

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

## 编制说明

### 一、工作简况

#### 1.任务来源

2020 年 11 月，由深圳市标准化协会批准《基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良的应用规范》立项。本标准由深圳华大基因股份有限公司提出，由深圳市标准协会归口，起草工作组由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共同组成。

#### 2.编制背景、目的和意义

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。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 基因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* 长达 2300 kb，是人类最大的编码基因之一，且致病突变谱复杂分散，临床常需组合使用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(NGS)等技术，需多个阶段序贯检测才能实现对 *DMD* 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

单一检测平台上实现对 DMD/BMD 患者和女性携带者大片段缺失/重复和点突变的检测。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，因此急需建立一份标准为其应用提供指导。本标准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。

### 3. 简要编制过程

#### 3.1. 前期准备和起草阶段

标准起草工作组通过查阅国内外文献、技术调研、专家咨询，收集、消化整理有关资料，并结合具体临床应用的经验和实际需求为主要参考依据，于 2020 年 10 月提出编制团体标准《基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良的应用规范》的计划。经与标准起草工作组主要成员研究，决定由深圳华大基因股份有限公司和中国罕见病联盟 Duchenne/Becker 型肌营养不良学组主要成员主编，其它单位共同参与起草，于 2020 年 11 月初上报团体标准《基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良的应用规范》立项申请书。2020 年 11 月 25 日，深圳市标准协会批准《基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良的应用规范》的立项。

立项通过后，起草工作组成员加快标准编制工作节奏，着手开展标准的编制工作并组织多次线上会议，对标准的框架，细节进行了讨论，标准的内容综合了多方专家意见，于 2020 年 12 月上旬完成标准草案的编写。2020 年 12 月下旬开始，起草单位专家经线上会议讨论对标准草案的语言与格式等进行了修订，规范，于 2021 年 2 月 完成了征求意见稿。

#### 3.2. 征求意见阶段

起草工作组将征求意见稿于 2021 年 3 月进行广泛征求意见，主要方式是：将标准编制说明和征求意见稿通过全国团体标准平台发布公示，面向相关行业领域的单位和个人征求意见。同时，将征求意见稿发送给各单位的专家，征求意见和建议。

## 二、制标原则/依据和主要内容

### 1.制标原则/依据

#### 1.1 依法原则

即以现行法律法规的规定和相关标准为基础。本标准中的约束性条款首先应与这些法律法规、强制性标准的要求保持一致，并在必要情况下予以细化和延伸，但总体上不得有悖于法律法规和强制性标准的要求。

#### 1.2 实用性原则

标准的编写结合了目前临床对基于单一平台实现 *DMD* 基因多种变异类型检测的需求，为基于高通量测序技术检测 *DMD* 基因变异在疑似患者辅助诊断、携带者检测中的应用提供了参考标准和路径，便于推广。

#### 1.3 科学性、前瞻性

基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良基因变异的应用规范的制定，对该技术在临床上的应用具有重要指导作用。基于该技术检测 *DMD* 基因变异经过了大量真实样本的验证，证实了其检测变异的准确性及其适用性和其优势，其后续在临床上的应用将会降低因传统序贯检测中的中途失访或因医疗费用增加而致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，具有一定的科学性和前瞻性。

## 2.主要内容

本标准规范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、标准化实验流程、标本的质量评估标准、受检者资料和样本保存、实验操作的标准要求、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。

## 三、国内外相关研究依据、技术标准

*DMD* 基因变异类型主要为大片段缺失或重复（占比 70%左右）、点突变或小的插入或缺失（占比 25%左右）。目前国内外关于 *DMD* 基因变异检测的方法主要为多重连接依赖式探针扩增法（MLPA）、sanger 测序法和高通量测序法。MLPA 方法主要用于检测 *DMD* 基因大片段缺失或重复，具有高的灵敏性和特异

性，但是不适用于检测未知的点突变或小的插入或缺失变异。对于采用 MLPA 方法未检出大片段缺失重复的样本，一般采用 Sanger 测序法对可能的点突变或小的插入或缺失变异进行检测，但是由于 DMD 基因比较大，需要多对 PCR 引物对 DMD 基因进行扩增，技术难度大且实验操作繁琐，并且很难实现对整个 DMD 基因的测序，使得 DMD 基因诊断过程中留下了较多的空白点。而高通量测序技术不仅可以实现对 DMD 基因整个区域内变异的检测，而且随机技术和算法的优化与改进，基于该技术可以实现对 DMD 基因大片段缺失或重复的检测，即可以一步法实现对 DMD 基因点突变或小的插入或缺失、大片段缺失或重复变异的检测，具有更高的临床实用性。目前国内外均无高通量测序技术用于检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良应用的标准或指导性文件。

#### 四、标准中涉及的专利

无

#### 五、产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果等情况

DMD 作为罕见病之一，目前尚无彻底治愈的方法，需随着疾病进展调整治疗侧重点，通过长期用药、定期复查，适当进行康复训练，适时应用矫形器、呼吸辅助设备、正确应用轮椅等等，希望能最大程度提高生存质量，延长寿命。但这一过程也无疑是给 DMD 患者家庭带来沉重的经济负担和心理负担。

DMD 患者的用药负担以 FDA 批准 Deflazacort(地夫可特)激素类药物为例，2019 年此药获得批准用于 2 岁至 5 岁之间的杜氏肌肉营养不良症(DMD)患者。最新的定价为 35,000 美元一年，约合人民币 248,500 元一年。除了地夫可特，还有其他三个国外获批治疗 DMD 的新药，这些新药是针对携带特定 DMD 基因变异的患者，价格暂未确定。由此可见，DMD 患者家庭不仅要承担高昂的治疗费用，家庭成员的陪护误工费等更是增加了家庭的负担。按照我国约有 7~9 万例患者估算，如果按照 50%的疑似 DMD 患者接受基因检测，考虑三分之二患者是由遗传自母亲的变异所致，按照其阳性检出率 65%计算，这些患者每年仅地夫可特的用药费用约节省经济负担约 3.39 亿。

采用高通量测序技术，在疑似 DMD 患者辅助诊断、携带者检测中一步法实现对 DMD 基因变异检测更加经济，便于推广，能有效达到降低出生缺陷的目的。同时也能有效提高有家族病史的育龄夫妇对遗传病防治和优生优育的知识知晓

率，增强在孕前阶段预防孩子患 DMD 遗传疾病的意识，并能进一步发现和记录 DMD 病发病以及流行病学数据，为 DMD 遗传病的预防、筛查、治疗及干预管理提供科学参考。

## 六、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况

目前，基于高通量测序技术检测 *DMD* 基因变异已广泛应用于 *DMD* 疑似患者的临床辅助诊断，但是国内外仍然缺乏一套标准体系以规范高通量测序技术应用于 *DMD* 基因变异检测的基本要求方法。

### 1、国际情况

基因组质量评估 Genomic Quality Assessment (GenQA)联合欧洲分子遗传学质量网络 (EMQN) 发表了关于假肥大肌营养不良基因检测的最佳实践指南[1]。

Polavarapu 等人采用 MLPA 与高通量测序相结合的技术对 606 个 Duchenne /Becker 型肌营养不良家系进行遗传检测[2]。

Okubo 等人对基于高通量测序技术检测 *DMD* 基因变异的性能进行了验证，在测试的 67 例患者样本中，37 例样本中检出大片段缺失或重复，30 例样本中检出点突变或小的缺失或插入。和 MLPA 或 sanger 方法检测结果相比，所有的大片段缺失与点突变或小的缺失或插入均检出，检出 50% 大片段重复，相对于 MLPA 70% 的诊断率与 sanger 测序法 30% 的诊断率，高通量测序技术的诊断率为 92%[3]。

### 2、国内情况

目前国内无基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良的应用规范，但是已有多篇报道采用该技术用于 *DMD* 疑似患者的临床诊断：

Kong 等人采用 MLPA 与高通量测序相结合的技术对 1051 个 Duchenne /Becker 型肌营养不良家系进行遗传检测[4]。

Wei 等人采用高通量测序技术对 89 例 *DMD* 患者、18 例携带者和 245 非 *DMD* 患者进行基因检测，和传统的方法相比较，高通量测序检测大片段缺失或重读的灵敏性和特异性分别为 99.99% 和 98.96%，检测点突变或小的缺失或插入变异的灵敏性和特异性均为 100%[5]。

Bai 等人采用 MLPA 与高通量测序相结合的技术对 433 个 Duchenne

/Becker 型肌营养不良家系进行遗传检测[6]。

已发布的国际指南没有针对基于高通量测序技术检测 Duchenne /Becker 型肌营养不良基因变异进行系统的规定。并且多数文献报道采用 MLPA 与高通量测序相结合的方法对患者进行遗传诊断,但是也有报道对基于高通量测序技术检测 *DMD* 基因变异的性能进行了验证,并证实了基于高通量测序技术对 *DMD* 患者遗传诊断的优势和临床价值。

## 七、与现行相关法律、法规、规章及相关标准,特别是强制性标准的协调性

本标准从我国基于高通量测序技术检测 *DMD* 基因变异应用于 *DMD* 疑似患者的临床辅助诊断的实际情况出发,参考了国内外相关资料,体现了科学性、先进性和可操作性原则,在制定过程中充分考虑国内相关的法规要求,与相关标准法规包括强制性标准协调一致。

## 八、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程中无重大分歧意见。

## 九、标准的属性

本标准属于推荐性标准。

## 十、贯彻标准的要求和措施建议

在本标准通过审核、批准发布之后,由相关部门组织力量对本标准进行宣贯,在行业内进行推广。建议本标准自发布 6 个月之后开始实施。

## 十一、废止现行相关标准的建议

无。

## 十二、其它应予说明的事项

该标准基于临床上常用的 *DMD* 基因变异检测方法存在的局限性,以及从实际临床应用情况出发,参考了国内外相关资料,体现了科学性、先进性和可操作性原则,综合评定达到了国际水平。

## 参考文献

[1] Fratter C, Dalgleish R, Allen SK, et al. EMQN best practice guidelines for genetic testing in dystrophinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2020 Sep;28(9):1141-1159.

- [2] Polavarapu K, Preethish-Kumar V, Sekar D, et al. Mutation pattern in 606 Duchenne muscular dystrophy children with a comparison between familial and non-familial forms: a study in an Indian large single-center cohort. *J Neurol*. 2019 Sep;266(9):2177-2185.
- [3] Okubo M, Minami N, Goto K, et al. 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.
- [4] Kong X, Zhong X, Liu L, et al. Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *BMC Med Genet*. 2019 Aug 14;20(1):139.
- [5] Wei X, Dai Y, Yu P, et al. 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.
- [6] Bai Y, Li S, Zong YN, et al. Mutation screening of 433 families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2016 Apr 26;96(16):1261-9.