

• 论 著 •

上海地区 NRAS 基因突变检测室间质量评价分析*

黄中强,肖艳群,王雪亮,杨依韵,蒋玲丽,周 靖[△]

上海市临床检验中心分子生物学室,上海 200126

摘要:目的 通过开展神经母细胞瘤病毒癌基因 RAS 同源物(NRAS)基因突变检测室间质量评价(EQA)项目,评估上海地区实验室的检测能力及存在问题。方法 选取含有特定 NRAS 基因突变位点的经甲醛溶液固定、石蜡包埋的细胞作为 EQA 标本,对其均匀性和稳定性进行评价。分别于 2019 年和 2020 年将标本随机编号后发至参评实验室,要求实验室在规定时间内检测并回报结果,上海市临床检验中心对结果进行评价分析。结果 标本均匀性和稳定性均符合要求,2019 年和 2020 年分别收到 26 份和 24 份有效回报结果,结果总体合格的实验室分别占 84.62%、95.83%,结果完全正确的实验室分别占 80.77%、79.17%;标本的整体符合率分别为 93.08%、93.33%;在错误结果类型中,假阳性率分别为 33.33%、25.00%,假阴性率分别为 66.67%、75.00%。结论 上海地区实验室 NRAS 基因突变检测能力整体较好,2020 年实验室的检测能力较 2019 年有所提升;假阴性是主要错误类型,部分实验室检测能力尚有待提高;实验室通过参加 EQA 等方式加强实验室质量管理,可及时发现并持续改进以提高其检测能力。

关键词:神经母细胞瘤病毒癌基因 RAS 同源物; 室间质量评价; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.001

中图法分类号:R-331

文章编号:1673-4130(2022)10-1153-05

文献标志码:A

External quality assessment for NRAS gene mutation testing in Shanghai*

HUANG Zhongqiang, XIAO Yanqun, WANG Xueliang, YANG Yixiao, JIANG Lingli, ZHOU Jing[△]

Department of Molecular Biology, Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China

Abstract: Objective To evaluate the detection capacity and existing problems of laboratories in Shanghai by carrying out the external quality assessment(EQA) project for neuroblastoma RAS viral oncogene homolog(NRAS)gene mutation detection. **Methods** Formaldehyde solution-fixed and paraffin-embedded cells containing specific NRAS gene mutation sites were selected as EQA specimens, and their homogeneity and stability were evaluated. The specimens were randomly numbered and sent to the participating laboratories in 2019 and 2020, respectively, and the laboratories were required to test and report the results within the specified time. The Shanghai Center for Clinical Laboratory evaluated and analyzed the results. **Results** The uniformity and stability of the specimens met the requirements. In 2019 and 2020, 26 and 24 valid return results were received, respectively. The overall qualified laboratories accounted for 84.62%, 95.83%, respectively. The laboratories with completely correct results accounted for 80.77%, 79.17% respectively. The overall coincidence rates of the specimens were 93.08%, 93.33%, respectively; among the types of false results, false positives accounted for 33.33%, 25.00%, and false negatives accounted for 66.67%, 75.00%, respectively. **Conclusion** The overall NRAS gene mutation detection capabilities of laboratories in Shanghai is relatively good, the detection capabilities of laboratories in 2020 was improved compared to 2019, the false negative was the main type of error, which indicates that the detection capabilities of some laboratories need to be improved. The laboratory strengthens the quality management of the laboratory by participating in EQA, etc., so that problems can be discovered in time and continuous improvement to improve its testing capabilities.

Key words: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; external quality assessment; gene mutation

神经母细胞瘤病毒癌基因 RAS 同源物(NRAS)基因是 RAS 基因家族的主要基因之一,属于细胞内信号传导蛋白类原癌基因。当 NRAS 基因发生突

变时,会降低 RAS 蛋白水解三磷酸鸟苷转化为二磷酸鸟苷的能力,继而引起下游通路的改变,致使细胞产生恶性增殖^[1-2]。使 NRAS 基因处于激活状态的突

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC0910000)。

作者简介:黄中强,男,技师,主要从事临床分子检测质量管理相关研究。△ 通信作者,E-mail:zhoujing@sccl.org.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220429.1754.004.html\(2022-05-05\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220429.1754.004.html(2022-05-05))

主要位于第 2、3、4 外显子上,且多见于黑色素瘤、急性髓系白血病和结直肠癌^[3]。临床研究发现 NRAS 基因突变的结直肠癌患者不能够从表皮生长因子受体(EGFR)治疗中获益^[4],因此在《中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)》中再次推荐对患者进行 NRAS 基因突变检测,以指导肿瘤靶向用药^[5]。当前 NRAS 基因突变检测在临床中已广泛开展,常用的检测方法有扩增阻滞突变系统(ARMS)、Sanger 测序、高通量测序(NGS)等^[6]。多项研究发现,不同实验室间 EGFR、鼠类肉瘤病毒癌基因、鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌基因同源体 B 和磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因突变检测结果的一致性较差^[7-10],但目前国内有关 NRAS 基因突变检测能力的评估报道较少。因此,本研究拟通过开展 NRAS 基因突变检测的室间质量评价(EQA),以期发现临床实验室相关项目存在的问题,进一步改善和提高其检测质量。

1 材料与方法

1.1 标本制备 标本购自菁良基因科技(深圳)有限公司,由具有特定 NRAS 基因突变型(G12D、G12V、G13D、Q61K、K117N、A146T)的标本和野生型细胞混合后,经甲醛溶液固定、石蜡包埋(FFPE)制备,突变型标本的突变比例约为 50%。每支标本管中放入 1 卷蜡片,组织厚度在 15~20 μm ,于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 荧光定量 PCR 仪、NanoDrop One 超微量紫外分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;人类 NRAS 基因突变检测试剂盒购自厦门艾德生物医药科技股份有限公司;FFPE DNA 核酸提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。

1.3 标本分析

1.3.1 标本验证 使用 NRAS 基因突变核酸检测试剂盒对 EQA 标本进行验证,确保标本含有预期

NRAS 基因型。

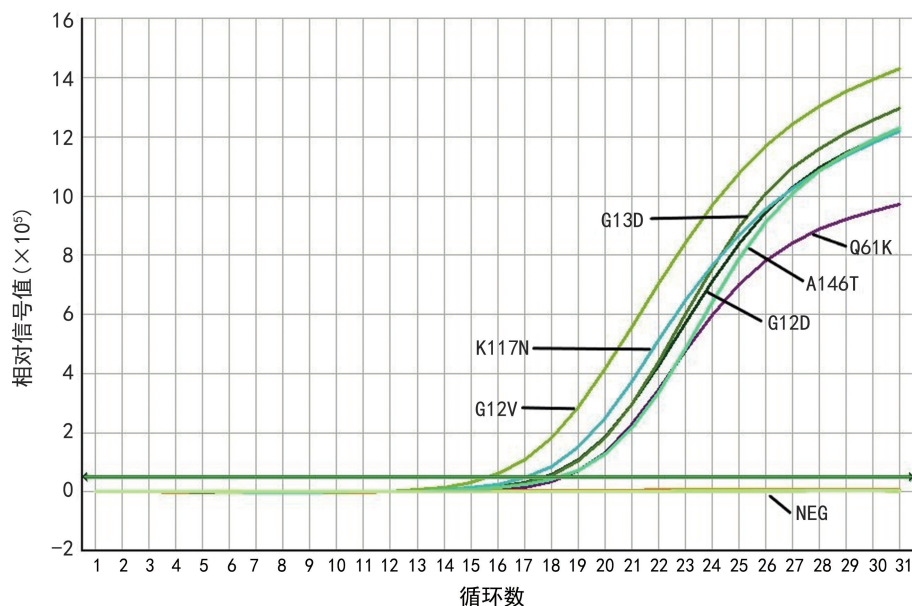
1.3.2 均匀性与稳定性评价 参照《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中关于均匀性和稳定性的评价要求^[11],每批 EQA 标本随机抽取某个突变型标本 10 支,使用 NRAS 基因突变检测试剂盒进行检测,完成均匀性评价;在参评实验室上报结果后的 3 d 内,随机抽取 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的某个基因型 EQA 标本 6 支,使用 NRAS 基因突变检测试剂盒进行检测,完成同步稳定性评价。

1.4 EQA 的实施 于 2019 年 5 月和 2020 年 5 月向各参评实验室发放 2 次 EQA 标本盘,每套标本盘包含 5 支标本,其中突变型标本 4 支,野生型标本 1 支。为防止参评实验室串通数据,每套标本盘的标本进行随机编号。标本盘经冷链运输至各参评实验室,要求其在规定时间内用实验室常规检测系统检测,并在 2 周内将结果通过网络系统上报至上海市临床检验中心数据库。

1.5 结果评价与分析 根据各实验室的回报结果计算各参评实验室得分,预期结果:野生型标本不被检测为突变型,突变型标本不被检测为野生型或其他突变型。回报结果与预期结果相符的得 20 分,不符的得 0 分,实验室结果 ≥ 80 分为成绩合格,100 分为优秀,否则为不合格。另外对检测结果进行统计分析,计算整体符合率、假阳性率和假阴性率。

2 结果

2.1 EQA 标本结果验证 本实验室对不同 NRAS 基因突变型的 FFPE 标本进行核酸抽提,使用分光光度法测定其基因组 DNA 水平,结果显示不同标本 DNA 提取量均 $> 1\ 000$ ng,可满足不同检测方法对标本的需要量。使用荧光 PCR 技术对所提取的核酸进行检测,结果证实不同标本含有预期 NRAS 基因型。见图 1。

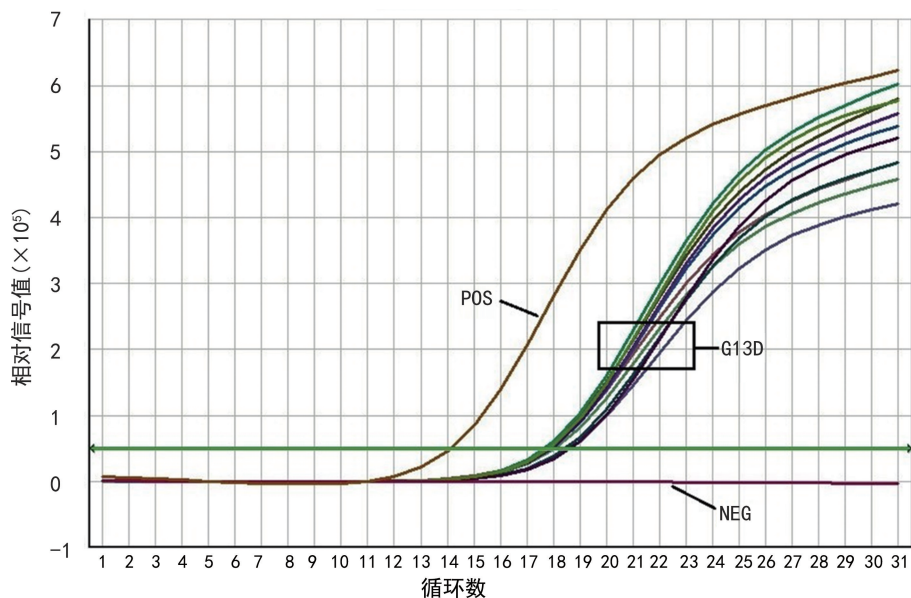


注:NEG 为阴性对照。

图 1 NRAS EQA 标本的 RT-PCR 扩增曲线图

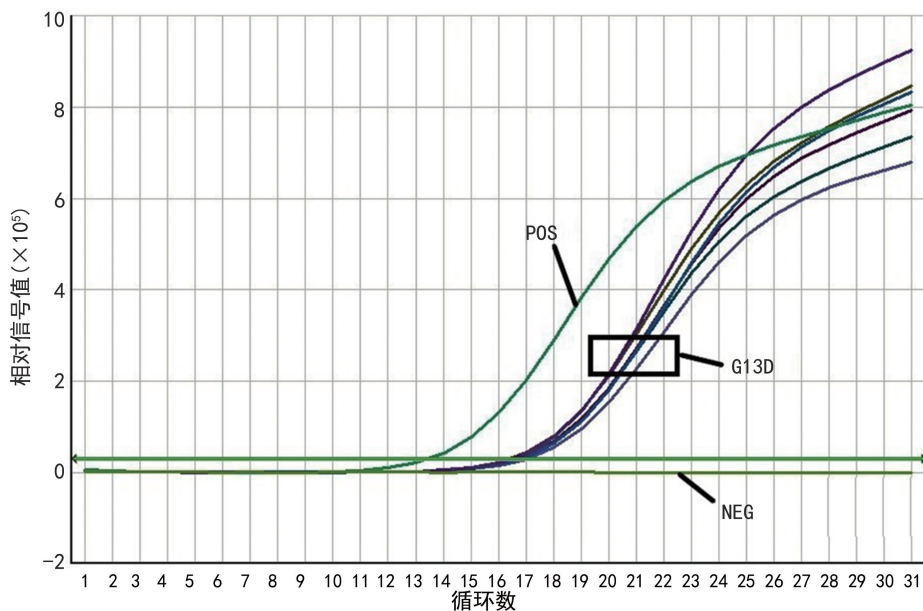
2.2 均匀性与稳定性评价 随机抽取 10 支 G13D 突变的 FFPE 标本进行均匀性检测,检测结果均为预期 NRAS 突变型,这表明 EQA 标本均匀性良好。在参评实验室上报结果后的 3 d 内对随机抽取的 6 支

G13D 突变的 FFPE 标本进行同步稳定性检测,结果均为预期 NRAS 突变型,表明标本具有良好的稳定性,可以满足 EQA 标本的要求。见图 2、3。



注:POS 为阳性对照;NEG 为阴性对照。

图 2 NRAS EQA 标本均匀性检测的 RT-PCR 扩增曲线图



注:POS 为阳性对照;NEG 为阴性对照。

图 3 NRAS EQA 标本稳定性检测的 RT-PCR 扩增曲线图

2.3 参评实验室整体回报情况 2019 年和 2020 年参加 NRAS 基因突变检测 EQA 的实验室分别有 37 家和 25 家,在规定时间内收到的有效回报结果分别为 26 份和 24 份,有效回报率分别为 70.27%、96.00%。2019 年收到有效回报结果的参评实验室有 26 家,其中医院病理科 11 家,医学检验所 15 家;2020 年收到有效回报结果的参评实验室有 24 家,其中病理科 12 家,医学检验所 12 家。在两次 EQA 中,参评实验室中最常用的方法为 ARMS 法,2019 年占

57.69%,2020 年占 66.67%,见表 1。

2.4 EQA 结果评价 2019 年和 2020 年两次 EQA 回报结果总体合格的实验室分别占 84.62%、95.83%,结果完全正确的实验室分别占 80.77%、79.17%,结果不合格的实验室分别占 15.38%、4.17%。见表 1。

2019 年和 2020 年两次 EQA 标本整体符合率分别为 93.08%、93.33%,假阳性率分别为 2.31%、1.67%,假阴性率分别为 4.62%、5.00%。在 2019 年

EQA 中,有 9 支标本出现结果与预期结果不符的情况,其中 G12D 突变标本的符合率最低,为 88.46%;在错误的结果中,6 支标本检测结果为野生型,假阴性率为 66.67%。在 2020 年 EQA 中,有 8 支标本出现

与预期结果不符的情况,其中 G13D 突变标本的符合率最低,为 87.50%;在错误的结果中,6 支标本检测结果为野生型,假阴性率为 75.00%。见表 2。

表 1 参评实验室检测方法和检测能力汇总[n(%)]

年份	检测方法	实验室数	EQA 分数(分)		
			100	80~<100	<80
2019 年	ARMS ^a	11(42.31)	10(38.46)	0(0.00)	1(3.85)
	ARMS ^b	4(15.38)	3(11.54)	0(0.00)	1(3.85)
	Sanger 测序法	4(15.38)	2(7.69)	1(3.85)	1(3.85)
	NGS	6(23.08)	5(19.23)	0(0.00)	1(3.85)
	MALDI-TOF-MS	1(3.85)	1(3.85)	0(0.00)	0(0.00)
	合计	26(100.00)	21(80.77)	1(3.85)	4(15.38)
2020 年	ARMS ^a	12(50.00)	11(45.83)	1(4.17)	0(0.00)
	ARMS ^b	4(16.67)	3(12.50)	1(4.17)	0(0.00)
	Sanger 测序法	5(20.83)	2(8.33)	2(8.33)	1(4.17)
	NGS	2(8.33)	2(8.33)	0(0.00)	0(0.00)
	MALDI-TOF-MS	1(4.17)	1(4.17)	0(0.00)	0(0.00)
	合计	24(100.00)	19(79.17)	4(16.67)	1(4.17)

注:ARMS^a 使用的厦门艾德公司的试剂;ARMS^b 使用的是其他公司的试剂。

表 2 NRAS 基因突变检测标本组成及符合率汇总[n(%)]

年份	标本编号	预期基因型	符合率	假阳性率	假阴性率
2019 年	1911	野生型	25(96.15)	1(3.85)	0(0.00)
	1912	p. K117N(c. 351G>T)	25(96.15)	0(0.00)	1(3.85)
	1913	p. Q61L(c. 182A>T)	24(92.31)	0(0.00)	2(7.69)
	1914	p. A146T(c. 436G>A)	24(92.31)	1(3.85)	1(3.85)
	1915	p. G12D(c. 35G>A)	23(88.46)	1(3.85)	2(7.69)
2020 年	2011	p. K117N(c. 351G>T)	22(91.67)	0(0.00)	2(8.33)
	2012	p. Q61L(c. 182A>T)	23(95.83)	0(0.00)	1(4.17)
	2013	p. G12D(c. 35G>A)	22(91.67)	1(4.17)	1(4.17)
	2014	p. G13D(c. 38G>A)	21(87.50)	1(4.17)	2(8.33)
	2015	野生型	24(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

3 讨论

近些年来,针对特定靶点的分子靶向药物越来越多地被应用于临床,极大地改善了肿瘤患者的预后,延长了生存时间^[12],但 NRAS 基因突变的肿瘤患者不能够从 EGFR 治疗中获益^[4],因此 NRAS 基因作为肿瘤靶向药物治疗的重要预测因子,准确地检测 NRAS 基因状态对于肿瘤患者的精准治疗及减少患者负担具有至关重要的意义^[13-14]。为了全面了解本地区临床实验室 NRAS 基因突变检测项目的检测质量,本中心组织实施了 EQA 活动。

本研究 2019 年和 2020 年两次 EQA 结果显示,ARMS 法是目前实验室最常用的检测方法,在两次

EQA 中分别占 57.69%、66.67%,这与 ARMS 法的特异性强、灵敏度高和简单易操作的优点紧密相关^[15]。两次 EQA 成绩合格的实验室分别占 84.62%、95.83%,说明参评实验室的检测能力有所提高。

两次 EQA 中,假阴性结果为主要的错误类型,在两次 EQA 错误类型中分别占 66.67%、75.00%。2017 年英国分子遗传学会对英国 RAS 基因 EQA 的分析结果同样显示,NRAS 基因突变检测的主要错误类型是假阴性结果^[6],而假阴性结果会导致肿瘤患者可能接受非必要治疗,这将对患者造成不良影响。本研究中出现假阴性结果的实验室使用的方法均为

Sanger 测序法和 NGS 法,需要指出的是,在 2020 年的 EQA 中,1 家实验室出现了 4 例假阴性结果,其检测方法为 Sanger 测序法,所用试剂为实验室自配试剂,因此笔者推测导致假阴性结果的主要原因很可能与实验室自建方法(LDTs)未涉及相关基因位点或未经充分的性能确认有关^[16]。另外,假阳性结果在两次 EQA 错误类型中分别占 33.33%、25.00%,主要原因推测为人员操作不规范所致。因此,实验室应进一步强化人员操作培训并严格按照标准操作程序进行操作,对于使用 LDTs 的实验室,必须经过充分性能确认,避免假阳性和假阴性的情况发生。在对实验室回报结果进行分析时,未发现同一家实验室连续两次出现错误结果类型,这也表明实验室可通过加强质量管理工作提高其检测能力。

基于组织标本的分子病理检测 EQA 项目,最合适的检测标本为临床组织标本,但由于来源有限及组织的异质性等限制,细胞系和质粒 DNA 等不同类型的标本均可用于 EQA 计划^[17],其中细胞系制备的 FFPE 标本具有诸多优点,如易于大批量培养制备、可充分模拟临床标本、可对检测全过程进行监控等;此外,细胞系标本也可制备含有不同突变比例的 FFPE 标本。因此,本研究选用细胞系制备的含有 NRAS 基因主要突变位点的 FFPE 标本组织 EQA 活动。发放的标本除了均匀性和稳定性可满足 EQA 活动的要求外,也可同时对检测全过程进行监控,并且能最大限度地模拟临床组织标本用于 EQA 活动,但本研究未发放低突变频率和不同突变频率的标本,因此后续将深入探讨不同频率标本的影响。

综上所述,本研究结果表明本地区大部分实验室 NRAS 基因突变检测能力较好,但部分实验室检测能力尚需提高。此外,EQA 活动可以持续改进实验室的检测质量,各实验室应加强质量管理工作,为临床精准用药和治疗提供更准确的指导和帮助。

参考文献

[1] MALUMBRES M, BARBACID M. RAS oncogenes: the first 30 years[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 459-465.

[2] KIEL C, MATALLANAS D, KOLCH W. The ins and outs of RAS effector complexes[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 236.

[3] PRIOR I A, HOOD F E, HARTLEY J L. The frequency of ras mutations in cancer[J]. Cancer Res, 2020, 80(14): 2969-2974.

[4] DOUILLARD J Y, OLINER K S, SIENA S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colo-

rectal cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 369(11): 1023-1034.

- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020年版)[J]. 中华外科杂志, 2020, 58(8): 561-585.
- [6] RICHMAN S D, FAIRLEY J, BUTLER R, et al. RAS screening in colorectal cancer: a comprehensive analysis of the results from the UK NEQAS colorectal cancer external quality assurance schemes (2009 - 2016) [J]. Virchows Archiv, 2017, 471(6): 721-729.
- [7] 蒋玲丽, 肖艳群, 王雪亮, 等. 上海地区表皮生长因子受体基因突变检测室间质量评价[J]. 检验医学, 2017, 32(11): 1055-1058.
- [8] ZHANG R, HAN Y, HUANG J, et al. Results of first proficiency test for KRAS testing with formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines in China[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(12): 1851-1857.
- [9] DEANS Z C, WALLACE A, O'SULLIVAN B, et al. External quality assessment of BRAF molecular analysis in melanoma[J]. J Clin Pathol, 2014, 67(2): 120-124.
- [10] 王雪亮, 徐幸, 魏萌, 等. 上海地区 PIK3CA 基因突变检测室间质量评价分析[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(5): 376-379.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南: CNAS-GL003[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [12] BEDARD P L, HYMAN D M, DAVIDS M S, et al. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology[J]. Lancet, 2020, 395(10229): 1078-1088.
- [13] TSIMBERIDOU A M, FOUNTZILAS E, NIKANJAM M, et al. Review of precision cancer medicine: evolution of the treatment paradigm[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102019.
- [14] MURUGAN A K, GRIECO M, TSUCHIDA N. RAS mutations in human cancers: roles in precision medicine [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 23-35.
- [15] 葛闯, 易琳, 唐万燕, 等. Sanger 测序与 ARMS-PCR 在非小细胞肺癌 EGFR 基因突变检测中的比较及应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(21): 2648-2653.
- [16] D'ANGELO R, WEISS R, WOLFE D, et al. Facing the inevitable: being prepared for regulatory requirements for laboratory developed tests[J]. Am J Clin Pathol, 2018, 149(6): 484-498.
- [17] 王雪亮, 肖艳群, 王华梁. 临床分子病理检测质控品的研究进展[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2018, 6(2): 80-83.

(收稿日期: 2021-10-12 修回日期: 2022-01-28)