

团 体 标 准

T/SZAS XXXX—XXXX

基于高通量测序技术检测 Duchenne/Becker 型肌营养不良的应用规 范

Application specification of Duchenne / Becker muscular dystrophy detection based
on high-throughput sequencing technology

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

深圳市标准化协会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 检测前咨询	1
6 实验流程	2
7 样本质量评估要求	4
8 受检者资料和样本的保存	4
9 实验操作要求	4
10 实验室室内质控、室间质评要求	4
11 数据分析规范	5
12 报告原则	6
13 报告撰写和发放	7
14 检测后遗传咨询	7
附录 A（资料性） 送检单及知情同意书参考模板	10
附录 B（资料性） 检测报告正文参考模板	13
附录 C（资料性） 检测报告附录参考模板	14
参考文献	15

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。

本文件由深圳华大基因股份有限公司提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：深圳华大基因股份有限公司、中国罕见病联盟Duchenne/Becker型肌营养不良学组、中国医学科学院北京协和医院、首都医科大学附属北京儿童医院、福建医科大学附属第一医院、四川大学华西第二医院、中山大学附属第一医院。

本文件主要起草人：戴毅、彭智宇、吴静、赵素敏、吕俊兰、王志强、蔡晓唐、王惊、孙隽、黄辉。

引 言

Duchenne和Becker型肌营养不良（DMD/BMD）是最常见的遗传性神经肌肉病，呈X-连锁隐性遗传。其发病率在各个国家、地区和人种间无明显差异。全球流行病学调查提示DMD在男性中的全球合并患病率约为4.78~7.1/10万；BMD则约为1.53/10万。在活产男婴中DMD和BMD的发病率分别为1/4673~1/3500和1/18518。我国DMD的发病率约为1/3853，估算我国约有7~9万例患者，遍布全国各地区，无地域特征。由于该疾病目前尚无治愈方法，因此对该病的防控需要基于检出携带者、提供正确的遗传咨询、进行产前诊断及胚胎植入前遗传学诊断等方法，进而降低发病率，减轻家庭负担和国家医疗负担。其中DMD突变的精确检测和准确的诊断工具对于遗传咨询和个性化医疗至关重要。

DMD/BMD的致病基因DMD基因长达2300 kb，包含79个外显子，是人类最大的编码基因之一，且致病突变谱复杂分散，包含大部分致病变异类型，无法轻易实现准确而方便的分子诊断。以往多重聚合酶链式反应（Multiplex PCR）、Sanger测序、多重连接依赖性探针扩增（MLPA）、高通量测序等技术都曾经或正在用于DMD/BMD的基因诊断。单独使用这些技术时各有优缺点，因此临床常需组合使用，需要多个阶段序贯检测才能实现对该基因大片段缺失/重复、点突变等多数突变类型的检测，完成DMD/BMD的遗传学诊断。随着高通量测序技术的发展，国内外均已经开发并验证了基于靶向高通量测序的新方法，可在单一检测平台上提供对DMD/BMD患者和女性携带者大片段缺失/重复和点突变的检测。与传统的序贯检测相比，单一平台检测减少了时间和成本，降低了因序贯检测中途失访或因医疗费用增加放弃检测群体的漏检风险，同时也为新兴的基因治疗提供了更为精确的分子诊断信息。但目前国内尚未建立基于高通量测序平台检测Duchenne/Becker型肌营养不良的应用规范标准，鉴于此，中国罕见病联盟DMD/BMDx学组协同国内多家长期从事DMD/BMD诊治工作的医院以及在高通量测序技术应用领域经验丰富的相关单位共同参与，对基于高通量测序检测DMD基因突变的检测对象、遗传咨询、实验室工作程序、检测报告以及质量控制等方面提供技术层面建议，以期达到为该技术检测DMD基因临床应用提供参考标准和路径，规范基于高通量测序技术平台进行Duchenne/Becker型肌营养不良基因诊断和携带者筛查的目的。

基于高通量测序技术检测 Duchenne/Becker 型肌营养不良的应用规范

1 范围

本文件规定了基于高通量测序技术检测Duchenne/Becker型肌营养不良的临床应用中，检测前遗传咨询、实验流程、样本质量评估、受检者资料和样本保存、实验操作要求、实验室室内质控、室间质评要求、数据分析规范、报告原则、报告撰写和发放、检测后遗传咨询等。

本文件适用于利用高通量测序（NGS）技术检测DMD的机构，采用高通量测序技术对外周血、DNA、新鲜组织基因组DNA进行DMD基因检测，完成对DMD/BMD疾病的筛查或遗传学诊断。

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 20470 临床实验室室间质量评价要求
WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则
WS/T 496 临床实验室质量指标
Duchenne型肌营养不良多学科管理专家共识
中国假肥大型肌营养不良症诊治指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

先证者 proband

在家族中首先被确认的DMD/BMD患者。

3.2

插入/缺少突变 insertion-deletion mutations; Indels

在基因组DNA中插入和/或删除1到多个核苷酸。

3.3

拷贝数变异 copy number variant; CNV

由基因组发生重排而导致的、一般指长度为50 bp以上的基因组大片段的拷贝数增加或者减少。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMD: Duchenne型肌营养不良 (Duchenne Muscular Dystrophy)

BMD: Becker型肌营养不良 (Becker Muscular Dystrophy)

SNV: 单个核苷酸的变异 (Single Nucleotide Variant)

5 检测前咨询

5.1 临床适用人群或临床适应症

疑似DMD/BMD患者、疑似幼龄女性携带者、有明确或疑似DMD/BMD家族史的女性家系成员（包含先证者离世或无法获取先证者样本的家系）。

5.2 检测前咨询要点

5.2.1 受检者信息资料采集及家系图绘制

受检者信息资料涉及基本资料和临床资料，包括受检者个人信息、临床就诊及检查评估情况、家族史、既往是否进行造血干细胞移植、既往输血史等。对于家族史中涉及多个患病成员的应根据受检者自述情况绘制家系图。

5.2.2 送检建议及局限性告知

咨询医生或遗传咨询师应明确告知该基因检测的目的，技术方法的局限性，可能获得的检测结果，影响检测结果的因素等。

5.2.3 检测前申请单填写和知情同意书签署

咨询医生或遗传咨询师应引导并协助受检者或监护人或授权委托人完成送检申请单填写，叮嘱仔细阅读知情同意书，进而完成知情同意书签署。开展基于高通量测序技术检测Duchenne/Becker型肌营养不良应用的知情同意书应包含但不限于以下内容（参考模板见附录A）：

- a) 检测项目介绍；
- b) 检测局限性；
- c) 受检者风险提示；
- d) 其他补充情况；
- e) 剩余样本及数据捐献的知情与同意；
- f) 受检者陈述声明。

6 实验流程

6.1 捕获探针设计与测评

6.1.1 目标区域选择

目标区域的选择应满足：

- a) 探针捕获区域至少覆盖 DMD 基因的编码区；
- b) 至少覆盖用于性别判断的 Y 染色体上的一个基因；
- c) 至少覆盖 3 个以上管家基因作为内参基因，用于 DMD 基因 CNV 分析。

6.1.2 捕获探针测评

采用正常样本（捕获区域内CNV阴性），依据6.3~6.5步骤，进行核酸提取、建库与测序，DMD基因目标区域与内参基因目标区域的有效平均深度应不低于100×，20×有效覆盖度应不低于99.9%，否则，捕获探针应重新设计与测评。

6.2 样本采集、运输与保存

6.2.1 样本采集

6.2.1.1 样本采集原则

样本采集过程应遵守 WS 233 的要求，做好生物防护，以避免样品污染，保护实验人员的安全。

6.2.1.2 样本采集前

样本核对被采集人的身份信息，核查采血管类型、采血管是否完好无损及是否在保质期内、送检单上贴上样本唯一条码，核查送检单、采血条码、知情同意书签名信息等。

6.2.1.3 样本采集

样本采用 EDTA 抗凝采血管，贴标签时应使条码与采血管的长轴平行，不要完全包围环绕试管而无法看到管内样本情况；粘贴条码时务必牢固，不会脱落；根据采血要求采集 2mL~5mL 外周血，采集样本后立刻缓慢颠倒混匀 5 次~10 次，置于室温或 4℃ 环境保存。

6.2.1.4 样本采集后

样本再次核对送检单、采血管上的唯一条码，在登记本上登记被采血者信息及采血时间和样本状态。

6.2.2 样本运输

6.2.2.1 样本交接

样本交接时，应核对样本状态（有无溶血、采血管有无裂痕等）、采血管及送检单信息的一致性、样本数量，并在交接本上签名与记录。

6.2.2.2 样本运输

确保样本与送检单一起运输至检测实验室。在运送过程中，采血管应竖直且固定于管架上，避免剧烈震荡，运输温度控制在2℃~8℃范围内，运输时间不超过7天。

6.2.3 样本接收、信息录入

6.2.3.1 样本接收

样本接收时应核对样本编号及送检单，并检查样本状态，对符合要求的样本，接收并登记、签字。对不符合要求的样本，拒收、登记并通知重新采样。

6.2.3.2 样本信息录入

样本信息的采集与录入，应方便咨询医生对分子诊断结果进行正确、合理的解释。样本信息包括但不限于以下内容：

- a) 受检者姓名；
- b) 出生日期；
- c) 性别；
- d) 种族/民族；
- e) 家族史；
- f) 检测项目；
- g) 临床诊断；
- h) 相关临床检查结果；
- i) 采集日期；
- j) 唯一性标识；
- k) 样本类型；
- l) 送检医院和医生信息。

6.2.4 样本保存

样本储存于室温或2℃~8℃条件下时，应不超过15天；-20℃储存条件下不超过3年。

6.3 DNA提取

使用DNA提取试剂盒，按照试剂盒说明书操作，提取样本中的基因组DNA。目前市售的磁珠吸附法和硅胶膜离心柱法提取试剂盒提取的基因组DNA，一般均能满足实验的需求。

6.4 文库构建

采用物理打断或者使用DNA片段化酶，将样本中提取的基因组DNA进行片段化，然后采用末端修复酶对片段化DNA进行末端修复和3'端加碱基“A”，再采用连接酶在片段化DNA两端加上含标签序列的接头，经PCR扩增形成杂交前文库。其后，将制备好的杂交前文库等质量混合，并采用带有生物素标记的捕获探针与混合文库进行杂交，通过生物素亲和素反应使目标DNA片段锚定在亲和素磁珠上，洗脱去除非目标DNA后，对DMD基因区域特异性捕获的DNA进行PCR扩增，获得杂交后文库，用于DNA测序。

6.5 DNA测序

按照测序仪厂商提供的标准测序流程进行测序操作。

7 样本质量评估要求

样本接收时，如发生以下情况之一的，实验室应拒绝接收样本：

- a) 样本发生溶血或血液凝固；
- b) 抗凝剂使用不正确；
- c) 采血管出现裂痕或破裂；
- d) 采血管出血污、开盖；
- e) 样本量达不到实验室要求；
- f) 样本条码信息与送检单信息不符；
- g) 样本条码或送检单信息模糊不清楚。

8 受检者资料和样本的保存

受检者资料包括送检单、实验数据记录和实验检测结果，均保存5年以上，另有规定的除外。可保存受检者样本外周血，保存期限在3年以上。

9 实验操作要求

9.1 核酸 DNA 提取要求

核酸DNA提取过程中，应设置阴性对照和重复对照。提取后的DNA置于-20℃以下条件下保存6个月，避免反复冻融。DNA要求：DNA提取总量 $\geq 2 \mu\text{g}$ ，浓度 $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ，OD_{260/280} 值在1.6~1.8之间，琼脂糖凝胶电泳结果DNA主带明显，无明显降解。

9.2 文库制备要求

文库制备过程中，设置阳性对照、阴性对照和空白对照。对于杂交前文库，空白对照文库浓度应低于 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ ，否则说明环境中可能存在DNA污染源，宜重新建库。空白文库符合要求，其他文库浓度应大于等于 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，文库片段分布为单一峰，无大片段拖尾。

9.3 目标区域捕获要求

捕获探针杂交后文库产量应至少满足两次上机测序需求，且片段分布为单一峰，无大片段拖尾。

9.4 测序要求

按照测序仪厂商提供的标准对杂交文库进行处理与质控。

10 实验室室内质控、室间质评要求

10.1 总体原则

依据GB/T 20470以及WS/T 496对DMD基因检测实验室进行室内质控和室间质评。

10.2 室内质控

10.2.1 质控品使用要求

10.2.1.1 尽可能在 DMD 基因检测的所有环节使用适当的质控品进行质控，可包含如下质控品：

- a) 阴性质控品：经过验证的不含 DMD 基因变异的标准品或样本；
- b) 阳性质控品：至少考虑 DMD 基因杂合子的阳性情况；
- c) 空白对照：无核酸酶水等，检测实验体系是否存在外源污染。

10.2.1.2 质控品应首选标准品，在无标准品或标准品不易获得的情况下，阴性质控品也可以选用经过确认的不含 DMD 基因变异的已知阴性样本；阳性质控品也可以选用经过确认的已知阳性样本，或者经过验证的相关细胞系等，优选的原则是标准品的特征尽可能接近临床样本。

10.2.2 室内质量控制

对于日常室内质量控制，质控品（阴性质控品、阳性质控品和空白质控品）应与待检样本同时检测，具体质控参数如表1。

表1 DMD 基因变异检测室内质量控制

质控环节	质控参数				参数不达标处理情况
	阳性质控品	阴性质控品	待测样本	空白对照	
DNA 提取	DNA 提取总量 $\geq 2 \mu\text{g}$ ，浓度 $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ，OD260/280 值在 1.6~1.8 之间，琼脂糖凝胶电泳结果 DNA 主带明显，无明显降解			浓度为 0，电泳无条带	重新提取或重新采样
文库	文库浓度应大于等于 $10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，文库片段分布为单一峰，无大片段拖尾			文库浓度 $< 1 \text{ng}/\mu\text{L}$ ，无片段分布	重新建库
内参基因目标区域有效深度	不低于 $100\times$			不高于 $10\times$	重新检测
内参基因目标区域覆盖度	$20\times$ 有效覆盖度不低于 99.9%			$20\times$ 有效覆盖度为 0	重新检测
变异检测情况	检出变异一致	未检出致病变异	-	-	重新检测

10.3 室间质评

开展DMD基因检测的实验室，每年应参加国家卫健委临床检验中心组织的室间质评，成绩合格。对于国家卫生健康委临床检验中心暂未开设本项目的室间质评时，应开展对DMD基因检测的实验室间能力验证，实验室应制订年度能力验证计划、标准作业程序等。

11 数据分析规范

11.1 数据分析流程

11.1.1 基于目标区域捕获与高通量测序技术的 DMD 基因变异分析流程如图 1 所示。

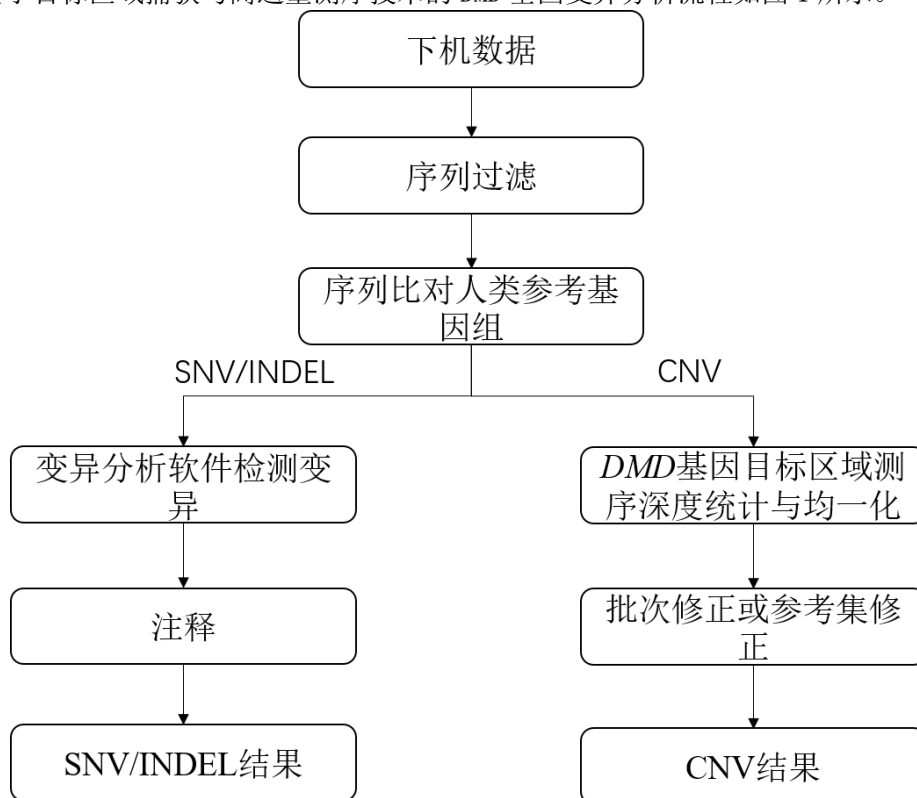


图1 基于目标区域捕获与高通量测序技术的 DMD 基因变异分析流程

11.1.2 将测序获得的原始数据进行过滤，过滤掉低质量碱基序列，过滤后得到“干净”测序数据。

11.1.3 将“干净”测序数据比对到人类参考基因组。

11.1.4 SNV/Indels: 采用变异分析软件, 如 GATK, 对变异进行检测; 采用变异注释软件对变异进行注释, 注释结果应包含染色体坐标信息、样本信息、基因分型信息、基因信息、变异功能信息、变异HGVS信息、公共数据库等位基因频率信息、变异功能预测信息等。SNV/Indels 变异注释结果应包含 DMD 基因的参考转录本序列, 宜采用 NM_004006.2。

11.1.5 CNV: 对样本的 DMD 基因各个外显子深度进行统计, 并基于样本内参基因平均有效深度, 对 DMD 基因各外显子深度进行均一化; 对均一化后的样本采用批次修正或者参考集修正, 其中男性样本采用批次内的其他男性样本进行深度修正, 或男性样本采用男性样本参考集进行深度修正, 女性样本采用批次内的其他女性样本进行深度修正, 或女性样本采用女性样本参考集进行深度修正。也可使用能够检测 CNV 断点的软件通过分析 CNV 断点来检测 DMD 基因的 CNV。缺失或重复范围对应到外显子区域时, 应提供 DMD 基因的参考转录本序列, 宜采用 NM_004006.2。

11.2 数据质控

11.2.1 质控品质控

质控品应与待测样本同时检测, 质控要求如表2所示, 当质控品未达到表2所示的质控参数时, 该质控品所质控的批次样本均应重新检测。

表2 基于目标区域捕获与高通量测序技术的 DMD 基因变异检测质控品

质控品	质控参数		
	内参基因目标区域有效深度	内参基因 20×有效覆盖度	变异检测情况
阳性质控品	≥100×	≥99.9	检出且一致
阴性质控品	≥100×	≥99.9	未检出 DMD 基因致病变异
空白对照	<10×	0	-

11.2.2 样本测序数据质控

对于单个待测样本, 其Q20/Q30合格率应符合对应测序技术平台的技术要求, 内参基因目标区域有效平均深度应不低于100×, 20×有效覆盖度应不低于99.9%, 如不满足相应标准应重新检测。

11.2.3 变异质控

11.2.3.1 SNV/Indels: 支持变异的有效序列数应不低于 20×; 对于半合型变异, 支持变异的有效序列比(支持变异的有效序列/支持该目标区域的总有效序列)不低于 0.8; 对于杂合型变异, 支持变异的有效序列数比(支持变异的有效序列数/支持该目标区域的总有效序列数)应在 0.3~0.8 之间。

11.2.3.2 CNV: 对于半合缺失型变异, 支持缺失区域的相对序列数理论上应为 0; 对于半合重复型变异, 支持重复区域的相对序列数理论上应为 2; 对于杂合缺失型变异, 支持缺失区域的相对序列数理论上应为 0.5; 对于杂合重复型变异, 支持重复区域的相对序列数理论上应为 1.5。在样本的实际检测中, CNV 阈值应根据实际测试的已知阳性样本或标准品、并综合考虑数据波动等因素进行确定。

11.2.3.3 支持缺失区域的相对序列数=支持缺失区域的均一化序列数/该区域对应参考集样本的该区域均一化中位序列数(或对应批次样本的该区域中位序列数)。

11.2.3.4 支持重复区域的相对序列数=支持重复区域的均一化序列数/该区域对应参考集样本的该区域均一化中位序列数(或对应批次样本的该区域均一化中位序列数)。

11.3 变异致病性分类

DMD基因变异可分为五类(致病的、可能致病的、临床意义不明确的、可能良性的、良性的)。对变异分类判断的主要依据包括SNV/Indels和CNV是否影响蛋白编码基因或重要调控元件功能、文献报道、数据库案例报道情况(ClinVar、ClinGen、DECIPHER、OMIM、GeneReviews、UniProt 等数据库, 内部患者案例库)、普通人群频率数据库(1000 genome、DGV、DGV-gold、gnomAD、国内本地人群频率)收录情况、家系共分离情况、变异来源(新发或遗传自父母)和软件预测结果等。

12 报告原则

12.1 报告内容

12.1.1 概述

DMD基因检测报告可分为正文和附录两部分。

12.1.2 报告正文内容

报告正文（参考模板详见附录B）应包含以下内容：

- a) 样本信息：包含送检单位、送检医师、送检者姓名、年龄、性别、联系方式、样本类型、到样日期、临床症状、既往史及家族遗传病史等；
- b) 检测平台与检测方法；
- c) 检测结果：基因、染色体位置、转录本、核苷酸变化或缺失/重复范围、基因型、变异分类等信息；
- d) 结果说明：对样本检测结果、变异文献报道情况、公共人群数据库频率及变异与疾病关系进行简要概述。

12.1.3 报告附录内容

报告附录（参考模板详见附录C）应包含以下内容：

- a) 疾病简介与变异详情：对 DMD/BMD 疾病发病率、表型、发病机制等进行概述；对检出变异分类依据进行概述；
- b) 检测方法与局限性：检测方法中应明确 DMD 基因的捕获区域、变异检测范围、变异的报告范围、变异致病性分类标准等。局限性中应明确仅能检测捕获区域范围的变异、不排除存在检测范围外的其他致病变异、不能排除受检者下一代会因为新发（de novo）突变而导致 DMD/BMD 发生的可能，明确不能检测的变异类型或范围等；
- c) 检测结果相关附图：SNV/Indels 位点 reads 图、CNV 区域外显子深度图。

12.2 报告范围

12.2.1 对于疑似患者样本的报告，基于变异分类指南和现有证据，分类为致病、疑似致病和临床意义不明的变异应在报告中报出。

12.2.2 对于有家族史的正常女性样本，如先证者分子诊断已明确病因，正常女性样本的报告应根据先证者分子诊断结果进行报告；如先证者未进行分子诊断，对于正常女性样本的报告，基于变异分类指南和现有证据，分类为致病和疑似致病的变异应在报告中报出。

12.2.3 对检出的符合上述报告范围要求的致病、疑似致病或临床意义不明的 SNV、Indels 变异，在满足 11.3 数据质控要求的情况下，可直接进行报告；对于不符合 11.3.3 变异质控要求的致病、疑似致病和临床意义不明的 SNV、Indels 变异，宜采用 Sanger 验证之后进行报告。

12.2.4 对检出的符合上述报告范围要求的致病、疑似致病或临床意义不明的 CNV 变异，对于半合型缺失变异在满足 11.3 数据质控要求的情况下，可直接进行报告；对于不满足 11.3 数据质控条件的半合型缺失、杂合型缺失、半合型与杂合型重复变异宜采用 MLPA 或 qPCR 验证之后进行报告。

13 报告撰写和发放

报告撰写应满足12.1和12.2要求。检测报告的发放由开展基于高通量测序技术检测Duchenne/Becker型肌营养不良应用的第三方检测机构或实验室执行完成，严格遵循信息保密原则。除特殊情况外，默认检测报告同步发放给受检者和送检医师；针对有可疑DMD/BMD家族史但无法获得先证者基因检测结果或样本的疑似女性携带者自送检的情况，检测报告发放给受检者本人，同时检测机构应要求受检者接受检测后的遗传咨询服务，并建议至相关医院就诊咨询。

14 检测后遗传咨询

14.1 阳性检测结果的遗传咨询

14.1.1 受检者为疑似 DMD/BMD 患者

受检者为疑似DMD/BMD患者，此阳性检测结果将用于受检者病因诊断。送检医师应详细地解释检测结果，同时应结合临床症状、临床辅助检查结果，对受检者进行确诊。送检医师或遗传咨询师应根据受检者家族史、家族成员及咨询目的等情况给出相应遗传咨询建议，遗传咨询的内容包括但不限于以下：

14.1.1.1 风险评估

14.1.1.1.1 绘制家系图，确定是否符合 X-连锁隐性遗传；对家族中不同成员提供风险评估解释及后续检测方案建议。

14.1.1.1.2 在充分保护隐私，单独告知患者母亲的前提下，可根据是否准备再次生育等具体情况，选择是否通过基因检测明确携带者状态。告知约有 2/3 的患者的母亲为携带者，其余 1/3 患者母亲的外周血 DNA 中没有检测到与该患者相同的阳性结果，可能是患者为 DMD 基因新发变异，也可能是患者母亲为生殖细胞嵌合变异。同时告知，少部分女性携带者会在 50 岁左右出现扩张性心肌病。

14.1.1.1.3 若患者母亲为携带者，则患者的同胞兄弟将有 50%的概率为患者，50%的概率为正常；同胞姐妹有 50%的概率为携带者，50%的概率不携带致病变异。可根据家系情况选择基因检测。对于患者母亲家族中女性成员，特别是仍有生育要求的女性成员，可考虑进行 DMD 基因的携带者检测。

14.1.1.1.4 若患者母亲为非携带者或疑似存在生殖细胞嵌合变异，通常再发风险小于女性携带者。但因无法确定生殖嵌合的比例，其同胞兄弟患病的概率和同胞姐妹为携带者的概率无法给出确切数值，可根据各送检医师或实验室、第三方检测机构的病例积累给出经验值供受检者或咨询者参考。

14.1.1.2 生育指导建议

14.1.1.2.1 患者后代：若男性患者能够生育，其儿子均不会受累（不考虑母源可能的携带或新发突变），但其女儿均是携带者，因此其女儿在生育时应进行产前基因诊断。

14.1.1.2.2 患者同胞姐妹：均存在携带风险，达育龄期后应对患者的同胞姐妹进行相应基因缺陷携带者检测以指导生育。

14.1.1.2.3 患者母亲：无论患者母亲是否为携带者，若有再次生育需求则建议进行产前基因诊断。

14.1.1.2.4 患者家系中母系育龄女性：若患者母亲为携带者，则建议有生育需求的母系育龄女性在孕前进行相应基因缺陷检测，若为携带者，后续进行产前诊断。

14.1.1.2.5 对家族中所有明确携带致病突变的女性携带者，也可自愿选择进行胚胎植入前单基因遗传病检测（PGT-M），避免患胎的治疗性流产。

14.1.1.3 治疗和预后

14.1.1.3.1 根据基因检测结果，可通过读码框理论、无义突变介导 mRNA 降解理论等预测临床表型，但对于区分 DMD/BMD 表型其预测效果有限。当部分患者基因型-表型结果不一致时，应由临床医生综合分析临床表现，必要时结合肌肉活检病理诊断结果和肌肉组织 mRNA 测序结果等，做出 DMD/BMD 最终分型。

14.1.1.3.2 对此类患者的治疗的评估及综合管理应参考《Duchenne 型肌营养不良多学科管理专家共识》和《中国假肥大型肌营养不良症诊治指南》，提示患者及家属应充分知情并积极配合。Becker 型肌营养不良表型相对轻，发展慢，一般不宜长期口服激素治疗，但可借鉴 Duchenne 型肌营养不良的多学科管理和临床随诊治疗原则。

14.1.1.3.3 送检医师或遗传咨询师应提供国外和国内治疗药物的相关信息给受检者及家属，为未来可能的治疗选择做参考。告知目前我国尚无获批的 DMD/BMD 基因治疗药物。国外正式批准用于治疗 DMD 疾病的药物包括以下几种：

- a) 肾上腺糖皮质激素类药物：deflazacort（商品名 Emflaza），中文名“地夫可特”，适用于所有类型基因突变的 DMD 患者。2019 年 6 月后，FDA 批准用于 2-5 岁杜氏肌营养不良症（DMD）儿科患者。同时其他剂型激素类药物，如泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙亦在国内外广泛应用于 DMD 的长期治疗。地夫可特并未在我国申请上市；
- b) 外显子跳跃疗法：反义寡核苷酸药物 Eteplirsen（商品名 Exondys 51），适用于 DMD 基因中存在的大片段缺失可用外显子 51 号跳跃来恢复读码框的 DMD 患者；2019 年 12 月 FDA 批准上市的 golodirsen（商品名：Vyondys 53），适用于 DMD 基因中存在的大片段缺失可用外显子 53 号跳跃来恢复读码框的 DMD 患者；

- c) 无义突变跳读疗法：Ataluren（商品名 translarna）仅在欧盟有条件批准上市，适用于 DMD 基因无义突变所致的患者；
- d) 其他新兴治疗，如 AAV 载体介导截短 dystrophin 的基因治疗、CRISPR / Cas9 基因编辑治疗等方向正处于临床前研究和临床试验阶段。

14.1.2 受检者为疑似幼龄女性 DMD/BMD 基因携带者、有明确或疑似 DMD/BMD 家族史的女性家系成员

受检者为疑似幼龄女性 DMD/BMD 基因携带者、有明确或疑似 DMD/BMD 家族史的女性家系成员，此阳性检测结果提示为 DMD 致病或疑似致病变异的携带者，送检医师应向受检者和/或监护人详细解释检测结果及这一基因缺陷携带状态可能的影响、遗传风险等，并给出具体建议。遗传咨询包括但不限于以下内容：

- a) 女性携带者一般不会发病，但少数女性携带者因为同时合并其他情况，如 X 染色体非随机失活、X 染色体-常染色体易位、单亲二倍体、Turner 综合征等，也可能出现临床表现。严重程度从类似男性 DMD 患者到类似男性轻症 BMD 患者，甚至单纯扩张性心肌病，均有可能。无明显临床表现的一般女性携带者也建议 50 岁左右进行超声心动图、心电图评估，如有心功能下降，应到专科门诊就诊；
- b) 女性携带者成长到育龄期时，可在孕前接受遗传咨询，后代男孩将有 50% 的概率为患者，50% 的概率为正常；后代女孩有 50% 的概率为携带者，50% 的概率为正常。生育时应进行产前诊断；
- c) 血肌酶明显升高的女性携带者应定期随访，是否出现肌肉无力症状并监测肌酶变化趋势；
- d) 有症状女性携带者的治疗参照男性 DMD 或 BMD 患者治疗原则进行综合管理干预。

14.2 阴性检测结果的遗传咨询

受检者为疑似 DMD/BMD 患者，此阴性检测结果提示受检者在基因检测范围内的遗传病因未明确，送检医师应解释说明其他可能性，遗传咨询的内容包括但不限于以下：

- a) 检测技术方法局限性：突变位于基因的内含子深处或表达调控区，可通过逆转录测序直接检测肌肉组织 DMD mRNA 转录情况，或全基因组测序、长读长测序检测排查复杂的结构变异，进一步发现潜在的遗传学病因；
- b) 患者的临床诊断存疑：应结合临床症状重新详细评估，根据诊断需要增加临床检查如肌肉活检病理诊断，明确是否为 DMD/BMD。抑或是有类似临床表现的遗传性肌病（如肌聚糖蛋白病）或获得性肌病（如炎性肌病）；
- c) 因受检者遗传学病因未明确，故无法对其他家系成员提供风险评估，无法给出生育指导建议。

受检者为疑似幼龄女性携带者、有明确或疑似 DMD/BMD 家族史的女性家系成员，此阴性检测结果提示受检者未携带现有检测范围内的致病变异，但不能完全排除因检测局限或检测范围外可能存在的致病变异导致疾病的风险，以及后代因新发致病突变导致疾病的风险。

附录 A
(资料性)
送检单及知情同意书参考模板

送检单及知情同意书参考模板见图A.1~A.3。

基于高通量测序 Duchenne/Becker 型肌营养不良基因检测送检单及知情同意书	
*送检单位信息	
*送检单位: _____	*送检医师: _____ 送检医师电话: _____
受检者信息	
*姓名: _____ *性别: _____ *出生日期: _____年____月____日 民族: _____ 籍贯: _____	
*电话: _____ 电子邮箱: _____ 地址: _____	
身份证号码: _____	发病年龄: _____
临床信息 (送检医师填写)	
*受检者类型: <input type="checkbox"/> 确诊患者 <input type="checkbox"/> 疑似患者 <input type="checkbox"/> 表型正常人群 <input type="checkbox"/> 其它: _____	
*检测目的: <input type="checkbox"/> 查找病因 <input type="checkbox"/> 辅助诊断 <input type="checkbox"/> 携带者筛查 <input type="checkbox"/> 指导生育 <input type="checkbox"/> 家系验证 (先证者姓名: _____ 与先证者关系: _____); 若有一同送检 (或曾经送检) 高通量检测的亲属样本, 请补充其样本编号 (若有) _____, 样本姓名 _____, 与该样本关系 _____)	
*受检者疾病史: _____ *临床症状: _____	
是否吸烟: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 *父母是否近亲结婚: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 *是否有疾病家族史: <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有 (若有, 请附家系图)	
*是否有附加检查材料: <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有 (如有, 请附检测报告电子档或复印件, 不勾选则默认无附加材料)	
*是否曾做过相关疾病的基因检测? <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有 (如有, 请附检测报告电子档或复印件)	
*送检样本信息	
样本类型: <input type="checkbox"/> 外周血 <input type="checkbox"/> 基因组 DNA <input type="checkbox"/> 其他: _____	
采集/提取日期: _____年____月____日____时____分	
样本的寄送日期: _____年____月____日____时____分 样本寄送人: _____ 联系电话: _____	
*检测项目	
*产品编号: _____	
*检测项目: <u>基于高通量测序 Duchenne/Becker 型肌营养不良基因检测</u>	

图A.1 送检单及知情同意书 第一部分

知情同意书

1. 检测项目概况

Duchenne 和 Becker 型肌营养不良（DMD/BMD）是临床最常见的一种 X-连锁隐性遗传性神经肌疾病。

检测方法：目标区域捕获与高通量测序法

周期为 16 个工作日；

检测适用的人群为疑似 Duchenne 或 Becker 型肌营养不良患者、有疑似 Duchenne 或 Becker 型肌营养不良家族史的正常女性，本检测不适用于无疑似 Duchenne 或 Becker 型肌营养不良家族史的健康人群。

2. 检测局限性

2.1 鉴于当前医学检测技术水平的限制和受检者个体差异等原因，本检测有可能出现假阳性或假阴性的结果，无法保证 100%的准确性以及 100%的成功率。

2.2 检测范围与局限性：本检测方法可检测变异为捕获区域内 DMD 基因编码区域的点突变、小的插入或缺失（≤20bp）、半合型的外显子缺失。本检测方法不能保证半合型外显子重复、杂合型外显子缺失与重复检测的准确性，建议采用其他方法进行验证。

2.3 该方法使用 DNA 源自受检者的外周血，非源自生殖细胞，不能排除嵌合现象所致的解读偏差。

3. 受检者风险提示

3.1 进行 DNA 序列分析是为了说明某种单基因病的发病原因或评估遗传风险。限于目前人类对疾病的认知水平，如未检出特定基因的致病变异位点（即阴性结果）并不能排除个体患某种疾病的可能性，因为某些单基因病的发病也可能和其他未知基因或难以检测的基因变异类型有关。

3.2 检测结果不能排除受检者下一代会因为新发（de novo）突变而导致相关疾病发生的可能

3.3 当送检样本为血液时，采集风险为常规肘部静脉采血风险，医务人员将按照标准医疗操作进行处理。检测之前的临床医疗，如骨髓移植和输血等，可导致检测结果的误导。由医疗机构进行采样产生的潜在损伤不在本知情同意告知范围内。

3.4 由于不可抗拒因素导致样本不合格，受检者需配合检测机构免费再次取样。检测周期从重新提取的样本入库之日起重新计算。如无法再次取样，实验室将停止检测并不再提供检测结果，检测费用全额返还。如受检者坚决要求继续检测，可能会导致检测失败或检测结果不准确，实验室不承担连带责任，检测费用和 risk 由受检者承担。

3.5 受检者在知晓检测结果后可能产生一定心理压力负担，医师等专业人员将根据情况提供咨询解释，本检测机构不承担连带责任。

3.6 遗传信息属于受检者及其家属的隐私信息，院方和检测机构将按法规要求保护受检者隐私及数据安全，但仍可能因不可抗因素存在隐私泄露的可能。

4. 检测结果与报告

4.1 本检测并非常规临床检测，目前主要用于辅助临床诊断或科研等目的，本检测结果仅供临床参考，不代表临床诊断意见，需经临床医师结合各方面情况综合判断。

4.2 本报告仅限与受检者临床表型相关且与受检者家族遗传病史不冲突的致病/疑似致病/意义未明变异。

4.3 受检者及其授权亲属可以向 XX 工作人员咨询检测报告的获取方式，或者拨打 XX 客服电话 XX 查询报告进度、索取检测报告。如果对检测结果有疑问，可以携带报告咨询当地医疗机构的遗传咨询医生。

4.4 送检医生、受检者及其授权亲属可以向负责本次检测收样的 XX 工作人员申请下载本检测所产生的原始数据（包括高通量原始下机数据 Fastq 文件及信息分析后的 VCF 文件）。本检测所产生的原始数据自检测报告发放之日起在 XX 保存期限为三年，超过此期限的原始数据申请将不被受理。

5. 意外发现(不涉及)

6. 其他

检测机构并未许诺该项检测方法百分之百准确率。

图A.2 送检单及知情同意书 第二部分

医师告知与同意 我已向受检者和/或监护人说明本知情同意书内容及所涉及检测性质、必要性、检测范围、预期目的、局限性、潜在风险等，已回答受检者和/或监护人的提问，承诺保护受检者隐私，我已得到受检者和/或监护人的同意开展该检测。		
*医师签名（正楷）： 日	*签名日期：	年 月 日
受检者知情与同意 1. 我已阅读并充分理解本知情同意书内容，包括检测性质、必要性、检测范围、预期目的、局限性、潜在风险等，所有疑问已得到解答，经本人及家属慎重考虑，同意进行检测并配合提交必要真实信息。我理解检测结果需由医师结合临床信息综合判断，我接受回访。 2. 我理解检测机构将按有关规定保留样本和数据用于复核，对其处理办法按下文的捐献约定方式进行。		
剩余样本及数据捐献的知情与同意 1. 我同意捐献我的检测剩余样本和数据，在去掉可识别个人信息后用于机构伦理委员会批准的科学研究、技术创新和临床应用。 勾选本条末尾方框表示我不同意捐献，机构将在有关规定保存期结束后按医疗废弃物等进行处理。 <input type="checkbox"/> 2. 我了解是否捐献剩余样本和数据不影响我接受检测或其他权益。我了解我不会因捐献获得直接受益。我可以在任何时间通知 XX 客服中心（XX）要求撤回捐献同意，撤回同意后我的剩余样本将在复核保存期满后销毁，相应数据将在复核保存期满后删除（但已匿名化进行群体分析或匿名发表的数据无法删除或撤回）。		
*受检者/监护人签名（正楷）： 月 日	*与受检者关系：	*签名日期： 年 月 日
（当受检者不满 18 岁，或知情同意能力欠缺、不足时，增加或由其监护人签字生效）		
注：a.带*为必填项；b.请在口处打"√"；温馨提示：我司工作人员不会收取您现金，也不会以任何个人名义收取款项，敬请留意。 如有任何疑问，请随时联系 XX 客服热线。联系电话：XX，咨询时间：周一~周日，9:00-12:00，13:00-17:30。		

图A.3 送检单及知情同意书 第三部分

附录 B
(资料性)
检测报告正文参考模板

检测报告正文参考模板见图B.1。

基于高通量测序 Duchenne/Becker 型肌营养不良基因检测报告模板

样本信息

样本编号	样本类型	姓名	性别	年龄	到样日期	送检医院	送检医生

临床症状、既往史及家族遗传病史

检测信息

检测基因	<i>DMD</i>
检测方法	目标区域捕获-高通量测序技术

检测结果

基因	参考序列	核苷酸变化/ 突变名称	氨基酸变化	基因亚区	基因型	参考文献	变异类型
<i>DMD</i>	NM_004006.2	EX46_55 DEL	-	EX46_55/CDS46_55	半合		Pathogenic

备注: **变异类型: Pathogenic 表示已知致病突变, Likely pathogenic 表示疑似致病突变, VUS 表示临床意义未明突变。

结果说明

本次检测, 在受检者中检出 *DMD* 基因的 1 个已知致病突变 (EX46_55 DEL Hemi), *DMD* 基因相关的贝氏肌营养不良/杜氏肌营养不良为 X 染色体连锁隐性遗传, 因此推测该突变可能导致疾病发生。

备注: 以上解读基于目前对检测疾病致病基因的研究。检测范围、检测方法与局限性见附录。

参考文献

注: 1、以上检测不排除在所检测的变异范围外存在其他致病或疑似致病变异的可能; 也不能排除受检者下一代会因为新发 (de novo) 突变而罹患 Duchenne/Becker 型肌营养不良的可能。

2、数据解读规则参考美国医学遗传学和基因组学学院 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 相关指南。

3、以上结论均为实验室检测数据, 其结果的确认应结合临床进行综合判断。

4、本报告结果只对送检样本负责, 如有疑义, 请在收到结果后的 7 个工作日内与我们联系。

实验操作人: 报告撰写人: 审核者: 报告日期:

图B.1 检测报告正文参考模板

附录 C
(资料性)
检测报告附录参考模板

检测报告附录参考模板见图C.1。

1. 疾病简介及变异详情

Duchenne/Becker 型肌营养不良

DMD, EX46_55 DEL

2. 检测方法、检测内容与局限性

检测方法：目标区域捕获-高通量测序技术

使用一套寡核苷酸探针，对基因组 DNA 中的 DMD 基因编码区域进行捕获，通过高通量测序和生物信息学分析，获取 DMD 基因编码区域的基因变异信息，对 DMD 基因目标区域变异进行检测。

检测范围与局限性

本检测方法可检测变异为捕获区域内 DMD 基因的点突变、小的插入或缺失 ($\leq 20\text{bp}$)、半合型的外显子缺失。

本检测方法不能保证半合型外显子重复、杂合型外显子缺失与重复检测的准确性，建议采用其他方法进行验证。

检测结果为阴性时，并不能排除存在检测范围外的其他基因变异。

检测结果不能排除受检者下一代会因为新发 (de novo) 突变而导致相关疾病发生的可能

3. 检测结果相关附图

图C.1 检测报告附录参考模板

参 考 文 献

- [1] GB/T 20470-2006 临床实验室室间质量评价要求
- [2] GB/T 29859-2013 生物信息学术语
- [3] GB/T 34798-2017 核酸数据库序列格式规范
- [4] WS 233-2002 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则
- [5] WS/T 496-2017 临床实验室质量控制指标
- [6] T/SZGIA 4-2018 临床单基因遗传病基因检测报告规范
- [7] 罕见病诊疗指南（2019版）
- [8] 黄辉, 沈亦平, 顾卫红, 等. 临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 36(1):1-8.
- [9] 黄辉, 沈亦平, 顾卫红, 等. 遗传病二代测序临床检测全流程规范化共识探讨(4)——检测报告解读和遗传咨询 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37 (03): 352-357. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.03.022
- [10] 北京医学会罕见病分会, 北京医学会神经内科分会神经肌肉病学组, 中国肌营养不良协作组. Duchenne型肌营养不良多学科管理专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(35):2803-2814.
- [11] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 中华医学会神经病学分会心电图与临床神经生理学组. 中国假肥大型肌营养不良症诊治指南 [J]. 中华神经科杂志, 2016, 49 (1): 17-20. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2016.01.004
- [12] Jean K Mah, Lawrence Korngut, Jonathan Dykeman, Lundy Day, Tamara Pringsheim, Nathalie Jette. *Neuromuscul Disord.* 2014 Jun;24(6):482-91.
- [13] Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, Salvo F, Messina S, Trifirò G. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Jun 5;15(1):141. doi: 10.1186/s13023-020-01430-8. PMID: 32503598; PMCID: PMC7275323.
- [14] Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
- [15] Wei X, Dai Y, Yu P, Qu N, Lan Z, Hong X, Sun Y, Yang G, Xie S, Shi Q, Zhou H, Zhu Q, Chu Y, Yao F, Wang J, He J, Yang Y, Liang Y, Yang Y, Qi M, Yang L, Wang W, Wu H, Duan J, Shen C, Wang J, Cui L, Yi X. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study. *Eur J Hum Genet.* 2014 Jan;22(1):110-8. doi: 10.1038/ejhg.2013.82. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23756440; PMCID: PMC3865410.
- [16] Okubo M, Minami N, Goto K, Goto Y, Noguchi S, Mitsuhashi S, Nishino I. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet.* 2016 Jun;61(6):483-9. doi: 10.1038/jhg.2016.7. Epub 2016 Feb 25. Erratum in: *J Hum Genet.* 2017 Oct;62(10):931-933. PMID: 26911353; PMCID: PMC4931045.
- [17] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):245-257.
- [18] Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011 Jul;13(7):680-5.
- [19] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24.
- [20] Shalini H. Kumar, Kalpana Athimoolam, Manikandan Suraj, Mary Shoba Das Christu Das, Aparna Muralidharan, Divya Jeyam, Jaicy Ashokan, Priya Karthikeyan, Ragav Krishna, Arati

Khanna-Gupta, Lakshmi Bremadesam Raman, Comprehensive genetic analysis of 961 unrelated Duchenne Muscular Dystrophy patients: Focus on diagnosis, prevention and therapeutic possibilities, PLOS ONE, 10.1371/journal.pone.0232654, 15, 6, (e0232654), (2020).

[21]Xie Z, Sun C, Zhang S, Liu Y, Yu M, Zheng Y, Meng L, Acharya A, Cornejo-Sanchez DM, Wang G, Zhang W, Schrauwen I, Leal SM, Wang Z, Yuan Y. Long-read whole-genome sequencing for the genetic diagnosis of dystrophinopathies. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 Oct;7(10):2041-2046. doi: 10.1002/acn3.51201. Epub 2020 Sep 20.

[22]<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=DMD%5Bgene%5D>

[23]<https://search.clinicalgenome.org/kb/genes/HGNC:2928>

[24]<https://decipher.sanger.ac.uk/gene/DMD/overview/clinical-info>

[25]<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

[26]<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1119/>

[27]<https://www.uniprot.org/uniprot/P11532>

[28]<https://www.internationalgenome.org/>

[29]<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

[30]<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/downloads?ref=GRCh37/hg19>

[31]https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000198947?dataset=gnomad_r2_1