·指南与共识·

遗传性耳聋基因变异筛查技术专家共识

《遗传性耳聋基因变异筛查技术专家共识》专家组；国家卫生健康委员会临床检验中心产前筛查与诊断实验室室间质评专家委员会；国家卫生健康委员会临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查实验室室间质评专家委员会

执笔：黄烁丹 黎青

通信作者：王治国，Email：zgwang@nccl.org.cn

【摘要】 听力障碍是人类常见的出生缺陷之一，我国每年新增 6 万～8 万耳聋新生儿。中国人群携带的耳聋基因变异中约 70%来自于 *GJB2*、*SLC26A4*、线粒体 DNA 12*SrRNA* 及 *GJB3* 等 4 个热点基因。对孕妇及新生儿进行耳聋基因变异筛查可以及时发现高风险人群，进行产前干预或患儿的诊疗指导，对于聋病的防治具有重要意义。为规范中国遗传性耳聋基因检测实验室技术和各相关环节，加强实验室质量管理，国家卫生健康委员会临床检验中心产前筛查与诊断实验室室间质评专家委员会和新生儿遗传代谢病筛查实验室室间质评委员会特组织专家，制订本共识。

【关键词】 遗传性耳聋； 基因变异筛查； 专家共识

DOI：10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.03.001

听力障碍是人类常见的出生缺陷之一，我国每年新增 6 万～8 万耳聋新生儿[1-2]。耳聋病因复杂，60%以上与遗传因素有关[3]。遗传性耳聋相关基因很多，The Hereditary Hearing Loss Homepage（http://hereditaryhearingloss.org/）数据库显示，非综合征型耳聋（non-syndromic hearing loss，NSHL）已知的致聋基因已超过 80 个，涉及 1000 多种致病变异和 150 个相关基因区域[4]。在我国人群中耳聋基因变异携带率约为 6.3%，其中约 70%的变异来自于 *GJB2*、*SLC26A4*、线粒体 DNA *12SrRNA* 及 *GJB3* 等 4 个热点基因[5-9]。对孕前或孕期夫妇进行遗传性耳聋基因变异筛查，对孕妇进行产前诊断可避免聋儿的出生；对新生儿进行遗传性耳聋基因变异筛查，早诊断、早治疗可有效干预聋哑的发生，最重要的是通过基因变异筛查可发现常规物理听力筛查无法检出的药物性致聋基因携带者和迟发性耳聋基因携带者，通过健康指导避免药物性耳聋或减缓迟发性耳聋的发生。我国北京、成都、长治、南通、郑州等地区已相继展开全市新生儿耳聋基因变异筛查[10-14]，为规范我国遗传性耳聋基因检测实验室技术和相关各环节，加强实验室质量管理，国家卫生健康委临床检验中心产前筛查与诊断实验室室间质评专家委员会和新生儿遗传代谢病筛查实验室室间质评委员会特组织专家，制订本共识。

1 适用人群与要求

1.1 适用人群 孕前或孕期检查的夫妇、新生儿、临床上经临床医师检查认为有必要进行遗传性耳聋基因检测的对象。

1.2 实验室要求 开展遗传性耳聋基因检测的实验室必须取得国家卫生健康委临床检验中心或省级临床检验中心的临床基因扩增检验实验室技术验收合格证书。

2 筛查目标与局限性

2.1 基因变异筛查目标 对样本基因组 DNA 中与耳聋相关的至少 4 个基因的 9 个变异位点（*GJB2* 基因：35delG、235delC、176-191del16 和 299-300delAT；*SLC26A4* 基因：216A＞G 和 IVS7-2A＞G；*12SrRNA* 基因：1494C＞T 和 1555A＞G；*GJB3* 基因：538C＞T）进行检测。

2.2 基因变异筛查的局限性 遗传性耳聋基因变异筛查的局限性主要存在于以下几个方面：

2.2.1 检测方法（技术）的局限性 分子检验技术在实际操作和检验的过程中，必须有严格的质量控制和管理体系，但仍无法完全避免假阳性或假阴性结果出现，因此，准备两个不同的技术检验方案对争议结果进行复查和验证是必须的。推荐使用 Sanger 测序方法进行验证。

2.2.2 检验范围的局限性 耳聋基因变异筛查检验的范围多数是 4 个热点基因的 9 至 10 余个位点，这些位点是目前学界公认的变异热点，也是人群中携带率最高的位点。其余未涵盖在筛查范围内。

2.2.3 结果解读的局限性 受试者检验结果若为阴性，应解读为检验范围内未发现基因变异，而不可判断为无遗传性的听力问题；此外，针对阳性携带者，更应

万方数据

医脉通 指南 guide.medlive.cn

该结合临床表型以及家系情况进行结果解读和咨询。

3 筛查流程及质量控制

制定从筛查前知情同意到实验室检测、报告发布、遗传咨询及随访整个筛查环节的标准操作流程，以便于对整个筛查流程进行监控，确保筛查质量。

3.1 样本采集和保存要求 对筛查对象充分告知，经知情同意后进行标本采集。标本类型包括全血、新生儿的脐带血、血斑及口腔脱落细胞等。新生儿血斑采集参照卫生部《新生儿疾病筛查技术规范》操作，也可使用脐静脉血滴制血斑，或留 2 mL 脐血置 EDTA 抗凝管中；成年人和新生儿均可抽取静脉血 1～2 mL 置 EDTA 抗凝（或枸橼酸钠）试管中，也可抽取 0.3 mL 静脉血直接滴于滤纸上制成血斑标本。血斑标本要求晾干后独立包装或血斑位置有隔离物。采集的 EDTA 抗凝全血样本在 2～8℃保存应在 7 天内检测，－20℃保存不超过 3 个月，避免反复冻融样本。滤纸干血斑样本在 2～8℃保存应在 30 天内检测。

3.2 样本运输要求 血斑、全血或脐带血需冷链运输，如用 EP 管，需封口膜密封，以防运输过程中渗漏。

3.3 标本接收 实验室应参照基因检测标本验收标准，以不凝血、不污染、不降解、编号唯一、信息准确为基本原则，结合本地区实际情况制订标本核收制度。实验室接收到标本后，按照标本核收制度进行核收，退回不合格标本，妥善保存好合格标本，适时对合格标本进行实验室编号、信息录入和后续处理等。

3.4 实验程序 目前国内应用较为广泛的耳聋基因检测技术分别有 PCR＋导流杂交法、PCR-反向点杂交法、微阵列芯片法、荧光 PCR 法、多色探针熔解曲线分析法、飞行质谱法和基因测序法等。

3.4.1 样本的 DNA 提取 血斑打出 3 mm 直径的小血孔 6～10 个，全血或脐血混匀后吸出 100～200 μL，脱落细胞离心后留取沉淀物，采用柱提法或磁珠法等方法进行 DNA 提取。

3.4.2 DNA 浓度的测定 用紫外分光光度计进行 DNA 浓度测定，以 TE 为空白调零后，加样测试。提取的 DNA 浓度＞5 ng/μL，A_{260}/A_{280} 的值在 1.5～2.5 之间。

3.4.3 模板 DNA 加样和 PCR 扩增 （1）在试剂准备区进行 PCR 试剂分装，按本次实验标本数、室内质控、空白和阴阳性对照的总数，取出或配制相应人份的 PCR 反应管。（2）在样本制备区进行加样操作，取出提取的样本 DNA、质控品和对照品，按编号顺序进行加样，一般加样 2 μL，空白对照加无菌双蒸水；加样后点动离心，取出 PCR 反应管通过传递窗传至基因扩增区。（3）基因扩增与结果分析 打开 PCR 扩增仪，按试剂说明书编辑扩增程序，放入已加好模板 DNA 的反应管，启动扩增程序。采用荧光 PCR 法或多色探针熔解曲线法，直接通过扩增系统生成的曲线图判读结果，按试剂说明书进行判读，一般可区分基因变异杂合子或纯合子等。

3.4.4 分子杂交和结果分析 PCR＋导流杂交法、PCR-反向点杂交法和微阵列芯片法均需要将扩增产物与探针杂交，飞行质谱法需将产物进行质谱分析，测序法样本经前期处理后进行基因测序，操作和结果判读按相应试剂盒说明书进行。

3.5 检验程序的性能验证 为了保证检验质量，应按照临床医学检验的性能验证方法，对遗传性耳聋基因变异筛查的实验程序进行以下性能验证：（1）试剂盒和耗材性能验证；（2）DNA 模板量验证以明确最合适模板量的浓度范围，建立最佳加样量；（3）DNA 浓度和纯度验证；（4）加样、扩增和产物分析性能验证等。

3.6 质量控制与报告审查、发布 每批实验的阴阳性对照及室内质控品在控，报告才能发放。

3.6.1 审查原则 每批次标本的检测均需有阴性质控品和阳性质控品，如有条件可增加其他室内质控品和空白对照，参与提取-扩增-产物分析的全过程，全程操作同标本的处理。只有连续评价结果在控，则本实验室测定工作可靠，检验报告才可发出。定期进行不同方法间、室间比对，参加全国或全省的室间质评活动，发现失控情况及时处理。

3.6.2 审查内容包括 （1）标本接收记录表：标本是否合格；（2）DNA 浓度和纯度记录表：模板 DNA 是否符合要求；（3）检测流程记录表：检测过程是否在控；（4）室内质控报告：室内质控结果是否在控；（5）试剂耗材质检报告：试剂耗材质检是否合格；（6）批间、室间比对和室间质评是否合格。

3.6.3 标本复检 复查标本类型：包括质控数据失控标本、检验结果可疑标本、对检验结果有疑问或有争议的标本。

3.6.4 复查处理方式 （1）质控数据失控，应查找原因纠正问题，再重新做质控，结果在控后，对相应的所有失控患者的标本连质控品重新复检。复检合格并找出原因，可判定合格；若未找出原因或出现不合格，应报告实验室负责人，重新纠正检测系统，系统正常后再对样本进行复检。（2）有资质授权的人员进行审核，发现检验结果可疑时应进行复检，并尽快提供复检后的准确结果。（3）对检验结果有疑问或有争议时，检验人员可取用存放样品进行复检，并做记录。（4）仅对在保存期内标本进行复检或核对，不负责对超过保存期或

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn

无保存价值标本进行复检或核对。

3.6.5 报告出具与发布 样本检测结果出来后，由实验人员生成检验报告单，再由有审核权限的人员进行审核，对实验原始结果、基本资料、检验目的、报告内容和相关提示等确认无误后，经实验人员和审核人员双签名，才能将报告发出。检验报告单对检验结果的描述应包括检验范围、目标基因位点是否检测到变异、基因变异类型(纯合、双杂合或杂合)、实验室建议或其他说明等。实验室应建立基因检测信息管理系统，对标本接收、基本信息录入(导入)、检测过程记录、质量控制、报告审核、报告打印、统计分析等环节进行有效管理。如有条件，应建立互联网＋信息系统，以便筛查区域内自助查询结果，获得结果报告、召回或随访信息等。

3.6.6 报告结果的解读和建议 对于杂合变异携带者，应提示定期进行听力检查，并注意直系亲属情况。对于纯合、双杂合或者多位点变异的受检者，应建议召回父母进行家系分析，若不符合遗传规律者，应采用另一技术进行再次验证，或调查其他原因。此外，针对单位点杂合携带或基因变异筛查阴性，而听力缺失或下降者，应建议进行遗传咨询和家系调查，并进行更广范围的耳聋基因变异检测。

需要强调的是，若检出线粒体*12S rRNA* 基因 1494C＞T 和 1555A＞G 两个变异，无论是均质或异质状态，均应提示受检者药物性耳聋风险极高，应建议其本人以及母系家系成员均应终身禁止使用氨基糖苷类药物，其母系家系成员应当在进行适当的遗传咨询后，接受基因检测以确认。

3.7 标本保存 全血或脐血样本检毕保存 10 个工作日，超过期限而有复查需求的患者，需重新送测。血斑标本按新生儿筛查技术规范要求保存 5 年以上。DNA 样本可－80℃长期保存。

3.8 新生儿家系确诊 对新生儿遗传性耳聋基因变异筛查结果阳性者，应召回患儿父母进行耳聋基因检测，最终对家系结果进行综合评价和诊断、精准治疗和干预，患儿的致病基因变异在绝大多数情况下应遗传自父母，但不能排除新发变异。家系确诊也有利于明确父母的基因携带情况，对再次生育具有指导作用。

3.9 遗传咨询

3.9.1 孕前或孕检夫妇阳性者的遗传咨询 检出双方同时携带*GJB2*、*GJB3* 或*SLC26A4* 基因变异的夫妇，应充分告知胎儿存在的耳聋风险及患儿的治疗手段，并说明通过产前诊断可避免先天性耳聋患儿的出生，由患者选择是否进行产前诊断；发现携带 mtDNA 基因变异的患者应提供安全用药指导避免致聋，若患者是孕妇，所生的一定是基因变异携带者，也应告知对胎儿应从出生后注意安全用药。

3.9.2 新生儿的遗传咨询 对筛查阳性的患儿家系，筛查机构应为其提供遗传咨询，对先天性耳聋患儿及时采取治疗措施，对迟发性耳聋和药物性耳聋基因携带者及时给予生活指导和用药指导，避免或延缓耳聋的发生，对隐性耳聋基因携带者通过监护人指导患儿成年后的婚育注意事项，实现长效防聋治聋。

4 总结

遗传性耳聋基因变异筛查已成为国内医疗保健机构普遍开展的项目，本共识主旨在于规范耳聋基因变异筛查过程中实验室样本处理、检测以及报告出具过程中的相关操作步骤，以期获得准确的检测结果和正确的检测报告，提高不同实验室间检测方案的一致性，督促各检测实验室加强质量管理，提供同质化的耳聋基因变异筛查服务。

共识专家组编写组成员名单：

黄烁丹(广东省梅州市妇女儿童医院/梅州市新生儿疾病筛查中心) 王治国(国家卫生健康委员会临床检验中心/北京医院国家老年医学中心) 王维鹏(湖北省妇幼保健院检验医学科) 王洁(海南省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心) 王莉(河南省人民医院医学遗传研究所) 王珏(江苏省妇幼保健院) 王晓华(内蒙古自治区妇幼保健院) 田国力(上海市儿童医院新生儿疾病筛查中心) 曲一平、黄新文(浙江大学医学院附属儿童医院浙江省新生儿疾病筛查中心) 江剑辉(广东省儿童医院广东省妇幼保健院儿童遗传代谢病防治中心) 李伟(河北省保定市妇幼保健院) 刘世国(青岛大学附属医院) 李文杰(山东省青岛市妇幼保健院新生儿疾病筛查中心) 朱文斌(福建省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心) 张莉(沈阳市妇幼保健院) 张宏红(贵州省疾病预防控制中心妇幼保健所/贵州省新生儿疾病筛查中心) 邹琳(重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心/新生儿疾病筛查中心) 陈意振(宁波市妇女儿童医院) 沈国松(浙江省湖州市妇幼保健院) 尚世强(浙江大学医学院附属儿童医院) 范歆(广西壮族自治区妇幼保健院) 欧明才(四川省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心) 周裕林(厦门市妇幼保健院) 周玉侠(山东省妇幼保健院) 姜艳芳(吉林大学第一医院) 赵德华(河南省妇幼保健院新生儿疾病筛查中心) 顾茂胜(江苏省徐州市妇幼保健院) 顾苑茜(云南省妇幼保健院) 徐两蒲(福建省妇幼保健院) 陶炯(上海市第一人民医院) 唐华(湖南省妇幼保健院) 贾颐舫(山东大学附属省立医院产前诊断中心) 强荣(陕西省新生儿疾病筛查中心) 曹东华(山东省大连市妇产医院) 韩连书(上海市交通大学医学院附属新华医院) 黎青(广州医科大学附属第三医院妇产科研究所)

万方数据

医脉通 指南 guide.medlive.cn

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 贺娟，肖伟利，李雪芹，等. 遗传性耳聋基因的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志，2017，49(10)：1175-1177. DOI：10.16096/J.cnki.nmgyxzz.2017.49.10.009.
He J, Xiao WL, Li XQ, et al. Hereditary deafness genes research progress[J]. Inner Mongolia Med, 2017, 49(10): 1175-1177. DOI: 10.16096/J.cnki.nmgyxzz.2017.49.10.009.

[2] 韩明昱，戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展[J]. 北京医学，2011，33(5)：419-421. DOI：10.15932/j.0253-9713.2011.05.041.
Han MY, Dai P. Progress in clinical application of genetic diagnosis of deafness in China[J]. Beijing Med J, 2011, 33(5): 419-421. DOI: 10.15932/j.0253-9713.2011.05.041.

[3] 周永安，王湘，马云霞，等. 遗传性非综合征性常见耳聋基因诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志，2011，19(7)：27-30. DOI：10.13404/j.cnki.cjbhh.2011.07.067.
Zhou YA, Wang X, Ma YX, et al. Study on gene diagnosis of hereditary non-syndrome common deafness[J]. Chin J Birth Health Hered, 2011, 19(7): 27-30. DOI: 10.13404/j.cnki.cjbhh.2011.07.067.

[4] Yan D, Xiang G, Chai X, et al. Screening of deafness-causing DNA variants that are common in patients of European ancestry using a microarray-based approach[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0169219. DOI: 10.1371/j.pone.0169219.

[5] Dai P, Yu F, Han B, et al. *GJB2* mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with non-syndromic hearing impairment[J]. J Transl Med, 2009, 7: 26. DOI: 10.1186/1479-5876-7-26.

[6] Dai P, Li Q, Huang D, et al. *SLC26A4* c.919-2A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss[J]. Genet Med, 2008, 10(8): 586-592. DOI: 10.1097/gim.0b013e31817d2ef1.

[7] Dai P, Liu X, Han D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 194-199. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.11.156.

[8] 刘新，戴朴，黄德亮，等. 线粒体 DNA A1555G 变异大规模筛查及其预防意义探讨[J]. 中华医学杂志，2006，86(19)：1318-1322. DOI：10.3760/j.issn.0376-2491.2006.19.006.
Liu X, Dai P, Huang DL, et al. Large-scale screening of mitochondrial DNA A1555G mutation and its preventive significance[J]. Natl Med J China, 2006, 86(19): 1318-1322. DOI: 10.3760/j.issn.0376-2491.2006.19.006.

[9] Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment[J]. Nat Genet, 1998, 20(4): 370-373. DOI: 10.1038/3845.

[10] 黄丽辉，韩德民. 新生儿耳聋基因筛查的质控体系建立[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科，2015，22(2)：60-62. DOI：10.16066/j.1672-7002.2015.02.003.
Huang LH, Han DM. Establishment of quality control system for neonatal deafness gene screening[J]. Chin Arch Otolaryngol-Head Neck Surg, 2015, 22(2): 60-62. DOI: 10.16066/j.1672-7002.2015.02.003.

[11] 吕康模，熊业华，俞皓，等. 17000 名新生儿遗传性耳聋基因变异筛查[J]. 中华医学遗传学杂志，2014，31(5)：547-552. DOI：10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.05.001.
Lv KM, Xiong YH, Yu H, et al. Gene mutation screening for hereditary deafness in 17 000 newborns[J]. Chin J Med Genet, 2014, 31(5): 547-552. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.05.001.

[12] 李晓泽，马卫平，胡志鹏，等. 长治地区 19113 例新生儿耳聋基因检测[J]. 中华耳科学杂志，2015，13(4)：654-657. DOI：10.3969/j.issn.1672-2922.2015.04.019.
Li XZ, Ma WP, Hu ZP, et al. Genetic detection of 19113 newborns with deafness in Changzhi area[J]. Chin J Otol, 2015, 13(4): 654-657. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2015.04.019.

[13] 周君，朱庆文，俞娟. 南通地区新生儿耳聋基因筛查[J]. 中国伤残医学，2014，22(16)：39-40. DOI：10.13214/j.cnki.cjotadm.2014.16.024.
Zhou Q, Zhu QW, Yu J. Screening of neonatal deafness gene in Nantong area[J]. Chin J Trauma Dis Med, 2014, 22(16): 39-40. DOI: 10.13214/j.cnki.cjotadm.2014.16.024.

[14] 赵建萍，熊军莉. 郑州地区新生儿耳聋基因检测情况调查研究[J]. 医药论坛杂志，2017，38(9)：87-89. DOI：CNKI：SUN：HYYX.O.2017-09-032.
Zhao JP, Xiong JL. Investigation of deafness gene detection in neonates in Zhengzhou[J]. J Med Forum, 2017, 38(09): 87-89. DOI: CNKI: SUN: HYYX.O.2017-09-032.

（收稿日期：2018-05-10）
（本文编辑　张丽玲）

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于统计学检验结论在文章中表达的要求

根据人民卫生出版社出版的全国高等学校教材《卫生统计学》第 5 版，报告统计学检验的结论时，对 P 值小于或等于检验水准（一般为 0.05）的情况，一律描述为“差异有统计学意义”，同时写明 P 的具体数值或相应的不等式，不再采用将 $P<0.05$ 描述为“差异有显著意义（或差异有显著性）”、将 $P<0.01$ 描述为“差异有非常显著意义（或差异有非常显著性）”的表达方法。在用不等式表示 P 值的情况下，一般情况下选用 $P>0.05$、$P<0.05$ 或 $P<0.01$ 三种表达方式即可满足需要，无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$。

《中华医学遗传学杂志》编辑部

万方数据
医脉通 指南 guide.medlive.cn