·指南与共识·

新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查与诊断实验室检测技术专家共识

扫一扫下载指南原文

国家卫生健康委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质评专家委员会
通信作者：邹琳，Email：zoulin74@126.com

基金项目：国家重点研发计划（2017YFC1001700，2018YFC1002200，2018YFC1002204）；重庆市科委社会与民生保障创新专项（Cstc2015shmszx120012）；重庆市教委科学技术研究项目（KJQN201800409）；国家自然科学基金（81870126）
DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2019.03.007

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症（glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency，G6PDd）因调控葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase，G6PD）基因突变导致其G6PD活性降低所致，属伴X连锁不完全显性遗传病。其发病常由误食蚕豆而诱发，故又称“蚕豆病”[1]。患者在感染、氧化应激、食物或药物诱发等情况下，可发生急性溶血性贫血、高胆红素血症，严重者可致核黄疸，甚至危及生命[2]。本病重在预防，通过新生儿疾病筛查及时发现G6PDd患者，避免接触食物、药物等诱发因素，是对该病进行预防的主要措施[3]。该病在广东、广西、海南等我国南方地区高发，且男性发病率高于女性[4]。

目前全国多个省份已将G6PDd列入新生儿疾病筛查常规项目，但不同实验室在筛查方法、筛查流程及确诊等检测技术方面还存在差异，标准不一。鉴于此，为规范新生儿G6PDd实验室检测技术与管理，国家卫健委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质评专家委员会组织专家经过多轮讨论，达成以下共识。

一、新生儿G6PDd筛查目标和对象及流程

（一）筛查目标

通过新生儿G6PDd筛查，早期发现G6PDd患儿，预防新生儿高胆红素血症，以及食物、药物、感染等因素所诱发的急性溶血性贫血，提升新生儿健康水平。

（二）筛查对象

出生72 h并且充分哺乳8次以上的新生儿。

（三）筛查流程

按照新生儿疾病筛查采血技术规范要求采集足跟血，测定干血滤纸片中G6PD酶活性。筛查阳性患儿应进一步接受实验室检查进行诊断，确诊患儿接受健康指导，进行疾病预防，已有症状的给予及时治疗[5]。推荐筛查流程见图1。

二、筛查及诊断实验室设置要求

临床实验室应符合《医疗机构管理条例》、《医疗机构临床实验室管理办法》和《医疗技术临床应用管理办法》的相关要求，以规范实验室管理，保障检验质量和实验室生物安全，保证临床诊断和治疗科学性、合理性[6-8]。此外，作为筛查及诊断实验室还应达到以下要求。

（一）G6PDd筛查实验室设置要求

新生儿G6PDd筛查实验室所在医疗机构资质、技术人员资质以及实验室的设置应符合《新生儿疾病筛查技术规范（2010）》的要求[9]。

（二）G6PDd诊断实验室设置要求

新生儿G6PDd诊断实验室在实验室人员设置、工作区域及仪器配置、数据解读、质量控制等方面应遵从《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的相关规定[10]。

三、新生儿G6PDd筛查

（一）筛查方法选择

G6PDd筛查通用技术包括高铁血红蛋白还原试验、硝基四氮唑蓝纸片试验、G6PD缺陷变性珠蛋白小体试验、荧光定量分析法。其中荧光定量分析法通量和自动化程度高，具有较高的特异度与灵敏度，被大多新生儿筛查实验室采用，是目前新生儿G6PDd筛查的推荐方法。

（二）荧光定量分析法检测原理及流程

检测原理：干血滤纸片样本G6PD作用于底物

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn

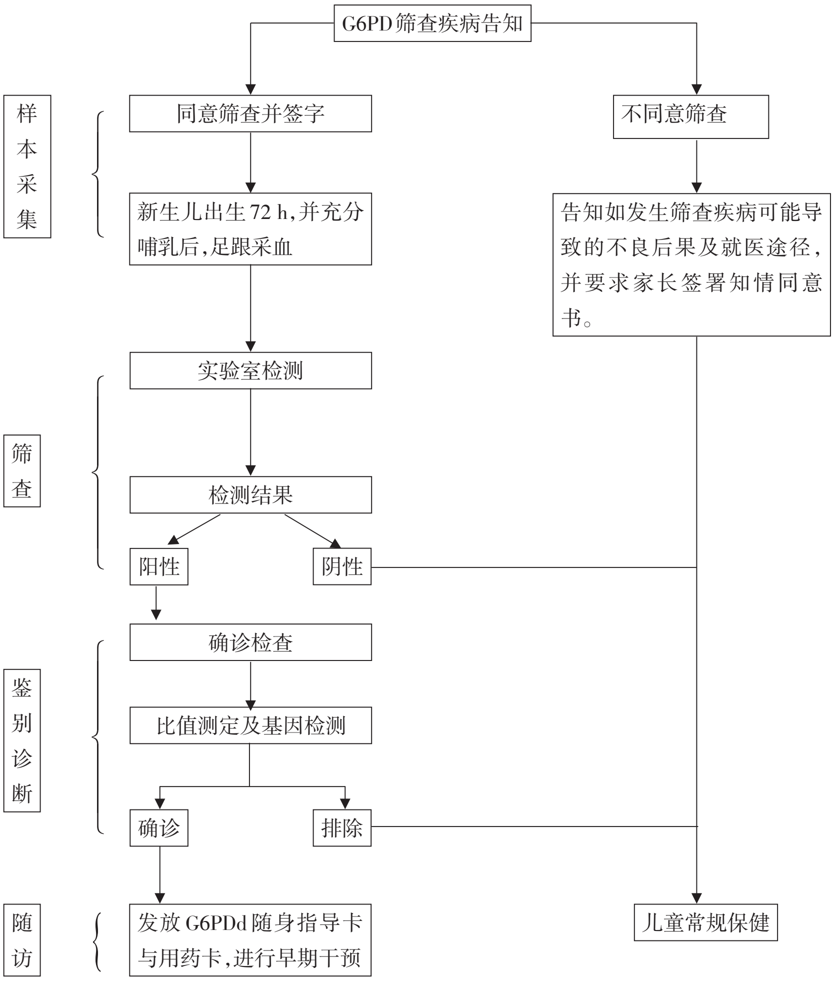

图1 新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查推荐流程

葡萄糖-6-磷酸及氧化型辅酶Ⅱ,将葡萄糖-6-磷酸氧化为6-磷酸葡萄糖酸,同时将氧化型辅酶Ⅱ还原为还原型辅酶Ⅱ,在特定激发波长(355 nm)和发射波长(460 nm)下检测还原型辅酶Ⅱ的荧光强度,可定量检测G6PD活性。

检测流程:按照商品化试剂盒说明书完成。

(三)检测程序的验证

筛查实验室应当对采用的检测系统的性能进行评估。评估结果与操作说明书一致,则认为其通过"验证",才可以用于临床服务。

性能验证时需包含精密度、准确度、线性范围等评价指标;其中批内不精密度和批间不精密度应分别小于最大允许误差(30%)的1/4和1/3[11];评价准确度时符合标准的检测值通过率应≥80%,达到国家卫健委临检中心室间质评的基本要求;线性范围评价时,对线性回归方程Y=aX+b及相关系数R^2的要求为,R^2≥0.95,a在0.97~1.03范围内。评价方法参见CLSI关于精密度(EP15-A,EP5-A)、准确度(EP9-A2)、线性范围(EP6-P)、干扰实验(EP7-P)等的评价指南[11]。

经过验证的检验程序或仪器,其标准操作规程发生变化、仪器被重新组装、发生严重检测失败事件采取重大纠正措施后,检验程序需要重新完成方法验证且结果达到要求、经实验室质量负责人确认后方能再次使用。

(四)结果判读

1. 阳性切值的设置:各实验室应参照试剂盒说明书及本实验室数据制定本地化的阳性切值,具体方法建议参考CLSI《关于临床实验室如何确定和建立生物参考区间的标准与指南》(CLSI-C28-A2:2000)[12]。

2. 推荐荧光定量分析法阳性切值:2.1~2.6 U/gHb;针对男、女新生儿设置不同切值有助于女性杂合子的检出;当检测结果大于切值(2.1~2.6 U/gHb)时,判读为正常;当检测结果小于切值(2.1~2.6 U/gHb)时,判读为异常;当检测结果等于切值或位于切值附近,应注意排除女性杂合携带者[13]。

四、G6PD缺乏症诊断

(一)G6PDd鉴别诊断技术及推荐流程

G6PDd新生儿疾病筛查阳性时,酶学水平的确诊采用G6PD/6GPD比值法;基因诊断建议采用多色熔解曲线分析法(multicolor melting curve analysis, MMCA)或DNA直接测序分析[14-15]。G6PDd鉴别诊断推荐流程见图2。

(二)G6PD/6GPD比值法诊断

1. 检测原理及流程:分别测定红细胞中G6PD与6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD)的活性;一定比例的硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)、吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate, PMS)和葡萄糖6-磷酸盐(glucose 6-phosphate, G6P)混合液用于测定G6PD活性;一定比例的NBT、PMS和6-磷酸葡萄糖酸混合液用于测定6PGD活性;两个反应分别在不同的试管内进行。反应原理均为催化其相应的底物反应,同时将NADP还原为NADPH,通过在650 nm处吸光度上升的速率,可计算两者活性,再计算两

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn

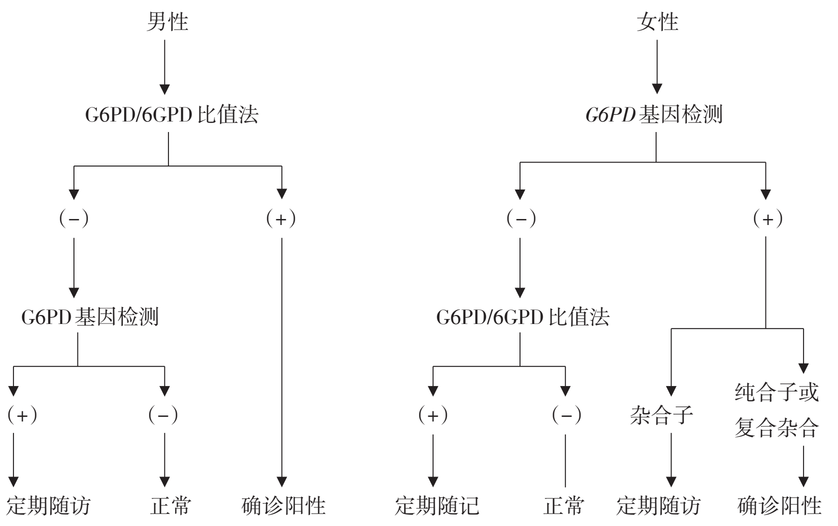

图2　新生儿G6PDd鉴别诊断推荐流程

者比值，可判断G6PD是否缺乏，提高女性杂合子检出率。检测流程参照商品化试剂盒说明书进行。

2. 结果判读：男性G6PDd患者和纯合子女性G6PDd患者在G6PD活性轻度降低甚至在正常下限的情况下，通过计算G6PD/6PGD的比值可以检出；但女性杂合子G6PD/6PGD的比值变化范围较大，在新生儿期G6PD/6GPD比值结果小于等于1.0时，结果可判断为异常；G6PD/6GPD比值结果在大于1.0小于等于1.3时判断为可疑，建议结合基因诊断结果进行综合判断；G6PD/6GPD比值结果大于1.3时为正常[1,5]。

3. 质量控制：(1)检验前：需要对样本是否溶血、凝血以及保存条件等质控指标进行监控。(2)检验中每次试验以已确诊标本作为阳性对照，以正常标本作为阴性对照，监控本批试剂的可靠性，并对仪器的状态进行监控。定期与开展本项目的实验室进行室间比对，以评估本实验室的检验能力。(3)检验后：监控报告发放时间及报告不合格率；定期评估报告与临床或基因诊断结果的符合度。

（三）G6PDd基因诊断

1.G6PDd推荐诊断方法：G6PD基因突变以单个碱基置换的错义突变为主。已报道的中国人群突变类型有40余种，其中c.1376 G>T、c.1388 G>A、c.95 A>G、c.871 G>A、c.1024 C>T五种突变类型占约95%；c.392 G>T、c.487 G>A、c.517 T>C、c.592 C>T、c.1004 C>A五种突变类型占约3.5%；其他类型偶发[14,16]。G6PD基因突变具有显著的地域差异，建议不同实验室根据本地区患者G6PD基因突变频率及实验室技术条件选择合适的基因诊断方法，见表1。

2. 测序报告解读：Sanger测序是DNA序列分析的金标准，但其准确率尚无法达到100%，部分碱基无法被Sanger测序所识别；基于高通量测序技术(next generation sequencing，NGS)技术的临床应用，应遵循国家卫生健康委医政医管局印发的《测序技术的个体化医学检测应用技术指南（试行）》[18]；NGS测序报告应由实验室专业技术人员、临床医学和生物信息学不同背景的人员共同完成；序列变异的解释建议参考美国医学遗传学与基因组学学院(American College of Medical Genetics and Genomics，ACMG)和美国分子病理协会(Association for Molecular Pathology，AMP)发布的临床NGS测序标准及致病性评定标准[19-21]；测序报告应明确标注检测方法、适用范围及局限性。

五、质量控制

表1　新生儿G6PDd推荐诊断方法

突变类型	推荐方法	方法原理	技术特点
热点突变分析	PCR-反向斑点杂交	将生物素标记的PCR产物与固定在膜上的特异寡核苷酸探针杂交，通过观察斑点杂交信号强弱判读结果	一次实验能实现对多个突变位点的同步检测；不能检出未知突变
热点突变分析	多色探针熔解曲线分析	采用四色荧光探针，根据靶序列和探针杂交体熔点变化检测G6PD基因突变	同时检测多种G6PD基因突变类型，覆盖98%以上患者的突变；不能检出未知突变[14]
DNA序列	Sanger测序	核苷酸在某一固定的点开始，随机终止在某一个特定的碱基处，且荧光标记每个碱基后面，产生以ATCG结束的4组不同长度的一系列核苷酸	准确性高、灵敏度较高、检测速度快、可检出未知突变；单次测序通量低
DNLA序列	高通量/新一代测序技术	边合成边测序，一次实验能并行测序几十万到几百万条DNA分子，无需电泳	通量高、灵敏度高、可检出未知突变；后续数据分析难度大[17]

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn

筛查实验室应建立适当的室内质控规则，以监控系统误差和随机误差：选择合适的质控品，做好质控记录，定期进行质控分析，失控时提出纠正措施并进行持续跟踪和监控。筛查实验室应参加由国家卫生健康委临床检验中心组织的室间质量评价活动，利用实验室室间比对，来评价本实验室检验能力[22]。针对新生儿G6PDd筛查、诊断等不同环节加强相应的质量控制[23]。不同方法的质量控制要点见表2。

本共识旨在为G6PDd的新生儿筛查提供实验室技术及诊断方法参考，规范G6PDd筛查、诊断等检测技术管理流程，督促各实验室提供标准化的筛查服务，以进一步提高新生儿G6PDd筛查的覆盖率，预防和降低新生儿期黄疸，特别是核黄疸的发生率。

（余朝文、张娟、万科星执笔）

参加本共识制定的单位及人员（按单位首字母顺序）：北京医院 国家老年医学中心 卫生部临床检验中心/北京市临床检验工程技术中心（王治国、何法霖、王薇）；重庆医科大学附属儿童医院（邹琳、余朝文、张娟、万科星）；福建省新生儿疾病筛查中心（朱文斌）；广东省梅州市新生儿疾病筛查中心（黄烁丹）；广东省妇幼保健院 广东省新生儿遗传代谢病筛查中心（江剑辉）；广西壮族自治区妇幼保健院（范歆）；贵州省疾病预防控制中心妇幼保健所（张宏红）；海南省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心（王洁）；湖北省妇幼保健院医学检验科（王维鹏）；湖南省妇幼保健院（唐华）；江苏省徐州市妇幼保健院（顾茂胜）；山东省青岛市妇女儿童医院（李文杰）；山东省青岛大学附属医院（刘世国）；山东省妇幼保健院（周玉侠）；陕西省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心（强荣）；上海市儿童医院新生儿疾病筛查中心（田国力）；上海交通大学医学院附属新华医院（韩连书）；四川省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心（欧明才）；云南省妇幼保健院（顾菀茜）；浙江大学医学院附属儿童医院（曲一平、尚世强、杨茹莱、黄新文）；浙江宁波市妇女儿童医院（陈意振）；郑州大学第三附属医院（河南省妇幼保健院）新生儿疾病筛查中心（赵德华）。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 张娟, 余朝文, 苗静琨, 等. 基于测序分析的新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症分子诊断与基因新突变鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(11): 843-847. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.11.011.

[2] 钱家乐, 陈少科, 范歆, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症与新生儿高胆红素血症相关分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013,(5):98-99.

[3] 王琼, 黎曼依, 黄烁丹, 等. 滤纸干血斑用于昆明地区人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因突变的应用性研究[J]. 云南医药,2016,(3):300-303.

[4] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿筛查学组, 中国医师协会医学遗传医师分会临床生化遗传专业委员会, 中国医师协会医学遗传医师分会临床生化遗传专业委员会中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症新生儿筛查、诊断和治疗专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(6): 411-414. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.06.003.

[5] 王维鹏, 邹琳, 王治国. 新生儿疾病筛查与产前诊断实验室管理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[6] 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例[S]. 2016-02-06.

[7] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法[S]. 2006-02-27.

[8] 中华人民共和国卫生部. 医疗技术临床应用管理办法[S]. 2009-03-02.

[9] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范[S]. 2010-11-10.

[10] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[S]. 2010-12-06.

表2 新生儿G6PDd筛查实验室检测技术质量控制

实验环节	荧光定量分析法	G6PD/6GPD比值法	G6PD基因诊断
检验前	出生后3~7 d采足跟血；血斑直径8 mm；于2~8 ℃低温保存，同时监控血片采集、递送时间、温湿度、标本保存条件等指标	监控样本是否溶血、凝血及保存条件等质控指标；对于严重溶血或输血患儿，需10～15 d后重新采集样本与测定	PCR试验应严格遵守《临床基因扩增管理办法》管理与分区、操作；各区应有专用的手套、移液器等，不得交叉使用；定期进行DNA气溶胶污染检查，避免污染
检验中	开展室内质控和室间质评，确保检测结果的可靠性和稳定性；避免因环境温度影响导致假阳性的发生	设阴阳性对照，监控本批试剂的可靠性；监控仪器状态；开展本项目的实验室间比对，以评估本实验室的检验能力	实行测序各环节的标准化管理，包括试剂方法的标准化、操作过程的标准化、结果报告与解释的标准化
检验后	合理解释报告，G6PDd为伴X连锁不完全显性遗传病，女性杂合子患者酶活性降低不明显或完全正常	监控报告发放时间及报告不合格率；定期评估报告与临床或基因诊断结果的符合度	NGS测序结果的重现性应通过Sanger测序复核检测；NGS测到的新发突变应进行双亲的验证；合理、适度解释基因报告[21,24]

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn

[11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement methods. CLSI-EP05-A3[S]. Wayne, PA: CLSI,2014.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. CLSI C28 A2 Ed. 2[S].Wayne, PA:CLSI,2000.

[13] Miao JK, Chen QX, Bao LM, et al. Determination of optimal cutoff value to accurately identify glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygous female neonates[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 131-135. DOI: 10.1016 / j. cca. 2013. 05.004.

[14] Yan JB, Xu HP, Xiong C, et al. Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(3): 305-311. DOI: 10.2353 / jmoldx. 2010. 090104.

[15] 刘秀莲, 王洁, 黄慈丹, 等. 海口地区新生儿G6PD基因突变分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2017,9(3):165-167,177. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2017.03.004.

[16] 顾学范. 临床遗传代谢病[M]. 北京:人民卫生出版社,2016.

[17] 易松, 宋婕萍, 刘赟, 等. 高通量基因测序在孕期产前筛查中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,(03): 10-11,58.

[18] 国家卫生计生委医管局. 测序技术的个体化医学检测应用技术指南(试行) 2015 版[EB / OL]. http://www. hbccl. cn / HbcclUpload/201504/08/201504081113340408.pdf.

[19] Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics[J]. Genet Med, 2017,19(2):249-255. DOI: 10.1038/gim.2016.190.

[20] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing[J]. Genet Med, 2013,15(9):733-747. DOI: 10.1038/gim.2013.92.

[21] 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]. Genet Med, 2015,17(5):405-424. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

[22] 王薇, 章晓燕, 袁帅, 等. 全国新生儿遗传代谢病筛查质量指标室间质量调查研究[J]. 中国儿童保健杂志,2017,25(11): 1182-1185. DOI: 10.11852/zgetbjzz2017-25-11-29.

[23] 国家卫生计生委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查实验室专家组. 新生儿遗传代谢病筛查质量指标共识[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(5):352-355. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.05.005.

[24] 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,2017,6:668-688.

(收稿日期:2018-06-28)

(本文编辑:武昱)

·时讯·

第六次全国中西医结合检验医学学术会议征文

由中国中西医结合学会、中国中西医结合学会检验医学专业委员会主办,四川省中西医结合学会承办的"第六次全国中西医结合检验医学学术会议"定于2019年6月27至29日在四川省成都市召开。

此次会议将围绕"结合创新,助力健康"主题,邀请著名的检验、临床、基础医学的专家、学者作专题报告。并同时举办以"提高检验技能和诊断能力"为主题的"医战到底,医鸣惊人"、"慧眼识风险"检验医技师知识竞赛活动;大会征文的优秀论文评选和展示。

诚邀全国医疗、教学、科研单位的临床检验专业人员、临床医师、教师和科研工作者参会研讨。通过会议内容丰富的学术平台,共同促进我国中西医结合医学、中医药学、现代医学领域检验诊断学的发展。您的参与就是对我们的最大鼓励和支持,让我们在检验诊断学发展道路上携手并肩,共创辉煌。

1. 征文范围:围绕大会主题,与会议内容相关的论文均可投稿。

2. 征文要求:(1)稿件要求:未公开发表过的论著、研究报告、经验总结、综述和评论类论文均可投稿。参加优秀论文评选的稿件需提供全文;不参加优秀论文评选的论文,请提供约500字的摘要,内容包括目的、方法、结果、结论,摘要请采用文字表述,不要附图、表。(2)投稿形式:此次大会只通过网上在线投稿,论文格式参照《中华检验医学杂志》的约稿和样文,不接受邮寄和Email投稿,网上论文投稿请登录大会网站:http://www.caimlm.com 。联系人:姚兴伟,手机:15210975087 。

中国中西医结合学会检验医学专业委员会

万方数据

医脉通 指南 guide.medlive.cn