

· 指南与共识 ·

胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识



扫一扫下载指南原文

《胚胎植入前遗传学诊断/筛查专家共识》编写组

中国妇幼保健协会生育保健专业委员会；中国医师协会生殖医学专业委员会；中国医师协会医学遗传学分会；中国遗传学会遗传咨询分会；中国妇幼健康研究会生殖内分泌专业委员会编写组成员名单：

黄荷凤(上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院)、乔杰(北京大学第三医院)、刘嘉茵(南京医科大学第一附属医院)、陈子江(山东大学附属生殖医院)、曹云霞(安徽医科大学第一附属医院)、邬玲仟(中南大学湘雅医院)、金帆(浙江大学医学院附属妇产科医院)、林戈(中信湘雅生殖与遗传专科医院)、刘平(北京大学第三医院)、朱依敏(浙江大学医学院附属妇产科医院)、高媛(山东大学附属生殖医院)、徐晨明(上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.02.001

【摘要】 随着辅助生殖技术临床开展规模的日益扩大,以及细胞及分子遗传学诊断技术的快速发展,胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis,PGD)和植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening,PGS)技术迎来了快速的增长和发展。为使该项技术更加规范且有效地实施,力求临床诊断的精准和出生子代的安全,经中国妇幼保健协会生育保健专业委员会、中国医师协会生殖医学专业委员会、中国医师协会医学遗传学分会、中国遗传学会遗传咨询分会和中国妇幼健康研究会生殖内分泌专业委员会专家讨论,结合国际发展动态和国内临床应用的实际情况,达成以下临床和实验室专家共识。

【关键词】 胚胎植入前遗传学诊断; 胚胎植入前遗传学筛查; 专家共识

随着辅助生殖技术临床开展规模的日益扩大,以及细胞及分子遗传学诊断技术的快速发展,胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis,PGD)和植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening,PGS)技术迎来了快速的增长和发展。为使该项技术更加规范且有效地实施,经中国妇幼保健协会生育保健专业委员会、中国医师协会生殖医学专业委员会、中国医师协会医学遗传学分会、中国遗传学会遗传咨询分会和中国妇幼健康研究会生殖内分泌专业委员会专家讨论,结合国际发展动态和国内临床应用的实际情况,达成以下临床和实验室专家共识。

第一部分 PGD/PGS 的临床流程与质控

1 适应证和禁忌证

1.1 PGD 的适应证

1.1.1 染色体异常 夫妇任一方或双方携带染色体结构异常,包括相互易位、罗氏易位、倒位、复杂易位、致病性微缺失或微重复等。

1.1.2 单基因遗传病 具有生育常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、X 连锁隐性遗传、X 连锁显性遗传、Y 连锁遗传等遗传病子代高风险的夫妇,且家族中

的致病基因突变诊断明确或致病基因连锁标记明确。

1.1.3 具有遗传易感性的严重疾病 夫妇任一方或双方携带有严重疾病的遗传易感基因的致病突变,如遗传性乳腺癌的 BRCA1、BRCA2 致病突变。

1.1.4 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)配型 曾生育过需要进行骨髓移植治疗的严重血液系统疾病患儿的夫妇,可以通过 PGD 选择生育一个和先前患儿 HLA 配型相同的同胞,通过从新生儿脐带血中采集造血干细胞进行移植,救治患病同胞。

1.2 PGS 的适应证 近期高通量遗传检测技术(PGS 2.0 版)的研究和发展,对 PGS 的临床意义提出了新的质疑,包括不同程度和部位胚胎染色体异常嵌合型的存在、临床检测技术的精准性、对移植胚胎的选择和放弃的标准、PGS 的活产率计算方式及其应用价值等,提示 PGS 的循证证据尚需进一步的研究和验证,其指征也面临修正和更新。目前 PGS 可应用于以下几个方面:

1.2.1 女方高龄(advanced maternal age,AMA) 女方年龄 38 岁及以上。

1.2.2 不明原因反复自然流产(recurrent miscarriage,RM) 反复自然流产 2 次及以上。

1.2.3 不明原因反复种植失败(recurrent

implantation failure, RIF) 移植 3 次及以上或移植高分卵裂期胚胎数 4~6 个或高分囊胚数 3 个及以上均失败。

1.2.4 严重畸精子症

1.3 PGD 的禁忌证 有以下情况之一者,不得实施 PGD 技术:

1.3.1 目前基因诊断或基因定位不明的遗传性疾病。

1.3.2 非疾病性状的选择,如性别、容貌、身高、肤色等。

1.3.3 其他不适宜实施 PGD 的情况。

1.4 其他几种特殊情况

1.4.1 性染色体数目异常,如 47, XYY、47, XXX 等,产生性染色体异常后代的几率较低^[1-2],不建议实施 PGD;而 47, XXY 生育后代染色体异常风险增加^[3],可酌情考虑是否实施 PGD。

1.4.2 对于常见的染色体多态,如 1qh+、9qh+、inv(9)(p12q13)、Yqh+ 等,不建议 PGD。

2 遗传咨询和知情同意

患者夫妇在选择实施 PGD/PGS 前,需要接受至少一次的遗传咨询,使其充分了解自身的生育和遗传风险,知晓现阶段可能的医学干预措施及其利弊,自愿选择治疗方式,并保存相关咨询记录资料。

2.1 病史采集及家系分析 包括收集患者及相关家系成员的原始临床资料及遗传检测结果,绘制系谱图;询问夫妇双方的疾病史、生育史、专科检查及健康评估结果;对于 HLA 配型者,需评估患儿目前的病情及诊治情况,判断其病情是否允许等待。

2.2 风险评估 结合家系调查和遗传检测结果,以及相关疾病的一般遗传发病规律,充分评估夫妇的再生育风险。

2.3 知情选择 根据评估的生育风险告知可能的干预措施,如产前诊断、PGD/PGS、配子捐赠等,以及现阶段不同干预技术方案的优缺点,让夫妇自愿选择生育干预措施。夫妇在选择 PGD/PGS 周期治疗前,需充分知晓整个过程中的各类风险,涉及常规体外受精的治疗过程、PGD/PGS 技术造成的胚胎活检、冷冻复苏损伤、个别胚胎可能诊断不明、检测后无可移植胚胎、染色体嵌合型胚胎发育潜能的不确定性、无法常规鉴别染色体结构异常的携带者、由于胚胎自身的生物学特性以及检测技术的局限性可能导致误诊的风险、以及若获得持续妊娠,需行产前诊断确诊等。

3 胚胎移植

3.1 行 PGD/PGS 检测后的胚胎,建议行单胚胎移

植。

3.2 当本周周期无完全正常的可移植胚胎时,患者经遗传咨询和知情同意后,可自愿选择移植非整倍体嵌合体异常胚胎^[4],并依顺序优先选择移植不良风险较小的嵌合型胚胎。

3.3 在对单基因疾病实施 PGD 时,携带致病基因突变但很可能不发病的胚胎可作为备选移植胚胎。

3.4 可选择新鲜周期移植或者复苏周期移植。

4 随访

PGD 胚胎移植后获得持续妊娠者,需进行侵入性产前诊断。现阶段不建议采用无创产前筛查的方法,并应随访妊娠的结局以及新生儿的情况。

5 临床质控

5.1 夫妇在进入 PGD/PGS 治疗周期前,需接受至少一次遗传咨询,并保存完整的咨询记录、知情同意书和病案记录。

5.2 确定接受 PGD/PGS 周期治疗的夫妇的临床指征合理且充分。

5.3 PGD 获得持续妊娠者,产前诊断结果与胚胎检测结果符合率 > 98%。

5.4 对 PGD/PGS 的临床结局分析,建议使用活产率/每起始周期的统计方法。

第二部分 胚胎实验室的显微操作与质控

1 授精方式的选择

1.1 卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) PGD/PGS 周期建议采用 ICSI 授精方式,以最大限度地减少母源颗粒细胞和父源精子对下游遗传学检测准确性的干扰,特别是下游检测拟采用核酸扩增技术者。

1.2 常规体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 使用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 方法进行胚胎遗传学检测时,也可采用 IVF 授精后形成的囊胚,但应警惕精子和其他细胞核的污染。

2 活检的时机

2.1 极体活检 通过极体活检进行 PGD/PGS,可分析判定母源遗传信息。

2.1.2 第一极体活检:可在取卵后实施,也可在 ICSI 后 0.5~2 h 进行。

2.1.3 第二极体活检:在 ICSI 后 8~14 h 第二极体排出后进行。

2.1.4 在 ICSI 受精后 8~14 h 内,可同时活检获取第一极体和第二极体。

2.2 卵裂期活检 卵裂期活检一般在授精后 66~70 h 进行,对此时发育至 6~8 细胞、碎片含量 < 30% 的胚胎进行活检。通常活检 1 个卵裂球,最多不超过 2 个。在卵裂期活检后,胚胎仍可继续生长发育 2~3 天,成为囊胚。在该时间段内若能完成胚胎遗传学诊断,则可实行新鲜周期移植。

2.3 囊胚活检 囊胚活检对胚胎发育的潜力影响较小,已成为目前 PGD/PGS 的主要活检方式。囊胚期活检是在授精后第 5~6 天、囊胚充分扩张后进行。建议活检囊胚评分应在 4BB 以上,活检细胞数以 5~10 个为宜。通常囊胚活检后的胚胎需立即冷冻保存,待胚胎遗传学分析完成后,择期对结果正常的胚胎进行复苏移植。

3 胚胎活检

3.1 透明带打孔

3.1.1 透明带打孔的方法有机械法、Tyrodes 酸法和激光法。目前激光法更为常用,在活检时应尽量避免对细胞造成热损伤。

3.1.2 机械法打孔和激光法可以用于授精前的极体活检, Tyrodes 酸法可能对纺锤体产生不利影响。

3.1.3 卵裂期或囊胚期活检可以采用机械法、Tyrodes 酸法和激光法。

3.1.4 囊胚活检的透明带打孔可以在授精后第 3 天、第 5 天、活检前 4 h 或活检时进行。

3.2 活检细胞的数目 应根据遗传检测的要求,单独或同时移取第一或第二极体;卵裂期活检应移取 1~2 个细胞。若需移取 2 个细胞,则活检胚胎应包含 ≥ 6 个细胞;囊胚活检采集的滋养细胞数目应控制在 5~10 个。

3.3 二次活检 反复活检将影响胚胎的发育潜力。但在首次活检诊断不明时,可以考虑二次活检(包括卵裂期胚胎和囊胚);如果胚胎活检后已冷冻,可以考虑复苏后再次活检^[5]。

3.4 选择活检的细胞 在卵裂期活检卵裂球时,应选择移取有核且为单核的细胞,囊胚活检应选择远离内细胞团的部位。

4 活检胚胎的冷冻

在等待 PGD/PGS 遗传学检测结果时,需要对活检后的胚胎进行冷冻保存。建议采用玻璃化冷冻技术,活检后的卵裂期或囊胚期的冷冻方法与常规胚胎冷冻方法相同。

5 活检样本的预处理

5.1 核酸扩增法检测的预处理 下游采用核酸扩增法进行遗传学检测者,活检所移取的细胞经过洗涤后应放入含有 2.5 μL 磷酸盐缓冲液(或遗传检测试剂盒所要求的预装试剂)的 PCR 管中,同时移取少许洗涤液到空白 PCR 管中作为空白对照。

5.2 FISH 检测的预处理 不同的细胞固定方法均可以获得满意的效果;在处理时应注意做好固定液的隔离防护措施。

6 胚胎活检实验室的质量控制

6.1 胚胎活检环境的质量控制

6.1.1 同 ICSI 体外胚胎操作实验室标准,在百级层流、37℃ 恒温、覆盖于无菌矿物油下的无菌培养液滴中进行。

6.1.2 为减少胚胎之间的相互污染,必须确保每个微滴中仅包含一个胚胎,活检针和活检材料转移吸管须无活检细胞成分的残留。

6.2 胚胎活检人员的质量控制 胚胎活检技术人员应具备熟练的 ICSI 操作经验,在操作中全程遵循严格的无菌原则,以防外源性污染。

第三部分 遗传实验室的遗传检测与质控

根据胚胎遗传检测的靶标,又可分为基因水平的检测和染色体水平的检测。

1 基因水平的检测

1.1 适用范围 经过规范的临床咨询,明确具有单基因遗传病高风险的夫妇;夫妻双方或之一携带有严重疾病明确的遗传易感基因致病突变;HLA 配型选择。

1.2 检测策略和原则要求

1.2.1 为避免因扩增失败、优势扩增、等位基因脱扣(allele drop-out, ADO)、样本污染等导致的误诊或诊断不明,建议 PGD 的胚胎基因检测应同时进行突变位点的直接分析和遗传多态位点连锁分析^[6-7]。

1.2.2 用于连锁分析的遗传多态位点可以是短串联重复序列(short tandem repeat, STR)或者单核苷酸多态位点(single nucleotide polymorphism, SNP)。

1.2.3 建议在致病突变位点上、下游 1 Mb 的范围内分别选择至少 2 个可提供遗传信息的多态位点,同时避免选择同源性高、相邻序列中 GC 含量高或有多聚核苷酸序列的 SNP 位点。

1.2.4 对于性连锁遗传病,建议加入性别指示位点的检测。

1.2.5 对于 HLA 配型者,用于连锁分析的遗传多态位点需要覆盖 HLA-A、HLA-B、HLA-DRA 和 HLA-DQB1 的上、下游,在每个区域中至少选择 5 个可提供遗传信息的多态位点。

1.2.6 在进行遗传多态位点连锁分析时,需注意突变位点附近的基因组重组。

1.3 检测方法

1.3.1 巢式 PCR 法 其中第一轮多重 PCR 应扩增多个目标位点(含突变位点以及连锁遗传的多态位点)。

1.3.2 全基因组扩增(whole genome amplification, WGA) 又可分为基于 PCR 原理和非基于 PCR 原理的扩增方法。WGA 扩增的产物可采用多种方法进行突变位点及遗传连锁位点的鉴定,包括荧光 PCR、Sanger 测序、单核苷酸多态微阵列芯片(SNP array)^[8-9]、高通量测序(next generation sequencing, NGS)^[6]以及联合检测等。

1.4 PGD 检测前的验证

1.4.1 在施行 PGD 前,需要在家系样本中对已知致病突变进行验证。

1.4.2 应选择突变位点上、下游的多态位点,在家系样本中进行连锁分析,从中选择能够提供遗传信息的位点建立单体型图。

1.4.3 在单个细胞水平验证 PGD 检测方案的有效性

1.4.3.1 在实施 PGD 检测前,需要在单个细胞上验证方案的有效率,评估目标检测位点扩增的有效性以及 ADO 率。

1.4.3.2 验证样本可以是淋巴细胞、颗粒细胞、口腔粘膜细胞、胚胎细胞等,应注意来源的细胞可能影响扩增的效率和 ADO 率。

1.4.3.3 采用卵裂期活检者,每份验证样本应包含 1 个细胞;采用囊胚活检者,每份验证样本应包含 4~10 个细胞。

1.4.3.4 若采用直接 PCR 扩增法,建议在 50 份验证样本(可能的话,包括携带有致病突变的细胞以及正常细胞)中进行预验证检测。

1.4.3.5 采用 WGA 法进行第一步扩增者,建议至少在 10 份验证样本中进行预验证检测。

1.4.3.6 扩增效率应 $>90\%$,ADO 率应 $<10\%$ 。若 ADO 率较高,可适当增加上、下游的连锁遗传多态位点进行分析^[10]。

2 染色体水平的检测

2.1 适用范围 夫妻双方或之一携带有染色体异常;医疗目的的性别选择;胚胎植入前的非整倍体筛查。

2.2 检测策略和原则要求

2.2.1 对于夫妻双方或之一携带有染色体异常者,PGD 可以仅针对异常染色体进行检测,也可同时分析其他染色体的数目异常。

2.2.2 性别选择可以用于基因诊断不明的性连锁遗传病。但对于基因诊断明确的家系,建议进行突变基因分析,不建议单纯进行性别选择。

2.2.3 对于 Y 连锁单基因疾病,可仅进行性别选择。

2.2.4 对于染色体结构易位,PGD 检测可不鉴别携带者。有条件的实验室可以提供携带者检测,但需要充分评估检测所采用的技术。

2.2.5 对于胚胎非整倍体筛查,建议采用能够同时分析所有染色体数目异常的方法(comprehensive chromosome screening, CCS),不建议采用 FISH 技术。

2.3 检测方法

2.3.1 核酸扩增法

2.3.1.1 巢式 PCR 法 首轮多重 PCR 应同时扩增目标染色体的特异性位点,第二轮定量 PCR 应进行各染色体位点拷贝数分析^[11]。

2.3.1.2 WGA 结合高通量遗传检测技术 在 WGA 检测后,可采用多种高通量遗传检测技术进行染色体拷贝数检测,如微阵列比较基因组杂交(array CGH)^[12-13]、单核苷酸多态微阵列芯片(SNP array)^[14-15]、高通量测序(NGS)^[16-17]等。

2.3.2 FISH 检测 应针对检测的目标染色体,选择不同的核酸探针。在检测染色体易位携带者所产生的胚胎时,所选的探针组合需要能够识别所有可能的易位相关的染色体不平衡胚胎。当染色体易位片段较小、超出高通量遗传学检测技术的有效分辨率时,应优先选择 FISH 检测。

2.4 临床实施 PGD/PGS 前对于方案有效性的验证

2.4.1 array CGH、SNP array、NGS 等技术已有商品化试剂盒,具有标准化的操作流程和质控参数,本地实验室在首次临床应用前,需验证检测平台的有效性和稳定性。通常无需对每个病例进行临床前预实验。

2.4.2 采用 FISH 进行染色体拷贝数分析,需提前验证患者夫妇外周血中期染色体的核型,同时在间期核上检测分析探针的荧光强度及特异性。

3 质量控制

各临床 PGD/PGS 实验室应根据自身的条件和特色,自主选择检测技术平台。各种检测方法均需建立标准操作规程(standard operating procedure, SOP)。不同的检测技术平台应根据具体流程的需要,在实验关

键环节设置质控参数。本指南仅对 PGD 实验室的一般质控措施提出以下建议:

- 3.1 采用核酸扩增法进行 PGD/PGS 检测的实验室需严格遵照《临床基因扩增实验室工作规范》的一般原则。
- 3.2 胚胎活检的细胞及其在整个检测流程中需具有清晰且唯一的编号,与胚胎一一对应。
- 3.3 采用核酸扩增法进行 PGD/PGS 检测时,首次扩增步骤需要设置细胞洗涤液空白对照以及扩增试剂空白对照以评估可能的污染及来源。
- 3.4 各种检测技术需均建立 SOP 文件并遵照执行,并及时评估更新。
- 3.5 对于采用商品化试剂盒检测技术如 array CGH、SNP array、NGS 等,需建立适用于本地实验室的 SOP 程序和质控方法。
- 3.6 所有实验操作过程中需要严格的双人核对,实时记录并签字。
- 3.7 检测结果数据需要两人独立分析判读,最后由第三人审核判断。未达成一致意见的胚胎应判读为诊断不明。PGD 中诊断不明的胚胎不建议移植。
- 3.8 应定期开展室内比对和室间比对质控,并做好记录。

4 检测报告

PGD/PGS 报告需包括患者夫妇的姓名、年龄、检测指征、胚胎编号、胚胎活检阶段、活检日期、检测方法和项目、检测结果、检测者、审核者、报告日期及备注说明。除医疗目的性别鉴定外,报告不准提示胚胎的性别。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, et al. A review of trisomy X (47,XXX)[J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 8. DOI: 10.1186/1750-1172-5-8.
- [2] Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization[J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 887-892.
- [3] Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, et al. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(4): 319-330.
- [4] Sachdev NM, Maxwell SM, Besser AG, et al. Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism[J]. Fertil Steril, 2017, 107(1): 6-11. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.006.
- [5] Zhang S, Tan K, Gong F, et al. Blastocysts can be rebiopsied for preimplantation genetic diagnosis and screening[J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1641-1645. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.018.
- [6] Yan L, Huang L, Xu L, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(52): 15964-15969. DOI: 10.1073/pnas.1523297113.
- [7] Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E, et al. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping—a paradigm shift for embryo diagnosis[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 13(1): 110-119.
- [8] Handside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes[J]. J Med Genet, 2010, 47(10): 651-658. DOI: 10.1136/jmg.2009.069971.
- [9] Handside AH. Live births following karyomapping - a “key” milestone in the development of preimplantation genetic diagnosis [J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(3): 307-308. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.07.003.
- [10] Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD [J]. Hum Reprod, 2011, 26(1): 33-40. DOI: 10.1093/humrep/deq231.
- [11] Treff NR, Tao X, Ferry KM, et al. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening[J]. Fertil Steril, 2012, 97(4): 819-824. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.01.115.
- [12] Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization[J]. Hum Reprod, 2011, 26(7): 1925-1935. DOI: 10.1093/humrep/der082.
- [13] Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J, et al. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening[J]. Reprod Biomed Online, 2008, 17(6): 841-847.
- [14] Tan YQ, Tan K, Zhang SP, et al. Single-nucleotide polymorphism microarray-based preimplantation genetic diagnosis is likely to improve the clinical outcome for translocation carriers[J]. Hum Reprod, 2013, 28(9): 2581-2592. DOI: 10.1093/humrep/det271.
- [15] Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, et al. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients [J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 638-640. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.049.
- [16] Wang L, Cram DS, Shen J, et al. Validation of copy number variation sequencing for detecting chromosome imbalances in human preimplantation embryos[J]. Biol Reprod, 2014, 91(2): 37. DOI: 10.1095/biolreprod.114.120576.
- [17] Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts[J]. Biol Reprod, 2013, 88(3): 69. DOI: 10.1095/biolreprod.112.106211.

(收稿日期:2017-11-28)

(本文编辑 李岭)