



SMN1基因外显子缺失检测试剂的临床价值及相关产品审评情况

发布时间：2018-09-04

（原创 2018-09-04 CMDE 中国器审）

脊髓性肌萎缩症（spinal muscular atrophy, SMA）是一种常染色体隐性遗传病，居儿童致死性常染色体隐性遗传病的第 2 位。位于染色体 5q11.2~q13.3 上的运动神经元存活基因（Survival motor neuron, SMN）是 SMA 的主要致病基因。

人基因组有两个紧邻的高度同源的 SMN 基 因：端粒侧的 SMN1 和着丝粒侧的 SMN2，两者仅有 5 个碱基不同。SMN1 是主要功能基因，该基因突变可导致 SMA 发病，SMN2为临床表型的调节基因，影响病情的严重程度，其拷贝数增加可减轻SMA 表型。目前已知约 94%的 SMA患者为 SMN1 基因第 7 和（或）第 8外显子纯合缺失所致，少数病例可由SMN1 基因点突变或小的缺失引起。

SMN1 基因外显子缺失检测在 SMA 诊断中的意义

SMA 以脊髓前角运动神经元退化变性为特征，临床表现为进行性、对称性四肢近端和身体躯干肌肉无力、萎缩和瘫痪。根据发病年龄和肌无力严重程度，临床上将 SMA 分为 I、II 和III型，即婴儿型、中间型和少年型，严重程度依次递减。一般的，神经专科医生根据发病年龄、临床表现及病情进展程度进行临床诊断，辅助检查方法包括肌电图、肌酶和肌肉活检，结合家族史和 SMN1 基因分析可进行确诊。肌电图是定位诊断，特异度不高；肌酶在鉴别其他肌无力疾病中有参考意义，但对 SMA诊断无特异性；肌肉活检由于取材的创伤性，患儿不易接受。由于 SMA患儿中约 94% 为 SMN1 基因外显子纯合缺失，因此 SMN1 基因缺失检测对于 SMA 的诊断具有更高的灵敏度和特异性，且对不同型的 SMA 患者，SMN1 纯合缺失率没有显著差异，也就是说 SMN1 纯合缺失的检测对于不同型 SMA 患者具有相同的临床诊断价值；同时与有创的组织学诊断相比，基因检测更易被接受。事实上，在欧美人群中，SMN1 基因纯合缺失检测已成为诊断和排除诊断 SMA 的首选方法。

SMN1 基因外显子缺失检测在产前诊断和筛查中的意义

SMA 在 人 群 中 的 发 病 率 为 1/5 000~1/10 000，群体携带者频率为 1/35~1/50，是出生缺陷的高危因素。由于该病严重危害人类健康，且基因位点明确，因此极有必要进行SMA 携带者的人群筛查。通过 SMN1基因外显子杂合缺失突变的检查可确认无症状的携带者。当夫妻双方均为携带者时，可对其进行遗传咨询，评估生育患儿的遗传风险，并可以通过产前诊断技术降低人群中 SMA 患儿的出生率。在欧美等国家很早就建议在普通人群中进行 SMA 携带者的筛查。

但在 SMA 患儿临床诊断和 SMA携带者筛查中，对 SMN1 基因外显子缺失检测的要求是截然不同的，前者仅需准确检测出 SMN1 基因外显子纯合缺失，后者则需要鉴别 SMN1 基因外显子杂合缺失。

SMN1 基因缺失检测试剂的现状

目前，SMN1 基因外显子缺失检测试剂较为缺乏。临床检验实验室较为公认的方法是 PCR 结合限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）的方法，但该方法操作较为繁琐，且重复性差，不利于标准化，不易推广。这种方法只能检测出纯合缺失，无法确认杂合缺失。

荷兰的 SMA MLPA 检测试剂可对待测靶序列进行半定量分析，因此既可检测纯合缺失，亦可确认杂合缺失。在国内外已有多篇文献报道采用该方法进行 SMA 患者诊断和 SMA 携带者筛查。但该产品目前仍为“仅用于研究”的试剂，尚未按照体外诊断类医疗器械上市（98/79/EC）。

2015 年底，CFDA 批准了第一项SMN1 缺失突变检测试剂上市。该产品采用多重实时荧光 MGB-TaqMan探针 PCR 法，以人基因组单拷贝基因 RPP40 为内参基因，对 SMN1 基因第 7 外显子和第 8 外显子拷贝数进行相对定量检测，用于脊肌萎缩症（SMA）患者的体外辅助分子诊断。SMN1 基因外显子缺失检测的难点之一在于排除高同源性基因 SMN2 的干扰，特别是对于 SMN2 高拷贝数的受试者，需保证结果的准确可靠。该产品通过对实时荧光 PCR 相对定量、绝对定量技术进行系统整合，并在反应体系中加入特定化学组份，以抑制PCR 引物 3’端的胞嘧啶（C）与胸腺嘧啶（T）的错配，增加 PCR 扩增的特异性，从而有效控制 SMN2 基因非特异性扩增对检测结果的影响，准确检出高拷贝数 SMN2 样本中 SMN1基因第7外显子和第 8外的缺失情况。

鉴于国内外尚无任何按照体外诊断试剂批准上市的SMA 分子诊断产品，因此临床试验方案中依据 EMQN 关于《SMA 分子诊断最佳实践指南》，采用了国内外SMA 体外辅助分子诊断领域公认的PCR-RFLP 法作为对照方法。临床试验共完成 1069 例，其中正常对照组777 例，SMA 病例组 292 例，统计分析结果显示申报产品与对比方法检测结果的一致性为 100%（95% 置信区间：99.66%-100%）。此外，9747例正常成年人大大样本中目标外显子△△ Ct 分布范围的调查亦显示，该产品的纯合突变判断阈值设置合理。

该试剂目前批准的预期用途仅包含纯合缺失的检测，尚不能用于杂合缺失的检测。因此无法用于 SMA携带者的筛查。这是该产品的缺陷之一。但事实上该产品在设计上已考虑到 SMA 携带者的检测。该产品的检测原理是以待测样本中目标外显子荧光信号 Ct 值与内参基因荧光信号 Ct 值之差（ ΔCt_s ），与正常对照品三个梯度稀释品中目标外显子荧光信号 Ct 值与内参基因荧光信号 Ct 值之差的平均值（ ΔCt_a ）之差，即 $\Delta\Delta Ct$ ，作为待测样本中目标外显子拷贝数检测变量（ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_s - \Delta Ct_a$ ）。依据实时荧光定量PCR 相对定量的基本数学原理推导得到申报产品检测变量 $\Delta\Delta Ct$ 的计算公式，依据这一计算公式可推导出纯合缺失、杂合缺失和野生型的 $\Delta\Delta Ct$ 理论值（或范围）；再结合目标外显子与内参基因扩增效率差异以及 SMN2 不同拷贝数的影响，可对上述 $\Delta\Delta Ct$ 理论值进行优化；结果显示纯合缺失、杂合缺失和野

生型的△△ Ct 值（或范围）之间可设置合理的判断界值，因此理论上该产品可分别检测出三种基因状态。但鉴于生产企业对杂合缺失与野生型之间的判断界值研究尚不透彻，再加上缺乏可判定杂合缺失的对比方法等其他困难，本次注册申请的预期用途仅限于检测纯合突变，即 SMA 患者辅助诊断。

小结

综上，SMN1 基因外显子缺失检测在 SMA 疾病诊断和 SMA 携带者筛查中具有重要的临床价值。然而到目前为止，受到技术水平的限制，相关的体外诊断试剂比较缺乏，特别是可用于 SMA 携带者筛查的杂合缺失检测，尚无适合的体外诊断试剂上市。

参考文献：

- 【1】王佶等. 脊髓性肌萎缩症 SMN1 和SMN2 基因拷贝数变异分析. 中国循证儿科杂志 ,2013年03期.
- 【2】张文慧, 曹延延等. 运用 MLPA 技术分析脊髓性肌萎缩症患儿 SMN1 基因的部分缺失. 中华医学杂志, 2015. 95（6）.
- 【3】江雨, 周裕林, 脊髓性肌萎缩症SMN1 基因携带者筛查技术研究进展. 中国产前诊断杂志（电子版）2013, 5（02）： 34-39.

审评六部 何静云 供稿

