

精準醫療檢測實驗室檢測技術指引

-次世代定序應用於遺傳性疾病檢測（草案）

一、 前言

次世代定序技術因具有可同時偵測數百萬個鹼基，利用序列比對檢測出已知及未知變異的特點，成為基因檢測新利器。次世代定序檢測由以下步驟組成：(a)檢體採集、處理、儲存、(b)DNA/RNA 萃取、(c)基因庫製備、(d)定序片段產出與鹼基偵測、(e)序列比對/基因定位、(f)變異偵測、(g)變異註解與過濾、(h)變異點的功能評估與判定、(i)報告產出。影響次世代定序品質之因素包括過程中使用之試劑、耗材、儀器、軟體、基因資料庫等，這些因素因檢測目的及實驗設計而有不同選擇，並影響效能的評估方式，故實驗室需要確立良好的標準作業流程、針對影響其檢測結果的因素設立允收基準、並選用相對應的變異評估軟體，完整執行檢測確效，而非只著重於變異的臨床解釋。

二、 名詞定義

- (一) 實驗室開發檢測(Laboratory-developed test, LDT)：實驗室自行研發的檢測方法。
- (二) 遺傳疾病(Inherited disease)：基因變異發生於生殖細胞（如：卵細胞、精細胞）的疾病，此生殖細胞突變(germline mutation)可傳遞給後代。
- (三) 基因變異(Genetic variants)：可發生於生殖細胞或體細胞，可為活化態(activating)或不活化態(in-activating)。突變類型有單核苷酸變異(single nucleotide variant, SNV)、重複(duplication)、插入/缺失(insertion/deletion, indel)、基因融合 (fusion gene)、拷貝數變異(copy number variant, CNV)。染色體變異則有易位(translocation)、缺失(deletion)、重複(duplication)、倒位(inversion)。
- (四) 確效(Validation)：確認實驗室自行研發的檢測方法(LDT)之有效性，或是使用者為了檢測目的而自行修改，並通過認證的檢測方法，可以達到預期檢測目的。

三、 適用範圍

本指引適用於次世代定序應用於臨床懷疑有發育遲緩、先天生理功能或身體畸形等遺傳疾病，欲檢測生殖細胞遺傳性或新生性的基因突變時，所使用之全外顯子定序以及目標基因定序技術。

考量檢測的效能及風險不同，本指引不適用於以下服務範圍，如：(a)健康成人的疾病風險預測定序檢測、(b)腫瘤基因檢測、(c)伴隨式診斷與輔助式診斷、(d)游離(cell-free) DNA 檢測、(e)RNA 定序、(f)胎兒檢測、(g)植入前胚胎檢測、(h)微生物感染的診斷、(i)微生物抗藥性與毒力標記的基因體檢測及(j)其他。

四、 檢測設計考量

(一) 檢測適用考量

應定義其特定適用範圍，包括明確的適應症、檢測對象(舉例可為：發展遲緩或心智障礙兒童、具有明確病徵但尚未確診的病人、進行鑑別診斷的病人等)、檢測的族群分布(需要了解受檢人口分布比例、特定疾病的流行率等)。還需明定檢測適用之目的，如：可協助疾病的診斷、治療或預後。

(二) 特殊需求考量

實驗室應了解未來之檢體量及臨床端對時效之要求，可幫助實驗室決定是否導入檢體混合之流程及決定應使用何種通量之次世代定序平台。

(三) 檢測套組內容考量

檢測套組內的基因選擇需要有臨床實證，若是臨床相關的已知基因，檢測中卻未納入者，應詳述原因。基因區段之選擇可為全基因體、全外顯子，以及目標基因(又區分為是否含內含子、啟動子等非蛋白轉譯區)。如欲檢測新生兒可能帶有的遺傳疾病，可選用全外顯子定序而非目標基因定序，但檢測結果可根據懷疑之疾病選擇與此臨床表徵相關基因執行判讀。如：病人懷疑有心臟疾病就只報告與心臟相關的基因檢測結果。不同基因區段的選擇將影響檢測預期效能以及確效計畫的設計。

五、 檢體類別

應清楚列出檢測可接受之檢體類別(如：血液、口腔拭子等)，而檢體類別會影響其檢測設計，如：檢體採集適合的容器、所需檢體之最低量、檢體穩定性等。單一檢測可包含多種檢體類別，但須確定每種檢體類別可以產出高品質且足量之 DNA 來進行檢測。

六、 影響檢測因素及檢測各步驟執行建議

(一) 影響檢測因素

實驗室應了解次世代定序流程中所有可能影響最後結果之因素，如：不同定序平台有不同之原理及限制，應對應不同適用範圍與通量需求（如：定序平台輸出量）及技術要求（如：定序覆蓋率），並訂定不同的效能（如：準確度）。不同變異類型（如：拷貝數）應考量適當之生物資訊分析流程及其變異偵測的檢測極限，並應使用第三方生物資訊分析工具確效生物資訊分析流程。

(二) 檢測各步驟執行建議

應記錄次世代定序使用的儀器、耗材、試劑與各步驟的詳細方法（如：DNA 如何萃取、檢體如何混合），與設計及分析條件（如：單向定序、雙向短片定序、雙向長片段定序），此條件會因為檢測目的與預期效能而不同。

以下建議項目可供執行(以下僅為列舉，實驗室應記錄所有檢測步驟與相應的檢測條件以及理由)：

1. 檢體處理

- (1) 制定檢體處理、保存、退件標準。
- (2) 記錄 DNA 的濃度、純度、完整度之測量方法及最低標準。如：260/280 nm 吸光值比值需介於 1.8-2.0 之間、260/230 nm 吸光值比值需 ≥ 2.0 、DNA 完整度 ≥ 7 等。
- (3) 記錄是否可以接受由外部直接提供 DNA，以及其對應允收基準。

2. 檢體混合

- (1) 記錄在不影響品管數值或定序覆蓋率情況下，可以混合的檢體數量。
- (2) 記錄分子條碼的組成、使用方法，以及避免條碼相互抵觸、誤判、錯選的方法。

- (3) 當檢體混合時，需標準化每個檢體加入的量。
3. 基因庫製備與目標區段放大
 - (1) 記錄基因庫製備與目標區段放大的方法(如：擴增法、捕捉法)。
 - (2) 記錄效能評估指標(如：定序後可以對應於目標序列的比例、定序覆蓋均一度、基因庫定序覆蓋複雜度等)及允收基準。
4. 品管物質與參考物質

品管物質與參考物質可以使用與疾病相關的基因變異序列為品管物質，或帶有一般常見致病性變異的陽性參考物質。使用時機包括但不限於：每個檢體的內部品管、每個批次的品管，或其他品管，以維持檢測品質並使檢測具有可信度。
5. 生物資訊分析流程
 - (1) 列出數據處理流程、數據分析方式。
 - (2) 列出變異偵測、過濾、註解的詳細流程。
 - (3) 列出使用的軟體及資料庫之版本及來源，以維持可追溯性(如：自行研發、第三方提供等)。
 - (4) 記錄如何依照參考序列做檢測序列的組裝。
 - (5) 記錄分析流程中，串聯、組裝、執行生物分析流程的所需元件。
 - (6) 記錄軟體的操作方式。如：現場操作或遠端(雲端)遙控。
6. 後續檢測流程
 - (1) 記錄檢測失敗原因(如：未達品質指標)。
 - (2) 記錄檢測失敗的後續處理流程(如：重新操作、將品管未通過的基因區段重新檢測、使用桑格定序法做後續確認等)。

七、效能及確效內容建議

將檢測做為臨床應用之前，實驗室應完整確效整個檢測流程(應從檢體處理到變異偵測)、最佳化所有檢測步驟，並確認檢測結果與預期的設計相同。確認所有檢測方法已完整確效與記錄後，才可以提供臨床服務，並在開始提供臨床服務之後，應持續監測效能。

以下建議供確效執行時考量：

(一) 效能規劃建議：

1. 建議使用與未來實際檢測族群相同之檢體(如：全血)進行確效。
2. 建議訂出基本應確效內容(如：準確度、精密度、檢測極限)，並使用適當的分析確效方法。

3. 效能評估建議包括 DNA 製備、檢體以及試劑的取得、處理、儲存條件。
4. 在維持可辨識不同檢體的條件下，建議確效最低、最高可混合之檢體數量。如使用條碼化技術，建議評估並記錄條碼化對效能的影響。不論使用哪一個條碼，在最高混合數量下，建議要確定每一批次的病人-條碼組合可以提供準確且可重複的檢測結果。
5. 若目標基因中某部分為高度同源基因、高度多型性基因、困難檢測基因，則建議需要特別執行確效。
6. 建議評估不同基因型的效能（如：野生型、同型合子、異型合子、複合異型合子）。除此之外，若檢體或 DNA 樣品為混合型基因（如：鑲嵌型），建議評估等位基因頻率的範圍。此項效能可以藉由混合兩種臨床檢體或細胞株，並涵蓋多種基因比例範圍而達成。
7. 建議明述並記錄未達品管要求的基因區段比例，如：定序深度不足的區段。
8. 建議根據檢測適用範圍與檢測需求來記錄，並訂定對應的效能指標閾值。
9. 建議明確列出後續檢測流程（如：家族性檢測、確認試驗等），以提升效能。
10. 建議記錄可能的效能限制。
11. 建議決定確效的檢體數量以及種類。數量需要具有可信賴的統計意義，以符合預期必須達到的效能。
12. 多項類似的次世代定序檢測如使用相同定序平台，則建議可以使用相同的確效計畫結果。例如，相同的前分析步驟、基因庫製備方法、定序方法。
13. 記錄確效結果時，建議以平均值與 95% 雙尾信賴區間表示，並以表格呈現。建議依照不同檢體類別、不同變異類型加以區分。例如：變異類型若為插入/缺失變異則可以使用大小分佈來呈現。

檢測的效能需求舉例如下：若檢體量低、檢體無法（從病人）再次取得，或檢測結果無法使用其他方法確認，則應提高檢測結果的準確度閾值，並應記錄未檢測的範圍。同樣地，若某段欲檢測基因難以定序，並且無法達到預設效能閾值，則此結果應列入檢測極限中，並在確效計畫中將對應確認方法納入，或是提高定序此段基因的定序覆蓋率。

(二) 確效內容執行建議

分析確效是透過測量一系列已定義的效能指標，來確認是否能夠成功檢測出一項基因變異。臨床確效則可利用公開基因資料庫(如: ClinGen)的臨床數據以確效其臨床性能。以下為建議應執行的確效內容：

1. 準確度

準確度為測量值與真值之間的一致程度。在次世代定序中的準確度為：基因序列結果與其他已確效方法檢測結果的一致程度，或是與經過定序具有高度可信度的參考序列之間的一致程度。

藉由計算陽性一致率(positive percent agreement, PPA)、陰性一致率(negative percent agreement, NPA)、分析陽性預測(technical positive predictive value, TPPV)值來表示檢測的準確度，並設定 PPA、NPA 及 TPPV 之 95% 信賴區間，確保檢測結果達到預期效能。閾值由多種變因決定，依照檢測目的、檢測變異類型，以及檢測是否使用確認試驗而不同。應根據明確證據以及已確效統計方法來決定閾值，並應列入報告中。

當無法獲得臨床檢體、細胞株或生物合成樣品時，帶有已知多種變異序列(如：單核苷酸變異、插入/缺失變異、重複變異、重複擴增、套數變異、結構變異)的電腦模擬樣品亦可以使用，是除了生物性樣品外另一種可以評估生物資訊分析流程效能的樣品。

但此類電腦模擬序列應使用與產出其序列相同的(前)分析方法。產生此類序列可以有多种合成方法，因此應明確敘述其生產方式、給予明確理由，並記錄之。

更多軟體確效資訊可以參考軟體確效相關指引。

(1) 陽性一致率(PPA)

陽性一致率= $\frac{\text{真陽性}}{\text{真陽性} + \text{偽陰性}}$ 。計算並記錄每種變異類型的最低允收陽性一致率。陽性一致率為檢測是否能正確偵測到變異基因的能力，並反應偽陰性的頻率。「陽性」為：欲檢測序列出現與參考序列(如：目前已建立的人類基因體序列)不同的基因位點。

(2) 陰性一致率(NPA)

陰性一致率= $\frac{\text{真陰性}}{\text{真陰性} + \text{偽陽性}}$ 。陰性一致率為次世代定序在分析物不存在的情況下(如：無基因變異)，所正確定序的比例，並反應偽陽性的頻率。在基因變異檢

測中為正確偵測到野生型的能力（欲檢測檢體並不存在變異，也未偵測出變異的機率）。

(3) 分析陽性預測值(TPPV)

分析陽性預測值=[真陽性/(真陽性+偽陽性)]。分析陽性預測值為：一項變異的偵測是真陽性的可能性(likelihood)，並反應每次檢測的偽陽性數目。若未執行確認試驗，則此數值非常重要。

(4) 準確度計算

使用明確已知變異的參考物質，計算可偵測範圍內各種變異的準確度。臨床相關變異的準確度計算，應使用符合預期檢測目的之檢體進行。

可以藉由下列表格計算：

		確認試驗		總計
		陽性	陰性	
檢測	陽性	A	B	A+B
	陰性	C	D	C+D
	無偵測(no calls)或無效偵測(invalid calls)	E	F	E+F
	總計	A+C+E	B+D+F	N

根據上表，N為準確度研究中的樣品總數（ $N = A + B + C + D + E + F$ ）。無偵測或無效偵測視為鹼基偵測失敗。失敗可能因素如：未達預期效能，導致數據不足，因此無

法偵測基因變異。此外，有些檢測平台也可能產生模稜兩可的結果，意指：雖然鹼基無遺漏或錯誤，且品管有效，但結果既非陽性也非陰性，如：未提供明確資訊關於此變異存在與否。需要注意，無偵測或無效偵測與模稜兩可的結果並不同。

準確度的確效中，在 95% 雙側信賴區間內，無偵測或無效偵測的百分比應為 $(E + F) / N$ 。陽性結果的無偵測或無效偵測百分比應為 $E / (A + C + E)$ ，陰性結果的無偵測或無效偵測百分比為 $F / (B + D + F)$ 。

計算準確度中的陽性一致率、陰性一致率、分析陽性預測值時，應排除無偵測或無效偵測的結果，並另外記錄無偵測或無效偵測結果。無偵測或無效偵測結果的最低可接受數量取決於檢測目的與檢測方法。如：報告時效較短，無偵測或無效偵測結果比率需要較低。

刪除無偵測或無效偵測結果的數據才可以用於準確度確效的計算，如下表所示：

		確認試驗		總計
		陽性	陰性	
檢測	陽性	A	B	A+B
	陰性	C	D	C+D
	總計	A+C	B+D	A+B+C+D

- a. 陽性一致率 = $A / (A + C)$ 。A 為檢測出的已知變異數量（真陽性的檢測結果），A+C 為受檢測的已知變異數量（真陽性加偽陰性的檢測結果）。陽性一致率可以推算出此檢測的偽陰性率（偽陰性率 = $1 - \text{陽性一致率}$ ）。需要計算每種變異類型、每種臨床樣品、每種臨床變異的陽性一致率。

- b. 陰性一致率= $D/(D+B)$ ，D 為真陰性結果的數量，B+D 為受檢測變異中的野生型數量（真陰性加偽陽性的檢測結果）。陰性一致率可以推算出此檢測的偽陽性率（偽陽性率=1-陰性一致率）。應計算每種變異類型、每種臨床樣品、每種臨床變異的陰性一致率。通常可以計算為此檢測在野生型結果中正確辨識為野生型的比率，或一段已知序列區間內，檢出偽陽性變異的比例。
- c. 分析陽性預測值= $A/(A+B)$ ，A 為真陽性的數量，A+B 為檢測中所有陽性結果的數量。需要計算目標基因區段的陽性預測值，並應將不同變異類型、不同檢體類型，以及不同臨床變異分別計算。

2. 精密度（重複性、再現性）

評估檢測精密度時，可就以下因素進行確效，如：多種樣品、多個批次、多個批號試劑、多個操作日期、多位操作者、多種操作條件、多種變異類型、多種儀器、多種檢測地點、單一反應列(lane)重複操作、多個反應列等。

次世代定序的重複性確效可以使用相同的檢體（包含臨界值附近的檢體），在不同特定檢測條件下（例如：不同操作者、不同操作條件、不同測量日期、不同儀器等）進行檢測，用以測量檢測的變異性，並說明檢測變異性的主要來源。

重複性確效為：在短時間內由相同操作者、相同量測系統、相同操作條件、相同地點下，重複測量相同或相似的物體，用以測量檢測結果的變異性。

此類確效不需要黃金標準序列，而是應計算每個檢體重複檢測的相同檢測結果百分比。重複檢測無偵測與無效偵測結果的百分比也應報告。

應預先設定重複性與再現性的閾值，並依照每種檢測條件、受測基因、變異類型分別報告，閾值由多種變因決定，依照檢測目的、檢測變異類型而不同。應根據明確證據以及已確效統計方法來決定閾值。

呈現精密度確效結果時，明述品管失敗的比率（如：未達定序深度或定序覆蓋率一致性等），並列出所有無偵測或無效偵測的結果。

(1) 檢測極限

在不同的臨床檢測條件以及特定的檢體類型下評估次世代定序的檢測極限。

- a. 記錄並訂定 DNA 的最低以及最高檢測極限（如：可接受的 DNA 投入範圍），意即 95% 的檢測結果皆在可接受的無偵測或無效偵測範圍下（即未喪失檢測準確度），仍可以檢測出預期結果的 DNA 濃度。
- b. 因為不同變異類型可能有不同檢測極限，所以應計算每種變異類型以及不同序列範圍內的檢測極限。而最高檢測極限亦同。
- c. 若檢體為混合狀態（如：鑲嵌型），需要訂定不同等位基因比例的最低檢測極限，並藉由序列稀釋法、臨床檢體/細胞株混合法決定之。

(2) 分析專一性

分析專一性為檢測是否可以單獨測量出待測分析物的能力。依照檢測目的或實驗設計進行檢測時，其中所帶有的內源性或外源性干擾物質可能造成待測分析物的檢測結果失敗，並產生偽陰性結果。交叉反應（如：同源基因、假基因，與其他交叉反應物質）可能影響待測分析物之錯誤偵測，並產生偽陽性結果。病人檢體的交叉污染會使不正確的基因序列加入檢測中，造成偽陽性或偽陰性結果。

a. 干擾物質

找出並記錄任何可能對檢測產生干擾的物質（包括帶有基質效應者），因為干擾物質可能會降低序列擴增或定序的能力。可以選擇與檢體種類、DNA 萃取方式相關的物質進行干擾試驗。

b. 交叉反應

根據待測基因區段，在已知會產生交叉反應的等位基因與同型基因區段中（如：假基因），評估並記錄可能的交叉反應。

c. 交叉污染

發展、確效並記錄可以偵測病人檢體之間的殘留物或交叉污染的方法。如全外顯子定序，任何兩個檢

體之間都有可能發現欲檢測的基因區段，因此需要藉由檢體間的已知差異來評估交叉污染的可能。

八、 檢測品質監控

檢測的品質攸關是否應允收該次變異偵測結果，或決定是否應執行附加檢測。尤其是具有充足證據可以證明致病性的變異，更應闡明其檢測品質。檢測出的基因變異如未達預期品質指標則不應寫入結果報告中，並記錄未達品質指標之基因區段。

各步驟品質閾值的決定應有明確的文獻或證據，或用已確效之統計方法來決定，並應在確效時一同評估。若確效結果指出某閾值不適合此檢測，或未達預期效能，則應重新調整實驗條件或重新設計實驗，並重新確效。

以下列出建立品質指標與效能閾值時可能的影響因素。

(一) 檢體品質：建立並記錄檢體允收以及退件標準。

(二) DNA 品質

1. 記錄 DNA 的濃度、純度、完整度之測量方法以及最低標準。如：260/280 nm 吸光值比值需介於 1.8-2.0 之間、260/230 nm 吸光值比值需 ≥ 2.0 、DNA 完整度 ≥ 7 等。
2. 建立並記錄 DNA 品質與濃度的評估方法（如：螢光法）。
3. 若適用，建立並記錄 DNA 長度的允收基準、DNA 片段化後的長度範圍、基因庫的產量、目標基因放大的方法。以上所用的方法與閾值皆可能影響 DNA 萃取方法的選擇。

(三) 定序覆蓋率(定序深度與完整性)

1. 建立、決定並記錄檢測的平均值以及最低定序覆蓋深度、定序覆蓋統一度、目標基因區段內大於最低定序覆蓋深度的鹼基數百分比等，並設定效能的閾值。如：生殖細胞突變的平均定序覆蓋深度需要 $>100X$ 。
2. 平均覆蓋深度的降低會提高最低定序覆蓋深度不足的百分比。若重要基因區段未達到最低定序覆蓋深度閾值時，則需重新執行。
3. 檢測同型、異型合子的生殖細胞等位基因頻率時，應達預期閾值。若檢測出的頻率超出預期值（如：生殖鑲嵌型），實驗室應確認偵測此類變異的等位基因頻率時，所需要達到的最低定序覆蓋深度及可能需要後續的檢測流程，以判別此類變異。

(四) 序列產出以及鹼基偵測

1. 建立、記錄並決定定序片段的偵測鹼基品質分數的閾值（如：Q 值 >20）。若不使用鹼基品質分數，則需要記錄使用的品質管理方法以及其適用原因。
2. 若適用，建立並記錄修剪鹼基的百分比閾值。
3. 記錄基因庫叢的密度以及通過品質條件篩選的比例。
4. 記錄定序片段的數量、(移除重複定序片段後的)單一定序片段數量百分比、重複定序片段數量百分比（此數值反應出具有相同起始點的定序片段數量，並且是基因庫定序覆蓋複雜度的指標）。

(五) 基因定位(mapping)及組裝參數

需建立並記錄基因定位的品質指標與閾值，相關指標舉例如下：

1. 定位到參考基因體的定序片段百分比。
2. 定位到目標基因區段的定序片段百分比。
3. 定位品質分數。
4. 未定位到目標基因的定序片段百分比、未對應到任何人類基因序列的定序片段百分比。
5. 非專一性基因定位，如：大片段插入/缺失基因造成的定序片段比對錯誤，或是序列同源性造成的非專一性基因定位，以及使用跨人種的參考序列造成基因定位錯誤。

確效過程中，若重要鹼基/基因點的定位品質未達閾值，則應重新評估檢測的設計、確效的指標。若僅有少數鹼基/基因點的定位品質較差，可以選擇其他替代方法，如：使用另一種檢測此基因區段的方法，或是在報告中註明此基因區段（並修改檢測的使用範圍以及限制）。

(六) 變異偵測參數

指標的選用會依照變異偵測所使用的生物資訊分析流程而不同。應建立、決定並記錄報告的閾值，變異偵測的指標包括：

1. 單一變異的品質指標（變異等級的指標），如：變異偵測的品質分數（Q 值）。
2. 整體變異的指標，如：等位基因定序片段百分比。包含不同變異類型的百分比（如：異型合子偵測、插入/缺失變異、無義變異），以及鹼基被轉換/置換的位置與比例。如：鹼基轉換/置換比率在全基因體為 2.0-2.1、在轉錄區為 3.0-3.3。
3. 變異的等位頻率（如：預期偵測頻率的閾值、定義為同型或異型合子變異的定序片段偵測最低百分比）。實際舉例可為：同型合子頻率

需要>90%、異型合子需要介於 30-70%。

4. 新變異的百分比、新變異與參考變異/序列的一致比率。
5. 基因股差異(strand bias)的百分比。

(七) 變異註解(annotation)及篩選

根據檢測目的選擇適合的篩選邏輯運算法並建立篩選閾值，記錄其數值、使用方式與時機、篩選標準、使用目的。例如：是否排除低頻率基因、難定序基因、難偵測或分析基因，篩選掉特定種類變異等。使用資料庫協助基因註解與篩選時（例如：選擇變異位點頻率之閾值時，可以使用大量族群資料庫 Exome Aggregation Consortium (ExAC) 資料庫、1000 Genomes 資料庫等），需要確認欲檢測之族群已包含在上述之資料庫中，並記錄使用的資料庫版本。當外部資料來源有變更時，需要能夠辨識並加入此變異到分析流程中。

從外顯子或基因體定序結果中辨識並篩選出候選變異點之優先順序，需要根據族群出現頻率、此變異對基因功能以及表現型的影響力、概率方法（在別的病徵或情境下，有檢測到相同的變異）、家族共有基因片段（如：家族關聯研究中，已被發現具有相同表徵的家族所共有之變異）。

九、 基因資料庫使用與管理建議

為使基因變異資料庫能夠成為有效的科學證據，並支持檢測的臨床可信度，建議資料庫的變異點功能判定需要符合以下條件：(1)確保資訊來源正確且具有品質、(2)數據來源以及數據演算方式透明化、(3)資料的收集、儲存以及報告方式需要保護病人與研究對象的隱私與資訊安全、(4)需要使用已確效之方法來收錄基因變異資訊。常見資料庫列表詳見第 14 章。

以下小節討論基因變異資料庫的使用建議，以及數據的收集、整理、評估方式。基因變異資料庫各不相同，但都需要確效，以維持其數據品質、臨床相關性、數據安全性、病人隱私以及資訊透明度。國外數個專業學會已經或正在制定遺傳變異資料庫的分析與評估指引。這些指引可能因類別不同而有其適用範圍，實驗室應依照需求自行選用。

(一) 建立或管理資料庫注意事項

1. 資料庫透明度與公開化：建議資料庫建立者公開資料庫的數據來源與標準作業流程，以便公眾了解，使病人與醫療機構做出明智的醫療決策。
2. 標準作業流程的版本控管：標準作業流程應定義基因變異資訊如何收集、分析、評估、文件化以及版本化。應明確記錄標準作業流程的更改內容、提供更改的詳細資訊，並附上必要的解釋，以確保所

有利益相關者了解程序變更所產生的限制或影響。資料庫之標準作業流程應每年審查一次，並於檢測報告中列出所用資料庫之版本。

3. 數據保存：建議需要有評估資料庫整體穩定性與維持連線正常的方法。當基因變異資料庫會連結至第二資料庫時，應有辨識第二資料庫變更內容以及資料庫版本控管的方法。建議基因變異資料庫管理員應定期備份及在必要時可以復原。基因變異資料庫管理員應制定計畫以確保基因變異資料庫永久或暫時停止運作時（如：資料庫無經費維護、基礎設施升級），仍保留資料庫的內容以及資料處理過程。如果基因變異資料庫停止運作，應確定數據保有儲存位置，並帶有相關的版本資訊、標準作業流程以及紀錄。
4. 資訊安全以及病人隱私：基因變異資料庫的使用必須符合相關法規，並將使用紀錄透明化。應採取適當的安全措施，並訓練資料庫的使用人員，以保護資料庫中個人資料與健康資訊的隱私性。
5. 數據格式與命名：為規範基因變異資料庫的使用，並確保變異點的功能評估與判定維持其準確性與品質，基因變異資料庫管理員應使用普遍可接受的數據格式，以及基因體學界廣泛接受的基因名稱、符號、基因組位置、基因變異、臨床特徵、功能性，以及一致的分類命名法。另應說明使用何種命名法，以利外部使用者準確理解所提供的資訊。將數據格式命名標準化將有助於減少基因變異的模糊性，並且更容易比較出不同變異資料庫之間的差異。

(二) 資料庫數據品質

基因變異資料庫中的基因型、表現型或臨床資訊，需要具有品質並以目前科學知識為依據，才能合理保證變異點的功能評估與判定可以將特定的基因變異與疾病相連結。

1. 詮釋用資料：

經搜尋整理後的基因變異資料應附有適合其變異類型的詮釋用資料。詮釋用資料應包括檢出此變異時使用平台的效能、闡明此變異的實驗室或研究計畫的數目、闡明此變異的實驗室名稱、偵測到此變異所使用的檢測技術以及細節（如：參考序列版本、參考序列建構方式、儀器、軟體、生物資訊分析工具等）。

生殖細胞變異的詮釋用資料還應包括變異特徵，如：病人種族、同型/異型、是否同股、病人家族分析。

若為多種基因變異決定其疾病發生風險者，資料庫管理員應將

所有多變異或多基因的風險計算方法納入詮釋用資料當中。此外，資料庫管理員應儘可能描述環境暴露可能會對基因變異造成的影響。基因變異資料庫應清楚透明地記錄所使用的判定證據來源（如：文獻、記錄完善的案例史），且資料庫管理員在收集與報告此類詮釋用資料時，應考慮安全與隱私要求。

2. 數據特异性：基因變異資料庫的操作應確保單一數據（如：來自特定表現型的單一個體變異）資料庫中不會多次出現。

(三) 基因變異評估及功能判定

變異點的功能評估與判定應包括變異的描述（如：臨床上顯著的、致病的、良性的、可能致病的、可能良性的、未知意義的變異等），並充分描述每一層的含義。資料庫建立者需要提供變異評估的標準作業流程，包括參考的臨床指引、已分析的資料、已確效的評估計畫、基因變異資料庫的評估規則、將來評估規則的可能改變，以上都應解釋其原因並公開。此外，如有將其他來源的變異判定整合到基因變異資料庫中，資料庫管理員應定期識別與審核此類外部來源的評估過程與數據品質。

本項評估應由至少兩名經實驗室訓練合格並授權的專業人員執行，以減少任何變異點的評估與判定結果錯誤的風險，如無法由兩名專業人員來執行評估，則應有其他方法（如：進行多次審查）來減少不正確的變異判定造成的風險。此外，應有標準作業流程來解決內部的評估差異。公開以上內容的標準作業流程，將有助於外部使用者審查變異評估中所使用的證據。

在變異評估過程中，使用公開且已確效的變異評估計畫，可以確保變異資料庫產出的判定可以成為有效的科學證據，並且支持檢測的可信度。變異評估流程的審查範圍包含檢測預期的用途與應用範圍、目標基因或疾病的特殊處（如：人口發病率、變異發生率、與種族或單倍體基因型相關的變異）。同樣地，這些因素應納入最終計畫中。

基因變異資料庫應有適當機制得到相關的回饋（如：可以讓使用者報告新的、相互矛盾的資訊），並在必要時記錄、評估、解決其資訊差異。

變異點的功能評估與判定證據應真實且非誤導，需用清晰易懂的語言撰寫。基因變異資料庫不應包括任何有關臨床治療或診斷的建議。

(四) 專業訓練及利益衝突

1. 專業訓練：資料庫的策劃與變異的評估也需要多種專業人員（如：博士級學者、醫師、醫檢師、遺傳諮詢專業人員等）。在評估基因變

異時，具有充足的培訓與專業知識非常重要。負責變異評估的人員應接受充分的訓練，並應有適當方法來確保已受訓者維持其評估品質。

2. 利益衝突：特別是資金上的利益衝突，可能會造成變異判定的偏差，並降低品質。若未緩解衝突，變異判定的可信度也會降低。應致力於減少利益衝突並使任何潛在的利益衝突透明化。

十、 檢測報告格式

(一) 檢測報告需要包含之資訊

1. 在報告第一頁的明顯處列出帶有致病性或有相對處置對策的基因變異結果。若可行，建議需要描述此變異點的致病性或外顯性。
2. 若報告中欲描述未知臨床意義的變異，則需要清楚地與有致病性或有相對處置對策的基因變異結果明確分開，並註明此變異的臨床相關性為不明。
3. 需要明確敘述未列入報告的基因類型有哪些（如：良性變異）。
4. 變異點之描述需使用廣泛接受的命名法。
5. 描述此變異點對此基因功能的影響。
6. 描述此變異點與疾病之間的關係。若可行，提供其資料來源（如：是否為已核可的人類基因變異資料庫，詳細內容請見第九章基因資料庫使用與管理）。
7. 需要描述是否需要其他家族成員的基因檢測資料，才能明確定義此變異的臨床意義。
8. 整份報告使用清楚、一致、易於理解的方式表達。
9. 報告結果可為無變異基因檢出。
10. 實驗室需要自行決定是否將意外發現的基因結果列於檢測報告中。

(二) 載明此檢測之方法學

1. 描述欲檢測的基因以及染色體區域。若為基因套組，應列出套組內所有目標基因。
2. 綜述此方法的效能（詳見第七章第二節內容）。

(三) 載明此檢測之限制

1. 指出檢測限制，可以包括定序失敗的基因區段、干擾物質，以及臨床判讀變異點上的限制。
2. 需明確指出可以執行哪些附加檢測，以減少檢測風險。

十一、再確效建議

當次世代定序檢測的條件變更時，對於檢測類型、檢測範圍會有很大的影響。變更範圍可以是更換新的試劑供應商、軟體更新、平台更換、化學物質更換、定序目標新增。若這些改變需要重新確效，其確效範圍將視變更的種類以及程度而不同。

基於風險評估，應重新確效整個檢測流程並記錄效能，而非僅確效變更的部分。若風險評估後，這些改變不太可能造成有意義的效能改變，實驗室仍應提供適當的分析或臨床確效計畫，完整確認變更所帶來的影響以及範圍。

- (一) 記錄實驗流程之修改處，應包括軟體更新與生物資訊分析流程之變更。
- (二) 變更後（包括軟體），準備詳細的標準作業流程以重新確效。在標準作業流程中明確敘述預期變更以及變更實施方式，包括要重新確效的內容、預期閾值、必須達到的效能指標。
- (三) 使用足量的已知樣品進行重新確效，以確保其效能。應記錄樣品數量與類型，並提供選擇理由。
- (四) 記錄重新確效的內容及修改後的效能。
- (五) 若僅變更生物資訊分析流程，可以使用現有已知變異序列的數據檔進行確效。若僅是生物資訊分析流程的小部分變更，可以藉由比較前後產出結果進行確效，並隨時記錄效能。
- (六) 若一項檢測內容有多處變更，可以分別或一起評估效能。
- (七) 將新的基因添加到現有基因套組時，需完整記錄並評估效能。若變更後的檢測未達預期效能，需重新設計檢測內容。若為遮罩(mask)或去遮罩(unmask)特定基因而變更分析軟體，亦需重新確效。
- (八) 需有內部或外部資料庫更新流程，如：固定每半年彙整並更新。考慮變更對基因變異評估的影響，並記錄資料庫的任何更新，如：基因名稱、基因位置、資料庫版本等。

十二、後續流程考量建議

在實驗的設計、研發、確效，與上線階段，都需要考量可能的後續流程（如：確認試驗、補充試驗、父母子三人試驗）。若未執行相關後續流程，則記載無法報告之結果類型。

若重要變異或欲檢測基因區段的檢測結果未達預期品質指標時，應建立相關後續流程（如：桑格定序法確認試驗、補充試驗）。此外，針對少數未確診疾病，建議執行父母子三人試驗或家族試驗，否則，在缺少親子或家族試

驗結果時，檢測結果仍無法判定。

十三、 參考文獻

1. Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) – Based In Vitro Diagnostics (IVDS) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Disease. (2018, U.S. FDA)
2. Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Genetic and Genomic – Based In Vitro Diagnostics. (2018, U.S. FDA)
3. 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. (2015)

十四、 常用資料庫

族群資料庫	
Exome Aggregation Consortium (ExAC) http://exac.broadinstitute.org/	針對 61,486 個無相關個體進行外顯子定序，所建立的疾病特異性與基因群體性變異資料庫。排除兒科疾病以及相關個體資料。
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS	針對數個歐裔以及非裔美國人大型群體進行外顯子定序所建立的變異資料庫。包含定序覆蓋率數據以得知變異是否存在。
1000 Genomes http://browser.1000genomes.org	對 26 個族群進行低覆蓋率以及高覆蓋率基因定序與目標基因定序時，所建立的變異資料庫。相較 Exome Variant Server 提供更多樣的數據，但可能具有低品質之數據，以及包含相關個體群體的數據。

dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	多方來源的短基因變異資料庫（尤其≤50 個鹼基對）。可能缺乏原始資料且包含致病性變異。
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	多方來源的結構變異資料庫（尤其為 50 鹼基對大小者）。
疾病資料庫	
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	具臨床重要性以及表現型關係的人類變異判定資料庫。
OMIM http://www.omim.org	來自具有代表性採樣與疾病相關的基因變異資料庫。
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.org	匯集已發表於文獻中的變異註解所建立的資料庫。多數內容需要付費訂閱。
與基因座/疾病/種族/其他相關資料庫	
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html	Human Genome Variation Society 網站針對特定基因變異子群體的變異註解，具有上千筆相關資料庫。大部分資料庫藉由 Leiden Open Variation Database system 建立。
Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	與基因座(locus)相關的基因變異資料庫。
DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk	為臨床從業人員以及研究者建立的分子細胞學資料庫，使用 Ensembl 基因體瀏覽器連結表現型與基因晶片數據的關係。
序列資料庫	
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	大量人類基因體參考序列資料。

<p>RefSeqGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg</p>	<p>醫學相關基因參考序列資料。</p>
<p>Locus Reference Genomic (LRG) http://www.lrg-sequence.org</p>	<p>建議如何選擇參考序列模板的資料庫</p>
<p>MitoMap http://www.mitomap.org/MITOMAP/HumanMitoSeq</p>	<p>根據劍橋出版的人類粒線體DNA參考序列的修訂版。</p>
<p>註：若實驗室自行建置資料庫，須符合國家法律條文規定，如：人體生物資料庫管理條例、個人資料保護法。</p>	