

团 体 标 准

T/SZAS XXXX—XXXX

罕见病诊断临床解读规则

Specification for clinical interpretation of variants in rare disease diagnosis

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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
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 罕见病诊断解读流程	2
6 变异解读原则	2
7 致病性分类	10
8 罕见病诊断报告原则	11
参考文献	13

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。

本文件由中国医学科学院北京协和医院提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：中国医学科学院北京协和医院、深圳华大医学检验实验室、深圳华大基因科技有限公司、广州金域医学检验集团股份有限公司、北京贝瑞和康生物技术有限公司、浙江博圣生物技术股份有限公司、北京智因东方转化医学研究中心有限公司。

本文件主要起草人：张抒扬、刘雅萍、王薇、邱正庆、睢瑞芳、田庄、马明圣、吴南、田欣伦、聂敏、赵秀丽、蒋宇林、郭丹、金晔、陈雨、戴文韬、唐红钰、王凯、吴亚、吴昊、袁玉英、王岩琦、姜丹、周晓垂、李倩一、王娟飞、肖锐、范宁、谷为岳、祝娟娟。

罕见病诊断临床解读规则

1 范围

本文件规定了罕见病诊断解读流程、变异解读原则、致病性分类、罕见病诊断报告原则。

本文件适用于开展遗传病诊断与相关基因检测的医疗机构、医学检验实验室及其专业技术人员，用于孟德尔遗传疾病相关变异位点的评估与解读工作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

无功能变异 null variant

导致基因产物（蛋白质或 RNA）的正常生物学功能完全丧失或显著减弱的基因序列改变，又称功能丧失变异。

3.2

错义变异 missense variant

基因编码区中，一个碱基被替换成另一个碱基，最终导致蛋白质中相应位置的氨基酸被另一种氨基酸取代。

3.3

起始密码子变异 initiation codon variant

指基因编码区中，负责翻译起始的甲硫氨酸密码子（ATG）序列改变。

4 缩略语

ACGS: 临床基因组科学学会 (Association for Clinical Genomic Science)

ACMG: 美国医学遗传学与基因组学学会 (The American College of Medical Genetics and Genomics)

AD: 常染色体显性遗传 (Autosomal Dominant Inheritance)

AR: 常染色体隐性遗传 (Autosomal Recessive Inheritance)

B: 良性的 (benign)

CHPO: 中文人类表型术语集 (China Human Phenotype Ontology)

ClinGen: 临床基因组资源中心 (Clinical Genome Resource)

ESP: 美国心肺血液研究所外显子组测序项目 (NHLBI Exome Sequencing Project)

ExAC: 外显子组整合数据库 (Exome Aggregation Consortium)

gnomAD: 基因组整合数据库 (Genome Aggregation Database)

HPO: 人类表型术语集 (Human Phenotype Ontology)

LB: 可能良性的 (likely benign)

LOD: LOD值/优势对数记分 (Logarithm of the Odds)

LOF: 功能丧失 (Loss of Function)

LP: 可能致病的 (likely pathogenic)

MANE: NCBI与EMBL-EBI匹配注释数据库 (Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI)

MANE Plus: MANE扩展转录本集 (MANE Plus)

MCR: 错义约束区域 (Missense constraint regions)

mRNA: 信使RNA (Messenger RNA)

OE: 观察值/期望值 (Observed / Expected)
 OR: 比值比 (Odds Ratio)
 P: 致病的 (pathogenic)
 REVEL: 罕见外显子变异集成学习器 (Rare Exome Variant Ensemble Learner)
 RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)
 STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)
 SVI: 序列变异解读 (Sequencing Variation Interpretation)
 UCSC: 加州大学圣克鲁兹分校基因组数据库 (University of California, Santa Cruz)
 VUS: 意义未明的 (variant of uncertain significance)
 XL: X连锁遗传 (X-Linked Inheritance)

5 罕见病诊断解读流程

罕见病诊断解读流程以实验室自建数据库为基础, 依次开展表型匹配与候选变异筛选、变异致病性分级解读、检测报告规范撰写等核心技术环节, 详见表 1。

表 1 罕见病诊断解读流程描述

核心流程	类型描述
表型匹配与候选变异筛选	宜采用 HPO/CHPO 词条标准化处理临床表型信息, 进行表型匹配及位点筛选, 筛选临床表型相符, 家族史/遗传模式相符, 致病性评级较高变异进行全面系统评估。
变异致病性分级解读	根据人群频率、文献信息、家系共分离情况、软件预测信息等, 按照“ACMG 指南”规则完成变异致病性分级。
检测报告规范撰写	结合样品信息、产品信息、报告规则、变异相关信息、技术局限性完成诊断报告出具; 为保障报告质量, 宜采纳自动化解读报告系统。

6 变异解读原则

6.1 通则

按照人群数据、计算预测数据、功能数据、共分离数据、等位基因数据、数据库数据等, “ACMG 指南”设定了 28 项证据条目, 主要分为两类, 详见表 2。

表 2 ACMG 指南证据项分类描述

证据项分类	类型描述
致病性证据项	非常强 (very strong, PVS1), 强 (strong, PS1~4), 中等 (moderate, PM1~6), 或支持性证据 (supporting, PP1~5)
良性证据项	独立 (stand-alone, BA1), 强 (strong, BS1~4), 或支持性证据 (BP1~6)

6.2 致病性证据项强度分类原则

变异致病性的证据项详见表 3, 各致病性证据的等级依据现有研究予以升降级, 证据升降级体系的具体细则详见各证据项的相关规定。

表 3 致病性证据强度的分类原则

致病性证据	分类
非常强	PVS1: 当一个疾病的致病机制为功能丧失 (LOF) 时, 无功能变异 (无义变异、移码变异、经典 ± 1 或 2 的剪接变异、起始密码子变异、单个或多个外显子缺失, 以及 RNA 剪接实验结果提示导致异常剪接的变异)。
强	PS1: 与已确定的致病/可能致病变异具有相同的氨基酸改变, 或剪接供/受体基序内的变异 (影响剪接) 具有相同的剪接预测影响。 PS2: 经父母亲缘关系验证的新发变异 (<i>de novo</i>), 无家族史。 PS3: 体内、体外功能实验已明确会导致基因功能受损的变异 (不包括 RNA 剪接实验)。 PS4: 变异出现在患病群体中的频率显著高于对照群体。

中等	PM1: 位于已知无良性变异的关键功能域和/或位于功能未知的变异热点区域。 PM2: ESP、ExAC、gnomAD 等数据库中正常对照人群频率收录为低频甚至未收录。 PM3: 在隐性遗传病中, 在患者待分类变异反式或相位未知位置上检测到另外一个致病或可能致病或意义未明的变异。 PM4: 非重复区域框内插入/缺失或终止密码子丢失导致的蛋白长度发生变化的变异。 PM5: 与已确定的致病/可能致病的错义变异处于同一个氨基酸位置, 但不同氨基酸改变的变异。 PM6: 未经父母亲缘关系验证的新发变异。
支持证据	PP1: 变异与疾病在家系中共分离。 PP2: 某基因的错义变异是造成某种疾病的原因, 并且在这个基因中良性变异所占的比例很小, 在这样的基因中所发现的新的错义变异。 PP3: 计算证据支持对基因或基因产物的有害影响 (保守、进化、剪接影响等)。 PP4: 变异携带者的表型或家族史高度符合某种单基因遗传疾病。 PP5: 已经弃用, 有可靠信誉来源的报告认为该变异为致病的, 但证据尚不足以支持进行实验室独立评估。

注1: 无义变异: 基因编码区中, 原本编码氨基酸的密码子突变为终止密码子 (UAA、UAG、UGA) 的序列改变。

注2: 移码变异: 基因编码区中, 因插入或缺失的核苷酸数目非 3 的整数倍, 导致翻译阅读框被破坏的变异。

注3: 经典 ± 1 或 2 的剪接变异: 位于剪接供体位点 +1 / +2 位或剪接受体位点 -1 / -2 位的变异。

6.3 良性证据项强度分类原则

良性变异的分类详见表 4, 各良性证据的等级依据现有研究予以升降级, 证据的升降级体系细则见各证据项细则。

表 4 良性证据项分类原则

良性影响的证据	分类
独立证据	BA1: 一个变异在任何一个超过 2000 个等位基因的人群中频率 >5%。
强	BS1: 某一等位基因在对照人群中的频率大于疾病发病率。 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)。 BS3: 体内、体外功能实验已明确不会对蛋白功能产生破坏性影响。 BS4: 在一个家系成员中不符合遗传共分离。
支持证据	BP1: 已知一个疾病的致病机制是某基因的截短变异, 在此基因中所发现的错义变异。 BP2: 在完全外显的显性遗传病中, 检出与同一基因的另一个已知致病变异反式排列, 或者在任意遗传模式中, 检出与同一基因的另一个已知致病变异顺式排列。 BP3: 功能未知重复区域内的缺失/插入, 同时没有导致基因编码框改变。 BP4: 多种计算证据表明变异对基因或基因产物没有影响。 BP5: 在已经有另一致病原因的病例中发现的变异。 BP6: 已经弃用, 有可靠信誉来源的报告认为该变异为良性的, 但证据尚不足以支持进行实验室独立评估 BP7: 同义变异或内含子变异对剪接没有影响。 注: BP7 只有满足 BP4 时才适用。

6.4 证据项细则

6.4.1 PVS1

本证据项适用于致病机制为功能丧失 (LOF) 的无功能变异, 结合 2015 年 ACMG/AMP 指南、ClinGen SVI 工作小组、2024 年 ACGS 变异分级实践指南等相关分类标准与指南进行证据项强度调整, 可辅助参考相关预测工具 (如 PVS1Pro 无功能变异注释软件, <https://pvs1pro.bgi.com>)。

PVS1 证据项使用规范:

- 应参考 ClinGen, GenCC 等确认基因-疾病有效性, 且所适用疾病的致病机制为功能丧失 (LOF), 详见表 5;
- 转录本参考 MANE 或 MANE Plus 转录本, 若不同转录本对应的变异致病性预测结果不一致, 应对本证据项强度进行降级应用;
- 提前终止变异若位于 NMD 逃逸区, 应结合变异是否影响基因关键功能域, 对本证据项强度进行调整;

注1: NMD (Nonsense-mediated mRNA decay) ——无义介导的 mRNA 降解: 真核生物中高度保守的 mRNA 质量监控

与转录后调控机制，通过识别并快速降解开放阅读框内携带提前终止密码子的 mRNA 转录本，阻止截短类或潜在毒性蛋白的合成，同时参与调控部分正常生理 mRNA 的表达与稳定性。

注2：NMD逃逸区：mRNA 开放阅读框内的特定区域，该区域内的提前终止密码子无法有效触发无义介导的 mRNA 降解（NMD）通路，导致携带提前终止密码子的 mRNA 得以稳定存在并翻译产生截短型蛋白的基因组/转录本区域。位于 3' 端最后一个外显子或倒数第二个外显子的最后 50 ~ 55 个核苷酸内，以及 5' 端前 100 个核苷酸范围内。

- d) 非无功能变异（内含子变异、同义变异等），应依据 RNA 剪接实验数据，对是否适用 PVS1 证据项进行评估；
- e) 任何使用 PVS1 证据的变异，不再使用 PM1, PM4, PP2, PP3。

表 5 LOF 疾病机制判定规则

维持 PVS1 原级别，应满足以下条件： 基因-疾病有效性等级为“STRONG”（强）或“DEFINITIVE”（确定的）； ≥3 个 LOF 变异被独立判定为致病/可能致病（判定时未使用 PVS1 证据项），且在该疾病相关的所有已知致病性变异中，LOF 变异占比>10%，该 LOF 变异应覆盖 1 个以上外显子（单个外显子基因除外）。
证据强度降一级，应满足以下条件： 基因-疾病有效性等级为“MODERATE”（中等）及以上； 且≥2 个 LOF 变异与表型相关，该 LOF 变异应覆盖 1 个以上外显子（单个外显子基因除外）； 且基因敲除小鼠模型再现了疾病表型。
证据强度降二级，应满足以下条件： 基因-疾病有效性等级为“MODERATE”及以上； 且≥2 个 LOF 变异与表型相关，该 LOF 变异应覆盖 1 个以上外显子（单个外显子基因除外）。 或基因敲除小鼠模型再现了疾病表型。
如没有证据表明 LOF 变异可以导致疾病，则不应用任何强度水平的 PVS1

6.4.2 PS1

根据 2015 年 ACMG/AMP 指南、ClinGen SVI 工作小组更新的建议共识，对已知的相同氨基酸改变及剪接供体/受体基序不同位置变异的致病性，进行 PS1 证据项强度调整。

PS1 证据项使用规范：

- a) 剪接供体/受体基序变异评估 PS1 时，待分类变异与已知致病/可能致病变异的预测剪接事件应完全一致，详见表 6、表 7；
- b) 已知致病/可能致病的变异应有临床证据（文献）支持。
- c) PS1 不与 PM4 联用。

表 6 PS1 同一氨基酸残基/核苷酸改变解读规则建议

类型	待分类变异	分值/每例
PS1	待分类变异所在的氨基酸位置已存在相同氨基酸改变的致病变异	4
	待分类变异为起始密码子变异，其所在的氨基酸位置已存在致病变异	
	待分类变异为非编码 RNA 基因变异，其所在的核苷酸位置已存在致病变异	
	待分类变异所在的氨基酸位置已存在相同氨基酸改变的可能致病变异	2
	待分类变异为起始密码子变异，其所在的氨基酸位置已存在可能致病变异	
	待分类变异为非编码 RNA 基因变异，其所在的核苷酸位置已存在可能致病变异	
PS1 分值对应等级		
PS1_Moderate	PS1	
2	4	

表 7 PS1 剪接供/受体基序变异（影响剪接）解读规则建议

与已知致病/疑似致病变异具有相同剪接预测时的 PS1 应用				
正在评估的变异（VUA）	适用于 VUA 的预测证据	已知变异相对于 VUA 的位置	适用于 VUA 的 PS1 等级	
			已知变异为 P	已知变异为 LP

位于剪接供体/受体±1,2位之外	PP3	相同核苷酸	PS1	PS1_Moderate
	PP3	位于同一剪接供/受体基序内(包括±1,2位)	PS1_Moderate	PS1_Supporting
位于剪接供体/受体±1,2位	PVS1	位于同一剪接供/受体±1,2位	PS1_Supporting	N/A
	PVS1	位于同一的剪接供/受体基序内,但在±1,2位之外	PS1_Supporting	PS1_Supporting
	PVS1_Strong PVS1_Moderate PVS1_Supporting	位于同一剪接供/受体±1,2位	PS1	N/A
	PVS1_Strong PVS1_Moderate PVS1_Supporting	位于同一的剪接供/受体基序内,但在±1,2位之外	PS1_Moderate	PS1_Supporting

6.4.3 PS2/PM6

PS2 适用于经父母亲缘关系验证的新发变异 (*de novo*), 且患者的家族史符合新发变异的特征, 患者的表型与变异基因异常引起的表型相吻合; 未经父母亲缘关系验证的新发变异适用于PM6, 证据项强度详见表8、表9。

PS2/PM6 证据项在以下情形中应谨慎使用:

- 存在捐卵、代孕、胚胎移植等情形时, 审慎使用该证据;
- 产前样本表型信息有限、胎儿处于快速发育阶段, 且当前医学对相关疾病认知存在局限, 该证据项应谨慎使用;
- PS2/PM6 证据项的应用遵循表型一致性原则, 应审慎联用 PP4 证据。

表 8 新发变异单例计分值

表型一致性	分值/先证者	
	明确新发 (确认生物学父母)	推测新发 (未确认生物学父母)
表型与基因高度特异	2	1
表型与基因一致, 但非高度特异	1	0.5
表型与基因一致, 但非高度特异, 且遗传异质性强 (最高得分为 1 分)	0.5	0.25
表型与基因不一致	0	0

表 9 不同案例计分对应的新发证据 (PS2/PM6) 强度的调整建议

Supporting (PS2_Supporting or PM6_Supporting)	Moderate (PS2_Moderate or PM6)	Strong (PS2 or PM6_Strong)	Very Strong (PS2_VeryStrong or PM6_VeryStrong)
0.5	1	2	4

6.4.4 PS3/BS3

PS3 证据项适用于经体内、体外功能实验明确证实可导致基因功能受损的变异; 反之, 功能实验证实基因功能未受损的变异, 适用 BS3 证据项。证据项强度主要依据致病性几率 (odds of pathogenicity, OddsPath) 判定, 详见表 10; 若无法获取 Odds 值, 可结合酶活实验、动物敲除模型等功能研究结果调整证据项强度。

PS3/BS3 证据项使用规范:

- 功能实验应确保有效性与重复性, 应设置阴、阳性对照, 并开展技术重复与生物学重复验证;
- 应匹配疾病发病机制与实验方法适用性, 明确功能实验范畴不含 RNA 剪接实验。

表 10 PS3/BS3 证据项强度

OddsPath 值	证据项强度
<0.053	BS3
<0.23	BS3_Moderate
<0.48	BS3_Supporting
0.48-2.1	Indeterminate
>2.1	PS3_Supporting
>4.3	PS3_Moderate
>18.7	PS3
>350	PS3_VeryStrong

注：OddsPath 值计算： $OddsPath = [P_2 \times (1-P_1)] / [(1-P_2) \times P_1]$ ，其中 $P_1 = \text{已知致病对照个数} / (\text{已知致病对照个数} + \text{已知良性对照个数})$ ； $P_2 (\text{功能异常}) = \text{检测后功能异常个数} / (\text{检测后功能异常个数} + 1)$ ； $P_2 (\text{功能正常}) = 1 / (\text{检测后功能正常个数} + 1)$ 。

6.4.5 PS4

当变异在患病群体中的携带频率显著高于对照群体时，可根据 OR 值（文献中有病例—对照研究结果，且研究纳入的患者总例数 ≥ 10 例，OR 值 > 5 且 95% 置信区间不包含 1）或计算先证者案例数量，对该证据项的强度进行调整。

PS4证据项使用规范：

- a) OR 值计算：针对待分类变异，若文献中存在病例—对照研究结果，且研究纳入的患者群组总人数 ≥ 10 例、OR 值 > 5 ，且 95% 置信区间（95% CI）不包含 1，可适用 PS4；
- b) 计算先证者案例数：应满足以下任一条件：
 - 1) 待分类变异关联常染色体显性遗传（AD）或 X 连锁遗传（XL）疾病，且文献中无病例—对照研究数据；
 - 2) OR 值计算不满足上述适用规则，但该变异在多例具有相同典型表型的先证者中均被检出。具体详见表 11。

表 11 PS4 强度使用建议

证据项强度	PS4	PS4_Moderate	PS4_Supporting
先证者数量	≥ 15	6~14	2~5

应用先证者案例数量使用 PS4 证据项时，应满足：

- a) 待分类变异频率满足 PM2；
- b) 同一先证者（不同文献中）不能重复计数。

6.4.6 PM1

若蛋白关键结构域无良性变异，已发现的错义变异均被证实为致病/可能致病变异，则位于该关键结构域的错义或整码变异可采用 PM1 证据项。若基因中未明确功能的区域存在多个致病/可能致病变异，且发生于变异热点区域，同时其一个或多个相邻氨基酸中存在较高频率已知致病/可能致病变异，亦可采用 PM1 证据项。相关判定可参考 gnomAD、UCSC 等开源数据库的预测结果，如 gnomAD 中 MCR missense OE 参数，当 $0 < OE \leq 0.2112$ 时，使用 PM1；当 $0.2112 < OE \leq 0.3747$ 时，使用 PM1_Supporting。

6.4.7 PM2/BA1/BS1/BS2

根据 ESP、ExAC、gnomAD 等数据库的正常对照人群频率数据，开展 PM2/BA1/BS1/BS2 证据项的应用。PM2/BA1/BS1/BS2 使用规范：

- a) 待评估变异在正常对照人群中的频率为低频或未被收录时，可适用 PM2 证据项。ClinGen SVI 工作小组建议将 PM2 证据项的权重从中等强度调整为支持性强度；
- b) 变异在任一包含超过 2000 个等位基因的人群队列中频率 $> 5\%$ ，可适用 BA1；
- c) 等位基因在对照人群中的频率高于对应疾病的发病率，可适用 BS1。

对于早发且完全外显的疾病，若该变异在健康成人中以隐性遗传（纯合子）、显性遗传（杂合子）或 X 连锁遗传（半合子）形式存在，可适用BS2。

6.4.8 PM3/BP2

在隐性遗传病中，相同基因另一个变异的相位状态（反式分布或相位未知），对当前待分类变异的致病性判定具有重要影响。依据 ClinGen SVI 工作小组建议的 PM3 评分规则（见表 12、表 13），对 PM3 证据项进行强度调整。

表 12 SVI 专家组建议的 PM3 评分规则

其他变异的分类 / 合子状态	先证者得分	
	确认反式	相位未知
致病或可能致病变异	1.0	0.5 (P) 0.25 (LP)
纯合 (最高 1 分)	0.5	N/A
意义未明的变异 (最高 0.5 分)	0.25	0.0

表 13 不同案例计分对应的 PM3 证据项强度的调整建议

PM3_Supporting	PM3	PM3_Strong	PM3_Very Strong
0.5	1	2	4

相反，当已知致病变异与另一个待分类变异呈顺式分布时，这可以作为待分类变异的良性支持证据项 (BP2)。

6.4.9 PM4/BP3

PM4 证据项适用于非重复区域内框内插入或缺失多个氨基酸，或终止密码子丢失导致蛋白长度改变的变异；BP3 证据项适用于功能未知重复区域内（如常见STR重复区均不适用BP3或PM4）的框内插入/缺失多个氨基酸的变异（重复区域的判定可参考 UCSC 数据库中的重复标签）。对于功能获得效应基因，其最后一个外显子中的截短变异，若经预测或证实导致功能获得效应，应采用 PM4 证据项。

6.4.10 PM5

本证据项适用于相同的氨基酸残基位置，存在已明确致病/可能致病其他变异，且该变异与待评估变异导致不同氨基酸改变。PM5 证据项的强度调整详见表 14、表 15。

PM5 使用规范：

- 应评估待评估变异是否影响基因剪接功能；若可能导致异常剪接，应审慎使用本证据项；
- 已知明确致病变异或可能致病变异进行致病性评级时，不得依赖 PM5 证据项，以避免证据项循环引用；
- 已知致病/可能致病变异应有临床证据（文献）支持。

表 14 PM5 解读规则

类型	评估相同密码子的其他变化	分值/每例
PM5	变异所在的氨基酸位置，已存在导致不同氨基酸改变的致病错义变异，且评估变异的 Revel 或 Grantham 评分 \geq 已知致病变异	2
	框内缺失或重复与致病变异重叠一个或多个氨基酸残基	
	变异所在的氨基酸位置，已存在导致不同氨基酸改变的可能致病错义变异，且评估变异的 Revel 或 Grantham 评分 \geq 已知的可能致病变异 ^[2]	1
	框内缺失或重复与可能致病变异重叠一个或多个氨基酸残基	
PM5 分值		
PM5_Supporting	PM5	PM5_Strong

1	2	4
---	---	---

表 15 Grantham distance

Arg	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Tyr	Cys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Glu	Met	Trp	
110	145	74	58	99	124	56	142	155	144	112	89	68	46	121	65	80	135	177	Ser
	102	103	71	112	96	125	97	97	77	180	29	43	86	26	96	54	91	101	Arg
		98	92	96	32	138	5	22	36	198	99	113	153	107	172	138	15	61	Leu
			38	27	68	42	95	114	110	169	77	76	91	103	108	93	87	147	Pro
				58	69	59	89	103	92	149	47	42	65	78	85	65	81	128	Thr
					64	60	94	113	112	195	86	91	111	106	126	107	84	148	Ala
						109	29	50	55	192	84	96	133	97	152	121	21	88	Val
							135	153	147	159	98	87	80	127	94	98	127	184	Gly
								21	33	198	94	109	149	102	168	134	10	61	Ile
									22	205	100	116	158	102	177	140	28	40	Phe
										194	83	99	143	85	160	122	36	37	Tyr
											174	154	139	202	154	170	196	215	Cys
												24	68	32	81	40	87	115	His
													46	53	61	29	101	130	Gln
														94	23	42	142	174	Asn
															101	56	95	110	Lys
																45	160	181	Asp
																	126	152	Glu
																		67	Met

注：Grantham distance是一种用于计算两种氨基酸之间进化距离的方法，基于三个关键的化学性质：组成、极性和分子体积。这种方法被用来评估错义变异的影响，距离越大，预期的置换越有害。

6.4.11 PP1/BS4

PP1 证据项适用于变异与疾病在家系中呈现共分离的情形。应用 PP1 证据项时，待评估变异通常为低频变异（即满足 PM2-Supporting）。该证据项的具体强度应根据共分离次数计算 LOD 值，并参照表 16~18 进行判定（不同家系的 LOD 值可累加）。其中，受影响个体的共分离次数以减数分裂次数计，即家系中存在共分离的患者数量减 1。反之，若家系成员中未观察到共分离，则应考虑应用 BS4 证据项。

在应用过程中，应核实家系成员的生物学亲缘关系，排除收养、非亲生父子关系、精子/卵子捐赠及其他非生物学亲缘关系；同时应考虑疾病的不完全外显、表型异质性及年龄/性别等依赖性外显率。

表 16 确定 PP1 合适证据项强度的建议

PP1	PP1_Moderate	PP1_Strong
$0.6 \leq \text{LOD} < 1.2$	$1.2 \leq \text{LOD} < 1.5$	$\text{LOD} \geq 1.5$

表 17 AD/XL 疾病 LOD 值对应表

显性共分离次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
LOD 值	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5

表 18 表 18 AR 疾病 LOD 值对应表

		一般建议										
		非患者隐性分离										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
患者共分离	0	0	0.12	0.25	0.37	0.5	0.62	0.75	0.87	1	1.12	1.25
	1	0.6	0.73	0.85	0.98	1.1	1.23	1.35	1.48	1.6	1.73	1.85
	2	1.2	1.33	1.45	1.58	1.7	1.83	1.95	2.08	2.2	2.33	2.45
	3	1.81	1.93	2.06	2.18	2.31	2.43	2.56	2.68	2.81	2.93	3.06
	4	2.41	2.53	2.66	2.78	2.91	3.03	3.16	3.28	3.41	3.53	3.66
	5	3.01	3.14	3.26	3.39	3.51	3.63	3.76	3.88	4.01	4.13	4.26
	6	3.61	3.74	3.86	3.99	4.11	4.24	4.36	4.49	4.61	4.74	4.86
	7	4.21	4.34	4.46	4.59	4.71	4.84	4.96	5.09	5.21	5.34	5.46
	8	4.82	4.94	5.07	5.19	5.32	5.44	5.57	5.69	5.82	5.94	6.07
	9	5.42	5.54	5.67	5.79	5.92	6.04	6.17	6.29	6.42	6.54	6.67
	10	6.02	6.15	6.27	6.4	6.52	6.65	6.77	6.9	7.02	7.15	7.27

6.4.12 PP2/BP1

PP2 证据项应参考 gnomAD 数据库中 Missense Z 值;当 Missense Z 值 ≥ 3.09 时,可应用 PP2 证据项。若截短型或无功能变异为某基因已知的唯一致病变异类型,则该基因上的新发错义变异可应用良性证据 BP1。另外,PP2 不应与 PM1 联用。

6.4.13 PP3/BP4/BP7

当多种生物信息学预测方法评估变异对基因或基因产物产生有害效应或影响时,可应用生物信息学预测类证据项。可结合 REVEL、BayesDel、SpliceAI 等工具的预测结果,对相关证据项的强度进行调整。

PP3/BP4/BP7 使用规范:

- BayesDel 是针对错义类变异的综合性预测工具,其结果作为 PP3/BP4 的支持性参考证据使用,不与其他预测算法叠加计数,详见图 1;
- 经典剪接位点之外的变异,依据 SpliceAI 评分规则使用 PP3/BP4/BP7,详见图 2;
- RNA 研究表明对剪接无影响的内含子变异和同义变异使用 BP7 (RNA)。通过适当的体外实验证实某种替换对剪接无影响时,可将 BP7 权重提升至 BP7_Strong (RNA),详见图 3,建议 BP7 证据仅适用于采用非肿瘤组织样本的剪接检测结果;
- PM1 与 PP3 的组合证据强度不超过 4 分。

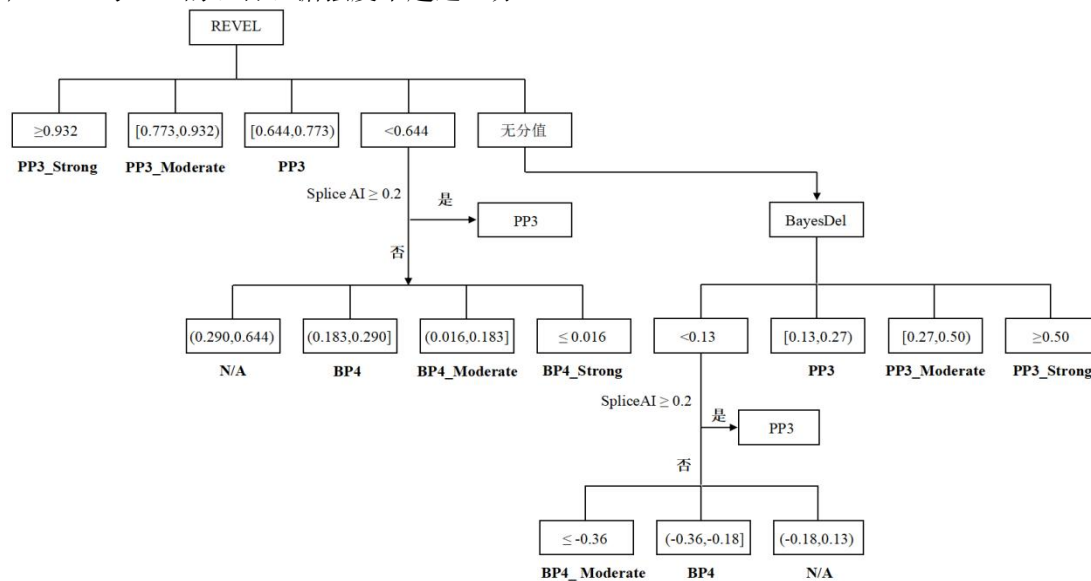


图 1 错义变异 PP3/BP4 判定阈值

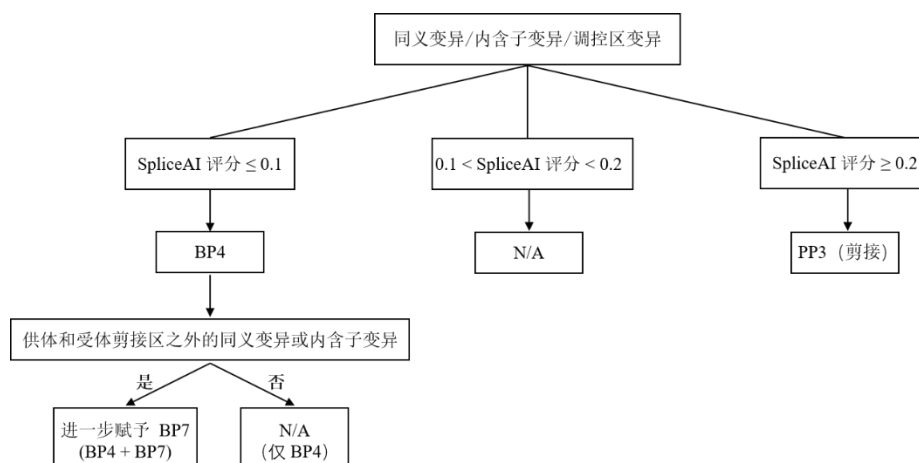


图 2 SpliceAI 判断阈值

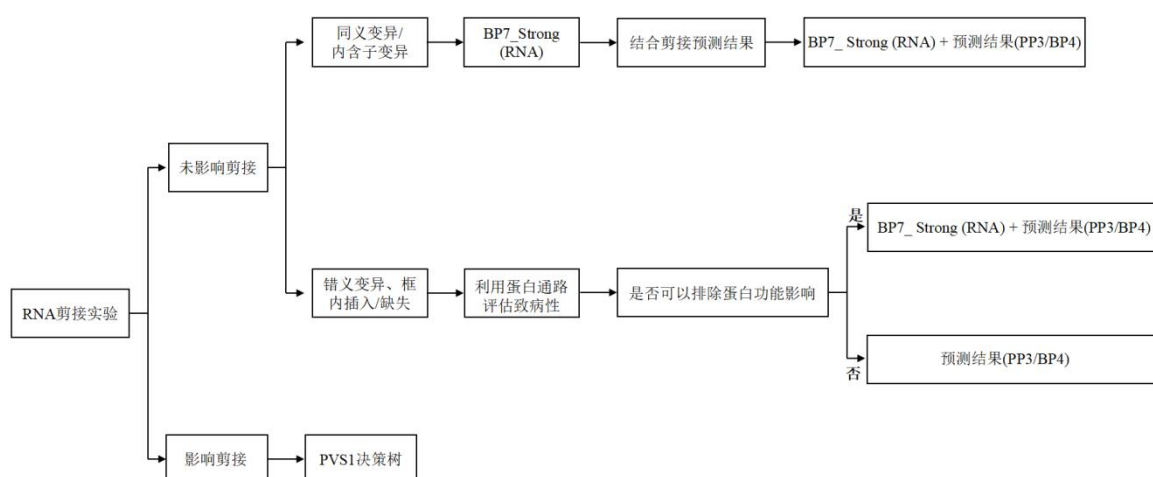


图 3 RNA 剪接实验

6.4.14 PP4

本证据项适用于变异携带者的表型或家族史与某种单基因遗传疾病高度相符的情形。当家族史与疾病遗传方式一致时，可酌情应用 PP4 证据项；该证据项通常适用于表型高度特异的疾病或经临床医师明确诊断的疾病。产前样本表型信息有限、胎儿处于快速发育阶段，该证据项应谨慎使用。

6.4.15 PP5/PP6(建议弃用)

2018 年 ACMG 对指南进行了更新与补充，PP5/BP6 已不再建议使用。

6.5 BP5

在已经有另一分子致病原因的病例中发现的变异，适用 BP5 证据项。

7 致病性分类

7.1 通则

变异分类指收集变异致病性/良性的证据，并综合这些证据进行等级分类。主要参考 ACMG 变异解读指南和 ClinGen 序列变异解读工作组和英国临床基因组科学学会（ACGS）等对该指南细化的规则。变异分类等级共五类：致病的、可能致病的、意义未明的、可能良性的和良性的。

7.2 贝叶斯变异致病性分类

推荐使用贝叶斯评分系统评估变异分类等级，证据强度等级的分值设定见表 19，基于分值的变异分类等级见表 20：

表 19 证据强度等级的分值设定

证据等级*	分值（致病性）	分值（良性）
Supporting	1	-1
Moderate	2	-2
Strong	4	-4
Very Strong	8	-8

*BA1 为独立良性证据，不计算分值。

另应注明，Richards 等学者未对中等强度、极高强度等级的良性证据项作出明确界定。即便如此，本评分体系仍可直接支持此类准则的增补工作。

表 20 基于分值的致病性分类等级

分类等级**	分值范围
致病的	≥ 10
可能致病的	$6 \leq X \leq 9$
意义未明的	$0 \leq X \leq 5$
可能良性的	$-6 \leq X \leq -1$
良性的	$X \leq -7$

**待分类变异必应存在两个及以上证据项时，才可以被判定为致病的/可能致病的，良性的/可能良性的。

待分类变异只存在一个证据项时，应判定为意义未明的（如仅有PVS1证据）。

待分类变异存在 BA1 时判定为良性。

7.3 ACMG/AMP 变异分类

ClinGen 专家组针对部分特殊基因的变异解读指南，其等级分类遵循序列变异分类的标准整合规则，详见2015年“ACMG指南”。

8 罕见病诊断报告原则

8.1 罕见病诊断报告内容

检测结果应经过至少两轮独立人工分析及复核流程，确保结果准确性及解读规范性。报告内容应全面涵盖辅助临床诊断的重要信息，包括但不限于以下内容：

- a) 受检者基本信息；
- b) 检测样本类型；
- c) 样本接收及检测报告的日期；
- d) 检测项目；
- e) 检测结果；
- f) 咨询建议等。

8.2 罕见病诊断检测结果分类

罕见病诊断检测结果可分为主要检测结果、次要检测结果、ACMG 意外发现及变异附表四部分，如：

- a) 主要检测结果：解释受检者主要表型，与疾病对应的遗传模式相符合的致病或可能致病变异或 ≥ 4 分的意义未明变异；
- b) 次要检测结果：可能解释受检者主要表型，与疾病对应的遗传模式相符合，但 < 4 分临床意义未明的变异；
- c) 依据受检者意愿考虑报出 ACMG SF (ACMG Secondary Findings) 所列基因的致病或可能致病变异。
- d) 变异附表：可根据临床需求以及厂家报告规范自主提供。

参 考 文 献

- [1] 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[J]. *Genetics in medicine*, 2015, 17(5): 405-423.
- [2] Durkie M, Cassidy EJ, Berry I, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2024[J]. *J Med Genet*. 2024;61:1-46.
- [3] 王秋菊, 沈亦平, 邬玲仟, 等. 遗传变异分类标准与指南[J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(6):668-688.
- [4] ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. ClinGen Sequence Variant Interpretation Work Group Recommendations for ACMG[J]. *AMP Guideline Criteria Code Modifications Nomenclature*, 2017.
- [5] Abou Tayoun A N, Pesaran T, DiStefano M T, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion[J]. *Human mutation*, 2018, 39(11): 1517-1524.
- [6] Walker L C, de la Hoya M, Wiggins G A R, et al. Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: Recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2023, 110(7): 1046-1067.
- [7] https://clinicalgenome.org/site/assets/files/3461/svi_proposal_for_de_novo_criteria_v1_1.pdf
- [8] Brnich S E, Abou Tayoun A N, Couch F J, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework[J]. *Genome medicine*, 2020, 12: 1-12.
- [9] Kelly MA, Caleshu C, Morales A, et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel. *Genet Med*. 2018 Mar;20(3):351-359.
- [10] Chao K R, Wang L, Panchal R, et al. The landscape of regional missense mutational intolerance quantified from 125,748 exomes[J]. *bioRxiv*, 2024.
- [11] https://clinicalgenome.org/site/assets/files/5182/pm2_-_svi_recommendation_-_approved_sept2020.pdf
- [12] Ghosh R, Harrison S M, Rehm H L, et al. Updated recommendation for the benign stand-alone ACMG/AMP criterion[J]. *Human mutation*, 2018, 39(11): 1525-1530.
- [13] https://www.clinicalgenome.org/site/assets/files/3717/svi_proposal_for_pm3_criterion_-_version_1.pdf
- [14] Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution[J]. *science*, 1974, 185(4154): 862-864.
- [15] Biesecker L G, Byrne A B, Harrison S M, et al. ClinGen guidance for use of the PP1/BS4 co-segregation and PP4 phenotype specificity criteria for sequence variant pathogenicity classification[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2024, 111(1): 24-38.
- [16] Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Hum Mutat*. 2018 Nov;39(11):1593-1613.
- [17] Gene Clinical Validity Curation Process. Standard Operating Procedure (version 6). August 2018. The Clinical Genome Resource Gene Curation Working Group
- [18] Pejaver V, Byrne A B, Feng B J, et al. Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2022, 109(12): 2163-2177.

[19] Biesecker L G, Harrison S M. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants[J]. *Genetics in Medicine*, 2018, 20(12): 1687–1688.

[20] Tavigian S V, Harrison S M, Boucher K M, et al. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines[J]. *Human mutation*, 2020, 41(10): 1734–1737.
