

• 中华医学会生殖医学分会指南 •

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.001

胚胎植入前遗传学诊断与筛查实验室技术指南



扫一扫下载指南原文

张宁媛, 黄国宁, 范立青, 冯云, 沈浣, 刘平, 卢文红, 张云山, 王秀霞, 张松英, 黄学锋, 伍琼芳, 全松, 周灿权, 周从容, 师娟子, 孙莹璞*, 孙海翔*

(中华医学会生殖医学分会第四届委员会)

【摘要】 分析 Medline 引文出版的临床试验主要证据与荟萃分析结果,并参照欧洲人类生殖与胚胎学会 PGD 分会、美国 PGD 国际协会发布的相关指南,由中华医学会生殖医学分会专家共同制定了 PGD/PGS 实验室技术指南。通过建立标准操作流程和有效的质量管理体系,规范 PGD/PGS 相关实验室技术的实践与管理。

【关键词】 胚胎; 植入前遗传学诊断与筛查; 实验室技术; 指南

Practice guideline for laboratory manipulation of preimplantation genetic diagnosis/screening

ZHANG Ning-yuan, HUANG Guo-ning, FAN Li-qing, FENG Yun, SHEN Huan, LIU Ping, LU Wen-hong, ZHANG Yun-shan, WANG Xiu-xia, ZHANG Song-ying, HUANG Xue-feng, WU Qiong-fang, QUAN Song, ZHOU Can-quan, ZHOU Cong-rong, SHI Juan-zi, SUN Ying-pu*, SUN Hai-xiang*

The Fourth Session of the Committee of Chinese Society of Reproductive Medicine (CSRM)

【Abstract】 By analyzing the main evidence and meta-analysis results of clinical trials published by Medline citation, and referring to the relevant guidelines issued by ESHRE PGD Consortium and PGDIS, the experts from Chinese Society of Reproductive Medicine (CSRM) jointly developed the PGD/PGS laboratory technical guidelines. The practice and management of PGD/PGS related laboratory technology can be standardized by establishing standard operation process and effective quality management system.

【Key words】 Embryos; Preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS); Laboratory techniques; Guidelines

(J Reprod Med 2018;27(9):819-827)

背 景

遗传性疾病是出生缺陷的主要形式,绝大部分遗传性疾病缺乏有效治疗方法,是人类生殖健康面临的严峻挑战。植入前遗传学诊断/筛查(preimplantation genetic diagnosis/screening, PGD/PGS)是在胚胎植入子宫前对胚胎进行遗传学检测,选择正常或者不致病胚胎移植。PGD 主要针对事先已经明确病因的遗传性疾病患者,在种植前对胚胎进行相应遗传学诊断,主要包括单基因病(如地中海贫血、遗传性耳聋等)和染色体病(如罗氏易位、相互易位等)。而 PGS 主要针对高龄、反复助孕失败、反复自然流产等患者,进行植入前胚胎的染色体非整倍性检测。

PGD/PGS 技术从源头上避免了遗传性缺陷胚胎的种植,较之传统的产前筛查具有明确的时间优势,

避免可能的治疗性引产给母体带来的生理、心理伤害以及伦理问题。PGD/PGS 技术的设想最早由 Edwards 提出,1968 年开始动物试验^[1],此后不断拓展。PGD/PGS 技术的临床应用已有近 30 年的历史。伴随胚胎培养与活检技术、新型高通量诊断方法的发展,PGD/PGS 的临床应用范围更加广泛。如何减少体外操作对胚胎发育潜能的影响,同时提高检测结果的可靠性,仍是 PGD/PGS 实验室技术中亟待规范的问题。

方 法

在中华医学会生殖医学分会的倡议和领导下,分析 1973~2016 年 Medline 引文出版的临床试验主要

* 通讯作者

证据与荟萃分析结果,以“preimplantation genetic diagnosis”或“preimplantation genetic screening”为 MeSH Terms,检出文献 2 746 篇。参照欧洲人类生殖与胚胎学会(European Society for Human Reproduction and Embryology, ESHRE)PGD 分会 2005 年发布的 PGD/PGS 临床指南^[2]、2011 年发布的 PGD 中心组织管理^[3]、基于扩增方法的检测技术^[4]、基于 FISH 方法的检测技术^[5]和活检技术^[6]等 4 个方面的指南,以及美国 PGD 国际协会(Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, PGDIS)2008 年修订的 PGD 操作流程及实验室质量保障指南^[7]、中华医学会生殖医学分会 2017 年试行的“高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断和筛查技术规范(试行)”^[8],由中华医学会生殖医学分会实验室学组的专家共同讨论,制定此 PGD/PGS 实验室技术指南,以期规范 PGD/PGS 相关实验室技术的实践与管理。

一、指南发起和支持单位

本指南由中华医学会生殖医学分会发起和负责制订。

二、指南注册与计划书撰写

本指南已在国际实践指南注册平台(International Practice Guidelines Registry Platform, IPGRP)进行了注册(注册号为 IPGRP-2017CN040),读者可联系该注册平台索要指南的计划书。

三、指南使用者与目标人群

该指南适用于开展胚胎植入前遗传学诊断与筛查技术的医疗机构。指南的使用人群为从事生殖医学和妇产科学的医务工作者。

四、证据评价与分级

依据循证医学证据的五级证据等级进行分级。Ⅰ级证据来源:按照特定病种的特定疗法收集所有质量可靠的 RCT 以及对其所做的系统性评价或 Meta 分析;Ⅱ级证据来源:单个的样本量足够的 RCT 研究;Ⅲ级证据来源:设有对照组但未用随机方法分组的研究;Ⅳ级证据来源:无对照的系列病例观察;Ⅴ级证据来源:专家意见、个案报道和临床总结。

主要推荐意见证据级别分为:A 级:强力推荐(证据肯定,能改善健康结局,利大于弊);B 级:推荐(有较好证据,能改善健康结局,利大于弊);C 级:不作为常规推荐(有证据能改善健康结局,但无法明确风险获益比);D 级:不推荐(证据不足或对健康结局弊大于利)。

五、指南的传播与实施

指南发布后,将主要通过以下方式对指南进行传播和推广:①在相关学术会议中进行解读;②有计划地在中国部分省份组织指南推广专场,确保医务工作者充分了解并正确应用本指南;③在学术期刊中发表本指南;④通过微信或其他媒体进行推广。

结 果

表 1 主要推荐意见

项目及推荐内容	推荐级别
实验室管理	
PGD/PGS 实验室应建立标准操作流程和人员专项培训制度	A
PGD/PGS 实验室应建立严格的内部质控制度,并获得 PGD 资格认证	A
授精与胚胎培养方式	
授精采用 ICSI 方式,以避免亲源遗传物质的污染	A
卵子与胚胎培养采用单滴培养方式,以确保胚胎和活检材料、活检结果一一对应	A
胚胎活检方法	
胚胎活检时机选择滋养层细胞活检	A
滋养层细胞活检透明带打孔采用激光法	A
滋养层细胞活检方法采用激光或机械切割法	B
滋养层细胞活检数量要求:滋养层细胞达到 A 级标准可活检 6 个以上细胞,达不到 A 级标准时活检 3~6 个细胞	B
活检胚胎的冻融	
活检胚胎采用玻璃化冷冻方法保存	B
遗传学检测方法	
染色体疾病的遗传学检测可采用芯片类(如 SNP 芯片)或者 NGS 检测方法。单基因病检测可采用基因的 PCR 扩增和/或测序技术。对突变位点检测同时在其附近寻找分子标记做连锁分析,以降低 PCR 方法的误诊率	B
芯片类方法用于 PGS 的检测结果具有较高的一致性	A

一、PGD/PGS 实验室管理

指南意见:PGD/PGS 实验室应建立标准操作流程和人员专项培训制度。

PGD/PGS 实验室应建立在经省级医疗行政主管部门批准开展植入前遗传学诊断技术的试点或正式运行的医疗机构。PGD/PGS 实验室应具备的场地、设备、人员要求参照中华医学会生殖医学分会的“高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断和筛查技术规范(试行)”^[8]。

PGD/PGS 实验室应建立标准操作流程。PGD/PGS 操作手册应包括授精与胚胎培养、胚胎活检、遗传学检测、胚胎冻融、胚胎移植等相关技术流程和操作细节要求,并及时更新,定期进行自查。

PGD/PGS 针对的是单细胞或几个细胞的微量 DNA,遗传诊断的难度大,对诊断结果的可靠性要求也更高。因技术的特殊要求,PGDIS 推荐对 PGD/PGS 实验室技术人员进行严格的专项培训。为避免外源性细胞或 DNA 污染,在实施 PCR 操作时尤其需要严格遵循操作规范。在缺少单细胞诊断正规培训的情况下,生殖中心可通过强化安全教育和操作流程的监督,使其严格落实标本标记及确认的双人核对制度;通过加强对仪器与操作技术的训练,使其熟练掌握授精与胚胎培养、胚胎活检等核心技术;通过数据收集与分析水平的训练,使其提高 PGD 结果的判别技能以甄选可供移植的胚胎。PGD/PGS 检测应严格遵守国家法律及卫生行政部门颁发的法规,严格禁止无医学指征的性别筛查,PGD/PGS 报告中必须隐藏与胚胎性别相关的信息。

二、PGD/PGS 采用的授精与胚胎培养方式

指南意见:授精采用 ICSI 方式,以避免亲源遗传物质的污染。卵子与胚胎培养采用单滴培养方式,以确保胚胎和活检材料、活检结果一一对应。

PGD/PGS 患者的授精方式与胚胎培养模式的选择,需充分考虑到 PGD/PGS 操作的需要,同时避免父源和母源性遗传物质污染的可能。

1. 授精方式:ESHRE PGD 协会统计连续 10 年的 PGD/PGS 数据,其中采用 ICSI 授精方式的有 23 830 个周期、采用 IVF 方式 3 113 个周期^[9](Ⅲ级)。绝大部分 PGD/PGS 周期采用 ICSI 授精方式,保障受精率同时,避免精子滞留透明带中造成父源遗传物质的污染^[9,9](Ⅲ级)。ICSI 前去除颗粒细胞操作应将卵周颗粒细胞清除干净以避免母源遗传

物质的污染^[10]。

2. 胚胎培养方式:胚胎活检之前的培养模式同常规 IVF 周期^[11],建议单滴培养。活检过程中需要严格标识。活检后卵子或胚胎行单滴培养,也可以单枚卵子或胚胎放置单独培养皿,确保活检标本与活检后卵子或胚胎一一对应^[6]。活检后卵子或胚胎应充分洗涤祛除活检使用的操作液^[6]。

三、PGD/PGS 采用的卵子与胚胎活检方法

指南意见:胚胎活检时机选择滋养层细胞活检。滋养层细胞活检透明带打孔采用激光法。滋养层细胞活检方法采用激光或机械切割法。滋养层细胞活检数量要求:滋养层细胞达到 A 级标准可活检 6 个以上细胞,达不到 A 级标准时活检 3~6 个细胞。

(一)活检时机

PGD/PGS 是针对植入前胚胎进行遗传学诊断,卵子(极体活检间接反映胚胎遗传信息)、分裂期胚胎或囊胚三个阶段都可以进行活检,获取遗传物质,进行遗传学诊断。因此,根据活检时机的不同可分为极体活检、卵裂球活检和囊胚滋养层细胞活检。

1. 极体活检:极体活检包括 MⅡ 期卵细胞和/或合子中进行极体的活检,分为第一极体活检和第二极体活检。第一极体活检于取卵当天即 HCG 注射后 36~42 h 进行^[12],第二极体活检在受精观察当日^[13]。可在受精后 9~22 h 内同时活检第一极体和第二极体,但是受精 22 h 第一极体有可能发生降解^[14](Ⅲ级)。极体活检用于 PGD/PGS 基于:极体是卵子减数分裂过程中的产物,根据其检测结果可以间接推测卵子的遗传信息,从而预测来自母亲的遗传缺陷对胚胎的影响。极体活检相比植入前其他阶段具有较少的侵入性,来自第一次减数分裂的第一极体或来自第二次减数分裂的第二极体,对于植入前及植入后胚胎的发育影响较小。Strom 等^[15]对经连续极体活检的 PGD 周期诞生的 109 个胎儿进行生产和新生儿结局的调查,结果显示经双极体活检后出生胎儿的身长和体重,以及出生缺陷方面都没有显著差异(Ⅲ级)。

由于极体活检只能间接反映母方遗传信息,临床应用较为局限。由于有丝分裂和父系来源的非整倍体性不能被检测到,Capalbo 等^[16]报道极体活检具有较高的假阳性和假阴性率(Ⅲ级)。同时极体活检尚不能预测胚胎的发育状况,活检样本量多,也存

在无效活检。极体活检结果也需要胚胎活检结果的验证^[6]。近几十年来,欧洲极体活检的比例已由原先的 10%~15% 进一步下降。

2. 卵裂球活检:卵裂球活检是在胚胎发育 6~8 细胞左右时,吸取 1~2 个卵裂球进行遗传学检测。此阶段的卵裂球被认为具有全能性。与极体活检相比,卵裂球活检的优势在于可以同时诊断父方和母方染色体异常或单基因疾病。卵裂球活检直接检测胚胎的遗传信息,并且可以剔除未受精和质量差的胚胎,减少活检样本数量^[17]。但分裂期胚胎活检减少胚胎细胞数量,可能损伤胚胎,降低胚胎发育潜能^[18](Ⅱ级)。分裂期胚胎有 40%~60% 为嵌合体,对于嵌合体胚胎,卵裂阶段单个卵裂球的检测并不能完全代表整个胚胎的遗传信息,导致漏诊和异常胚胎的移植^[6]。

3. 滋养层细胞活检:滋养层细胞活检是在受精后 5~6 d,胚胎发育至囊胚阶段时,取一定数量的滋养层细胞用于遗传检测。囊胚阶段胚胎细胞数量显著增加,获得的滋养层细胞数可达 10 个,能够提供更多的细胞用于检测,从而提高 PGD/PGS 诊断结果的准确性。此阶段胚胎嵌合减少,也提高了检测的准确性,并且滋养层细胞将来发育成胎盘,降低了活检对胚胎发育的影响^[6]。但滋养层细胞活检需要胚胎发育到囊胚阶段,要求具备一定的胚胎培养条件,胚胎有持续发育能力。约有 40% 的正常受精卵可在体外发育至囊胚阶段,也限制了可供 PGD/PGS 诊断的胚胎数目。滋养层细胞活检结果也可能存在与内细胞团的不一致性。

卵裂球活检和滋养层细胞活检是常用的胚胎活检时机。随机配对试验结果显示,囊胚活检没有降低胚胎种植潜能(囊胚活检与未活检者的种植率为 51% vs 54%),而分裂期胚胎活检显著降低了胚胎种植潜能(分裂期胚胎活检与未活检者的种植率为 30% vs 50%)^[19](Ⅱ级)。比较囊胚活检(Day5 活检,Day6 移植)和分裂期胚胎活检后培养至囊胚移植(Day3 活检,Day5 移植)的临床结局显示,囊胚活检的诊断率和胚胎种植率均高于分裂胚活检(94.3%、47.6% vs 75.2%、26.7%)^[20](Ⅱ级)。鉴于囊胚期活检的优势,越来越多的 PGD/PGS 周期采用滋养层细胞活检方式。

(二) 活检方法

PGD 过程中的胚胎活检是一种创伤性显微操作,有可能影响活检后胚胎发育能力。在进行胚胎

活检之前需要在透明带上打孔或者部分透明带切除。

1. 透明带打孔方法:透明带打孔主要有 3 种方法:化学法、机械法和激光法。化学法主要是利用酸性液体消化透明带形成孔洞,由于酸性液体可能会影响胚胎发育,目前很少应用;机械法利用活检针机械摩擦透明带,形成孔洞,虽不存在化学物质对胚胎的不利影响,但显微操作技术难度相对高,操作时间过长会影响胚胎的细胞骨架,应用也不广泛;激光法利用激光消除透明带,操作简单,可任意调节孔洞大小,不直接接触胚胎,对胚胎发育影响小,是透明带打孔最为常用的方法。Magli 等^[21]报道极体活检时,机械或者激光法打孔对活检成功率的影响无统计学差异(Ⅲ级)。ESHRE PGD 协会 2010 年 PGD/PGS 病例统计显示,激光法、化学法和机械法的应用例数分别为 4 250 例、958 例、443 例^[22]。

透明带打孔的时机选择,极体、分裂期胚胎活检一般在活检当时进行;囊胚期活检可在第 3 天或第 5 天进行透明带打孔^[20,23](Ⅱ级、Ⅲ级)。第 3 天打孔时可以选择卵裂球与透明带的间隙处,避免对胚胎细胞的伤害;第 5 天时囊胚已经扩张,能够确定胚胎内细胞团所在位置,可以选择在内细胞团对侧进行开口,方便活检。

2. 胚胎活检方法:对于分裂期胚胎,活检在无钙/镁离子的溶液中进行,以降低活检细胞裂解的比率^[24]。活检方法主要有抽吸法、机械切割法和激光切割法。抽吸法直接吸取极体^[12]和分裂期卵裂球^[25],对囊胚而言可以在疝形成后使用激光法^[21]或机械切割法获取滋养层细胞^[26]。目前常用的做法是在第 3 天或第 5 天时将透明带开口,待滋养层细胞从开口处孵出,形成疝,对孵出细胞进行取样检测^[23,27]。

3. 活检对配子与胚胎质量的影响:分裂期胚胎可以活检 1~2 个细胞。相对于活检对胚胎造成的损伤而言,分裂期胚胎本身的质量与囊胚发育率之间的相关性更高^[18](Ⅱ级)。活检 2 个细胞较 1 个细胞降低囊胚发育率^[18,28](Ⅱ级)。但活检 1 个细胞降低了 PCR 的诊断效率(88.6% vs 96.4%),而对 FISH 方法的诊断效率没有影响^[18](Ⅱ级)。两者的活产率相当^[18](Ⅱ级)。

胚胎发育至囊胚时大约有 100~150 个细胞,可以提供更多的细胞用于检测。滋养层细胞活检时,诊断率随活检细胞数的增加而提高,1~5 个细胞的

诊断率从 86.7% 上升到 98.7%, 当活检细胞大于 6 个细胞时诊断率达到最大^[29] (Ⅲ级)。而滋养层细胞活检数量对临床结局的影响则和滋养层本身的发育状况紧密相关, 当滋养层细胞达到 A 级标准时, 活检细胞数量的多少对胚胎存活和种植率没有显著影响, 而当滋养层细胞在 B、C 级时, 活检细胞数量虽然对胚胎存活没有显著影响, 但胚胎种植率随活检细胞数量的增加而下降^[29] (Ⅲ级)。

研究胚胎活检对新生儿结局的影响, 显示胚胎活检后虽然出生胎龄降低, 但活检本身不会对宫腔内生长限制或者低体重造成影响^[30] (Ⅱ级)。

四、PGD/PGS 活检胚胎的冻融

指南意见: 活检胚胎采用玻璃化冷冻方法保存。

囊胚活检提供给遗传学分析的时间较短, 通常需要冻存胚胎^[6]。PGD/PGS 活检后胚胎的冷冻与复苏方法, 参照未活检胚胎的冻融方法^[6]。活检后胚胎玻璃化冷冻存活率高于慢速冷冻^[31] (Ⅱ级)。分裂期胚胎活检后的冷冻存活率要低于完整胚胎 (64.0% vs 92.0%), 而囊胚期胚胎活检后的冷冻存活率不低于完整胚胎 (95.7% vs 81.4%)^[32] (Ⅲ级)。D3 胚胎活检后培养至囊胚冷冻, D5 囊胚的存活率高于 D6 囊胚^[33] (Ⅲ级)。因此, 行囊胚期玻璃化冷冻是活检胚胎冷冻保存的可行且有效方法。

活检胚胎在冷冻过程中要一一对应, 避免混淆。胚胎编号要与检测样本以及诊断报告中保持一致, 避免人为的误诊。

五、PGD/PGS 的遗传学检测方法

指南意见: 染色体疾病的遗传学检测可采用芯片类 (如 SNP 芯片) 或者 NGS 检测方法。单基因病检测可采用基因的 PCR 扩增和/或测序技术。对突变位点检测同时在其附近寻找分子标记做连锁分析, 以降低 PCR 方法的误诊率。芯片类方法用于 PGS 的检测结果具有较高的一致性。

(一) 常用遗传学检测技术

胚胎的遗传学诊断是 PGD/PGS 实验室技术的重要步骤之一。传统的单细胞诊断方法主要有荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和聚合酶链式反应 (PCR)。近年来新的遗传学诊断技术, 如比较基因组杂交技术 (comparative genomic hybridization, CGH)、单核苷酸多态芯片检测技术 (SNP array)、以及新一代测序技术 (NGS) 等不断地应用于胚胎的遗传学检测。

1. PCR: PGD 最先使用的方法, 通过对基因组特定区域的特异性扩增, 结合凝胶电泳、酶切、测序等技术, 可以检测胚胎性别、特定基因的点突变、小片段缺失或插入等, 也可以通过 qPCR 检测染色体整倍性^[34]。目前 PCR 技术主要应用于单基因病的诊断。2014 年 ESHRE PGD 联盟通过 6 个 PGD 中心的以 PCR 技术为主的单基因病 PGD 数据, 计算出诊断方法的准确度为 93.7%、敏感度为 99.2%、特异度为 80.9%^[35] (Ⅳ级)。PCR 技术面临污染和等位基因脱扣的挑战, 容易出现假阳性或假阴性的结果而导致误诊, 因此建议和突变点附近的分子标记检测联合使用, 以降低 PCR 方法的误诊率^[4]。

2. FISH: 利用荧光标记的特异性探针与处于中期的胚胎卵裂球 DNA 杂交, 在荧光显微镜下观察荧光信号的数量与分布, 反映相应染色体的数目与结构^[36], 常用于检测 13、14、15、18、21、22、X 及 Y 染色体的数目异常。1994 年该技术被首次应用于胚胎性别诊断^[6]。用 DNA 插入文库来筛选结合邻近或跨越染色体断裂位点的 DNA 探针, 为染色体倒位或者平衡易位的携带者提供一种检测手段^[37], 卵裂球活检后检测染色体结构和数量的异常^[38]。传统的 FISH 使用的探针数目有限, 仅能检测部分染色体, 不能完全排除胚胎非整倍体的可能性, 最近也有将 FISH 应用于 24 条染色体整倍性检测的研究报道^[39]。此外受卵裂球固定效果和探针的非特异性结合等影响, 检测结果难于判断^[40], 有时需要根据经验做出主观判断, 影响了结果的准确性, 目前该方法有被其它技术取代的趋势。

3. CGH: 利用不同颜色的荧光标记待测样本和正常基因组的 DNA, 然后与正常人类中期染色体 (CGH) 或芯片 (array CGH, aCGH) 进行杂交^[41], 通过对比分析两种荧光强度, 反映待测样本 DNA 信息^[42-43]。传统的 CGH 需要制备中期染色体, 因而目前 aCGH 应用更为广泛。aCGH 可以在基因组水平检测染色体数目变化以及重复、缺失的情况^[44], 但是这种方法不能区分其分辨率以下的片段缺失和重复, 不能检测整倍性的改变^[45-46], 如三倍体胚胎、单亲二倍体没有办法判断。

4. SNP array: 针对人类基因组平均每 500 ~ 1 000 bp 即含有的 1 个单核苷酸多态性位点, 对基因组范围 SNP 位点的检测同时可以反映染色体数目异常及片段异常^[47]。SNP 芯片检测的优势在于分辨率高, 能够得到每个胚胎的 DNA 指纹信息, 在

分析染色体数目和片段异常的同时,可以诊断单亲二倍体,还可以确定妊娠胎儿是从哪一个胚胎发育而来^[41]。

5. NGS:为新一代测序,相对于传统的 Sanger 测序,改变了测序的规模化进程,能对几十万到几百万条 DNA 分子同时进行测序,但读长一般较短。将胚胎样本 DNA 打断,构建文库,通过测序后获得的序列信息与人类基因组数据库序列进行比对,可以分析染色体数量变化与片段异常^[48]。2008 年后全基因组测序费用呈指数下降,为 NGS 的临床应用提供了条件。

(二)遗传诊断技术的比较

1. 性别鉴定:可以采用 PCR 技术对 Y 染色体重复序列进行鉴定,也可选用 FISH 技术。早期研究对比了 PCR 和 FISH 在性别鉴定中的可靠性和精确性,结果发现 PCR 优于 FISH^[49](Ⅲ级),但 FISH 在倍性检测中具有优势^[50](Ⅲ级)。

2. 染色体结构异常检测:采用常用商业探针的 FISH 技术,可以区分平衡和非平衡的胚胎。如需区分正常或易位的染色体,则需要采用特殊制备的跨断点探针。aCGH 无法检测出多倍体。相比于传统的染色体核型分析技术,aCGH、SNP array 和 NGS 均无法检测出 DNA 拷贝数无变化的染色体结构变异如平衡易位、倒位等^[51](Ⅰ级)。

3. 单基因病检测:可采用基因的 PCR 扩增和/或测序技术。单基因病诊断用于特定的遗传病时,采用特异引物通过 PCR 技术诊断。

4. 非整倍体筛查:array CGH、SNP array、NGS 技术可以检测所有染色体的非整倍体和片段异常,已取代多轮杂交 FISH 技术。随机对照研究比较了 NGS 和 aCGH 两种方法行 PGS 的临床结果,发现 NGS 能够 100%检测 24 条染色体的非整倍体现象,结果和公认的 aCGH 结果一致;NGS 法行 PGS 后囊胚移植妊娠率达到 74.7%,胚胎种植率达 70.5%,与 aCGH 方法没有显著差异^[52](Ⅱ级)。对 aCGH、SNP array 和 NGS 三种方法对 24 条染色体整倍性检测的一致性研究显示,通过对 30 个囊胚活检结果的分析比较,发现这三种方法对非整倍体胚胎的检出率均为 100%,进一步对 720 条染色体的分析发现,NGS 与 aCGH 的一致性为 99.31%,与 SNP array 的一致性为 99.58%,均具有较高的一致性^[53](Ⅲ级)。

六、PGD/PGS 实验室质控

指南意见:PGD/PGS 实验室应建立严格的内部质控制度,并获得 PGD 资格认证。

胚胎活检的检出率是 PGD/PGS 实验室质控的重要指标。在 2 586 枚活检囊胚中,明确遗传检测结果的有 2 437 枚,检出率为 94.24%;未检出囊胚中,30 枚为扩增失败,单细胞扩增的失败率为 1.16%,可能与滋养层细胞缺失有关,也可能细胞发生了降解^[54](Ⅲ级)。

PGD/PGS 在临床上可以识别的错误发生率较低,但误诊的临床后果较为严重,导致受到遗传影响的孩子出生,或者妊娠终止,因此也是 PGD/PGS 实验室质控的重要指标。FISH 技术应用于胚胎染色体倍性分析,有报道在 30 965 例 PGD 移植周期中出现 19 例误诊,PGD 周期误诊率为 0.06%^[55](Ⅲ级),原因主要有探针的杂交失败、杂交信号重叠与分离造成的判别错误;PCR 技术的主要风险为等位基因脱扣,有报道在 7 759 例 PGD 移植周期中出现 12 例误诊,PGD 周期误诊率为 0.15%^[54](Ⅲ级);也有报道在以 qPCR 方法诊断出的 4 794 枚判断为整倍体的囊胚中,移植妊娠后发现 10 例差错,每枚囊胚的误诊率为 0.21%^[56](Ⅲ级);以 aCGH 方法诊断出的 579 枚判断为整倍体的囊胚中,移植妊娠后发现 5 例差错,每枚囊胚的误诊率为 0.86%^[57](Ⅲ级)。NGS 技术的测序错误和假阳性结果与测序深度有关,随着测序深度的提升,错误率下降。

因对诊断结果的可靠性要求高,PGD/PGS 实验室应对技术人员实施严格的专项培训,强化安全教育和操作流程的监督。同时,PGD/PGS 实验室应有内部质控,并尽可能通过外部认证。

内部质控的目的是维持实验室结果的稳定性。PGD/PGS 实验室应建立严格的内部质控制度,做好质控记录、差错记录的管理,并定期组织监督,检查质控制度落实情况。定期对技术操作结果进行数据统计与分析,计算胚胎活检中细胞损伤的比例、未得到诊断结果的细胞比例。以 1 年数据为依据,利用未移植胚胎复查计算误诊率。

外部认证是质量保障体系的最高标准。PGD/PGS 实验室质量的外部认证目前尚缺少质量认证的统一标准。ESHRE PGD 联盟推荐 PGD/PGS 实验室采用 ISO 15189 或同等级别的标准,并参加所在国家的 PGD 资格认证^[4](Ⅴ级)。质控方法参照中华医学会生殖医学分会“高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断和筛查技术规范(试行)”^[8]。

总 结

1. PGD/PGS 实验室管理上,强力推荐建立标准操作流程,在有效的质量管理体系下,建立成熟稳定的遗传检测相关技术,拓展 PGD/PGS 技术临床应用的广度、深度和精度,改善分娩结局。

2. 授精方式强力推荐采用 ICSI 方式,以避免亲源遗传物质的污染。胚胎培养强力推荐采用单滴培养方式,以确保胚胎和活检材料、活检结果一一对应。

3. 胚胎活检的时机强力推荐囊胚期滋养层细胞活检。透明带打孔的方法强力推荐激光法。活检方法推荐采用激光或机械切割法。滋养层细胞达到 A 级标准推荐活检 6 个以上细胞,达不到 A 级标准时推荐活检 3~6 个细胞。

4. 活检胚胎推荐采用玻璃化冷冻方法保存。

5. 染色体疾病的遗传学检测可采用芯片类或者 NGS 检测方法,单基因病检测可采用基因的 PCR 扩增和/或测序技术,对突变位点检测同时在其附近寻找分子标记做连锁分析,降低 PCR 方法的误诊率。

6. 推荐 PGD/PGS 实验室建立内部质控,并尽可能通过外部认证,保障检出率,降低误诊率。

【参 考 文 献】

- [1] Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts [J]. Nature, 1968, 218: 346-349.
- [2] Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' [J]. Hum Reprod, 2005, 20: 35-48.
- [3] Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening [J]. Hum Reprod, 2011, 26: 14-24.
- [4] Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD [J]. Hum Reprod, 2011, 26: 33-40.
- [5] Harton GL, Harper JC, Coonen E, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD [J]. Hum Reprod, 2011, 26: 25-32.
- [6] Harton GL, Magli MC, Lundin K, et al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) [J]. Hum Reprod, 2011, 26: 41-46.
- [7] PGDIS. Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance [J/OL]. Reprod Biomed Online, 2008, 16: 134-147.
- [8] 徐艳文, 黄国宁, 孙海翔, 等. 高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断和筛查技术规范(试行)[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26: 391-398.
- [9] Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection [J]. Hum Reprod Update, 2012, 18: 234-247.
- [10] Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, et al. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD [J]. Hum Reprod, 2009, 24: 1221-1228.
- [11] De Los Santos MJ, Apter S, Coticchio G, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015) [J]. Hum Reprod, 2016, 31: 685-686.
- [12] Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, et al. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis [J]. Hum Reprod, 1990, 5: 826-829.
- [13] Strom CM, Ginsberg N, Rechitsky S, et al. Three births after preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis with sequential first and second polar body analysis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1998, 178: 1298-1306.
- [14] Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body [J]. Biochem Mol Med, 1997, 62: 182-187.
- [15] Strom CM, Levin R, Strom S, et al. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants [J]. Pediatrics, 2000, 106: 650-653.
- [16] Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development [J]. Hum Reprod, 2013, 28: 509-518.
- [17] Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement [J]. Fertil Steril, 2007, 87: 534-541.
- [18] Goossens V, De Rycke M, De Vos A, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis [J]. Hum Reprod, 2008, 23: 481-492.
- [19] Scott RT, Jr Upham KM, Forman EJ, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial [J]. Fertil Steril, 2013, 100: 624-630.
- [20] Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, et al. Blastocyst

- biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1443-1449.
- [21] Magli MC, Montag M, Köster M, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26: 3181-3185.
- [22] De Rycke M, Belva F, Goossens V, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011 [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30: 1763-1789.
- [23] McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, et al. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84: 1628-1636.
- [24] Dumoulin JC, Bras M, Coonen E, et al. Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 2880-2883.
- [25] Harper JC, Coonen E, De Rycke M, et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008 [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25: 2685-2707.
- [26] Dokras A, Sargent IL, Ross C, et al. Trophectoderm biopsy in human blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 1990, 5: 821-825.
- [27] Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, et al. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human [J]. *Zygote*, 1997, 5: 351-354.
- [28] De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24: 2988-2996.
- [29] Zhang S, Luo K, Cheng D, et al. Number of biopsied trophectoderm cells is likely to affect the implantation potential of blastocysts with poor trophectoderm quality [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105: 1222-1227. e4.
- [30] Eldar-Geva T, Srebnik N, Altarescu G, et al. Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102: 1016-1021.
- [31] Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, et al. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20: 1615-1618.
- [32] Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage [J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19: 526-531.
- [33] Van Landuyt L, Verpoest W, Verheyen G, et al. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26: 316-322.
- [34] Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23: 901-906.
- [35] Dreesen J, Destouni A, Kourlaba G, et al. Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study [J]. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22: 1012-1018.
- [36] Vesela K, Tauwinklova G, Travnik P, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of chromosomal aberrations using the fluorescence in situ hybridization method (FISH)—introduction to problems, sampling methods and examination techniques [J]. *Ceska Gynekol*, 2003, 68: 89-94.
- [37] Cassel MJ, Munné S, Fung J, et al. 1997 Carrier-specific breakpoint-spanning DNA probes: an approach to preimplantation genetic diagnosis in interphase cells [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12: 2019-2027.
- [38] Weier HU, Munne S, Fung J. Patient-specific probes for preimplantation genetic diagnosis of structural and numerical aberrations in interphase cells [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16: 182-191.
- [39] Fernandez SF, Toro E, Colomar A, et al. A 24-chromosome FISH technique in preimplantation genetic diagnosis: validation of the method [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2015, 61: 171-177.
- [40] Munne S, Dailey T, Finkelstein M, et al. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13: 149-156.
- [41] Hu DG, Guan XY, and Hussey N. Gender determination and detection of aneuploidy in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 132: 135-151.
- [42] Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, et al. Technical update: preimplantation genetic diagnosis and screening [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2015, 37: 451-463.
- [43] Elias S. Preimplantation genetic diagnosis by comparative genomic hybridization [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1569-1571.
- [44] Wells D, Levy B. Cytogenetics in reproductive medicine: the contribution of comparative genomic hybridization (CGH) [J]. *Bioessays*, 2003, 25: 289-300.
- [45] Le Caignec C, Spits C, Sermon K, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e68.
- [46] Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11: 33-41.
- [47] Ling J, Zhuang G, Tazon-Vega B, et al. Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array [J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15: 739-747.

- [48] Fiorentino F, Bono S, Biricik A, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles [J]. Hum Reprod, 2014, 29: 2802-2813.
- [49] Findlay I, Corby N, Rutherford A, et al. Comparison of FISH PRINS, and conventional and fluorescent PCR for single-cell sexing; suitability for preimplantation genetic diagnosis [J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15: 258-265.
- [50] Grifo JA, Tang YX, Munné S, et al. Healthy deliveries from biopsied human embryos [J]. Hum Reprod, 1994, 9: 912-916.
- [51] Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening [J]. Fertil Steril, 2010, 94: 1173-1177.
- [52] Yang Z, Lin J, Zhang J, et al. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study [J]. BMC Med Genomics, 2015, 8: 30.
- [53] Huang J, Yan L, Lu S, et al. Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts [J]. Fertil Steril, 2016, 105: 1532-1536.
- [54] Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, et al. Consistent and reproducible outcomes of blastocyst biopsy and aneuploidy screening across different biopsy practitioners: a multicentre study involving 2586 embryo biopsies [J]. Hum Reprod, 2015, 31: 199-208.
- [55] Moutou C, Goossens V, Coonen E, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010 [J]. Hum Reprod, 2014, 29: 880-903.
- [56] Werner MD, Leondires MP, Schoolcraft WB, et al. Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low [J]. Fertil Steril, 2014, 102: 1613-1618.
- [57] Tiegs AW, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, et al. Discrepant diagnosis rate of array comparative genomic hybridization in thawed euploid blastocysts [J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33: 893-897.

[编辑:罗宏志]