOKOUN A, LAURING J, PFEIFER J, et al. Laboratory and clinical implications of incidental and secondary germline findings during tumor testing [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2022, 146(1): 70-77.
- [27] 中华医学会医学遗传学分会细胞与基因组学组, 全基因组测序应用于产前诊断的专家讨论组, 王燕菲, 等. 高深度全基因组测序应用于胎儿结构异常的测试开发和初步实施的专家共识[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2024, 41(6): 677-684.
- Cell and Genomics Group of the Medical Genetics Society of the Chinese Medical Association, Expert Discussion Group on Whole-Genome Sequencing in Prenatal Diagnosis, WANG Y F, et al. Expert consensus on the application of high-depth genome-wide sequencing to the test, development and preliminary implementation of fetal structural abnormalities[J]. *Chin J Med Genet*, 2024, 41(6): 677-684.
- [28] MAJEED S, JOHNSTON C, SAEEDI S, et al. International policies guiding the selection, analysis, and clinical management of secondary findings from genomic sequencing: A systematic review[J]. *Am J Hum Genet*, 2024, 111(10): 2079-2093.
- [29] MILLER D T, LEE K, ABUL-HUSN N S, et al. ACMG SF v3.2 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics(ACMG)[J]. *Genet Med*, 2023, 25(8): 100866.
- [30] COHEN J L, DUYZEND M, ADELSON S M, et al. Advancing precision care in pregnancy through a treatable fetal findings list[J]. *Am J Hum Genet*, 2025, 112(6): 1251-1269.

(2025-07-17 收稿)

编辑 周煜