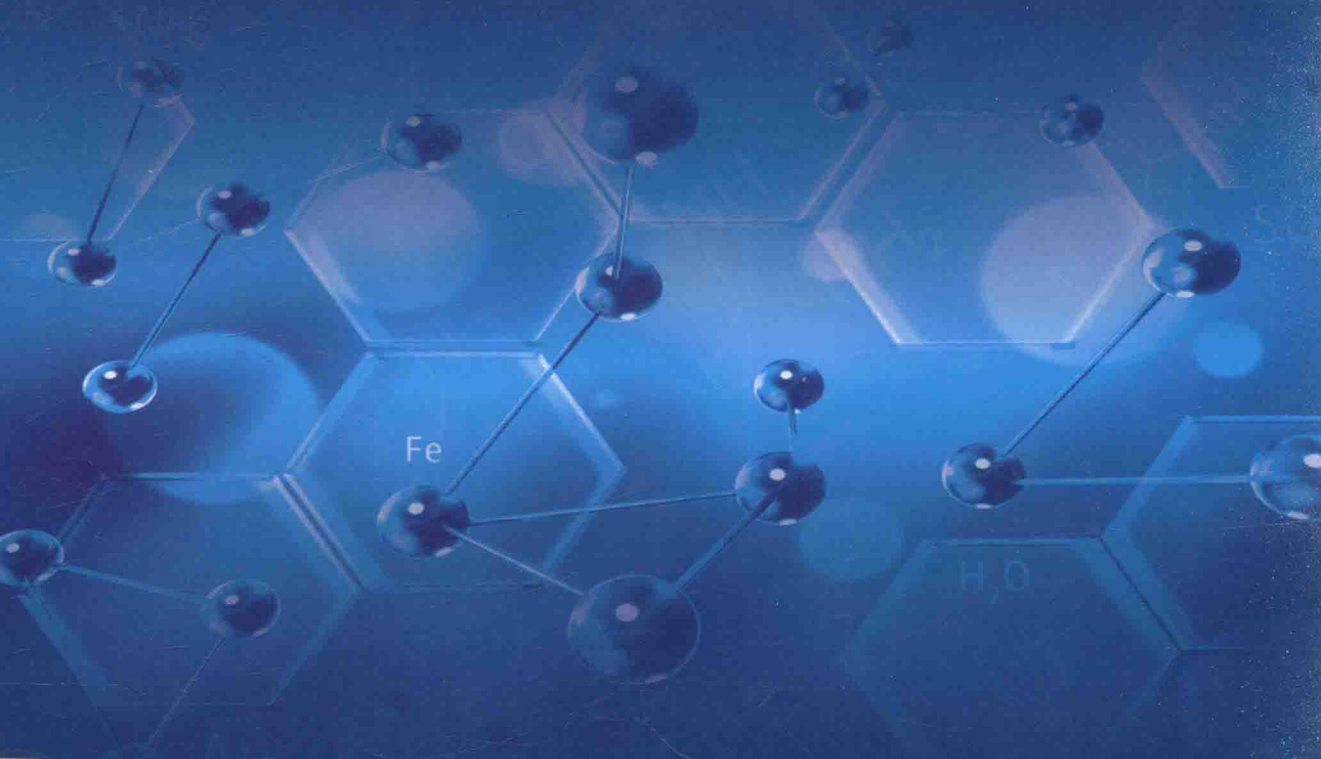


临床分子诊断 分析前与分析后

Pre and Post-examination of
Clinical Molecular Diagnostics

主 编 李 艳 李金明



科学出版社

临床分子诊断分析前与分析后

**Pre and Post-examination of
Clinical Molecular Diagnostics**

主 审 张 曼

主 编 李 艳 李金明

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书包括临床分子诊断分析前与分析后的相关内容与质量控制。首先介绍了临床实验室开展分子诊断项目检测必备的条件、项目选择的基本原则与依据、常用的分子诊断技术以及人员配置与要求。临床分子诊断分析前部分重点阐述了分析前的主要内容与质量控制,包括标本类别的选择与采集流程、标本采集前注意事项、标本稳定性、标本运输、标本接收与处理以及标本的储存等。临床分子诊断分析后部分重点阐述了分析后的主要内容与质量控制,包括基因变异的基本知识、临床报告内容及注意事项等,并在肿瘤、遗传病、感染性疾病、无创产前筛查和 PGS/PGD 五个方面举例分析了分子诊断报告的全过程。

本书具有很强的实用性和前瞻性,适合临床医师、检验人员、药剂师、分子诊断科研和教学工作者学习参考。

图书在版编目(CIP)数据

临床分子诊断分析前与分析后/李艳,李金明主编.—北京:科学出版社,2017.6

ISBN 978-7-03-053092-9

I. 临… II. ①李… ②李… III. 分子生物学—实验室诊断 IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 103645 号

责任编辑:程晓红 / 责任校对:何艳萍

责任印制:肖 兴 / 封面设计:吴朝洪

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017 年 6 月第一次印刷 印张:20

字数:470 000 千字

定价:100.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

编著者名单

主 审 张 曼
主 编 李 艳 李金明
副主编 关 明 黄宪章 童永清
编 者 (中国医师协会检验医师分会血液肿瘤个体化诊断检验医学专家委员会全体委员,以姓氏汉语拼音为序)

陈 鸣	第三军医大学第三附属医院	秦 雪	广西医科大学第一附属医院
高 红	青海省临床检验中心	陶志华	浙江大学医学附属第二医院
关 明	复旦大学附属华山医院	童永清	武汉大学人民医院
郭晓临	中国医科大学附属第一医院	王卫华	宁波大学医学院附属医院
韩平治	甘肃省人民医院检验中心	韦叶生	右江民族医学院附属医院
胡志东	天津医科大学总医院	徐 建	南京医科大学第一附属医院
黄宪章	广州中医药大学第二附属医院	杨 惠	四川大学华西第二医院
姜 饶	中山大学附属第一医院	袁 宏	大连医科大学附属第一医院
李 冬	同济大学附属同济医院	袁 慧	首都医科大学附属北京安贞医院
李 艳	武汉大学人民医院	张 瑞	卫生部临床检验中心
李金明	卫生部临床检验中心	张 义	山东大学齐鲁医院
林 婴	四川省人民医院	张淑芳	海南省海口市人民医院
梅 冰	湖北省荆州市中心医院	张志珊	福建医科大学附属第二医院
欧启水	福建医科大学附属第一医院	赵建忠	湖北省襄阳市中心医院
欧阳娟	中山大学附属第一医院	郑 磊	南方医科大学南方医院

参编人员 (以姓氏汉语拼音为序)

晁 艳	广州中医药大学第二附属医院	邓亚云	武汉大学人民医院
陈浩俊	武汉大学人民医院	冯丽娜	武汉大学人民医院
陈耀光	湖北省荆州市中心医院	姜树朋	武汉大学人民医院
陈占国	武汉大学人民医院	李 滔	湖北省荆州市中心医院
崔 艳	武汉大学人民医院	刘 欢	武汉大学人民医院
戴 雯	武汉大学人民医院	刘维薇	复旦大学附属华山医院

吕永楠	武汉大学人民医院
牛志立	武汉大学人民医院
潘宗伟	武汉大学人民医院
彭锐	武汉大学人民医院
乔斌	武汉大学人民医院
任玮	武汉大学人民医院
孙思	武汉大学人民医院
王方平	武汉大学人民医院
王京伟	武汉大学人民医院
熊格	武汉大学人民医院

徐万洲	武汉大学人民医院
许淑文	武汉大学人民医院
杨晓燕	武汉大学人民医院
杨勇文	武汉大学人民医院
袁乐勇	武汉大学人民医院
赵锐	武汉大学人民医院
郑红云	武汉大学人民医院
周方元	武汉大学人民医院
祝成亮	武汉大学人民医院

序

从1952年人类确定DNA是遗传物质开始,分子诊断进入医学视野,1983年PCR的发现实现了体外核苷酸片段的扩增,以及1987年Sanger法自动化测序仪的诞生,加速了分子诊断的临床应用,尤其是2000年人类基因组计划的完成和高通量测序技术的发展与完善,分子诊断在医学疾病诊断、预后判断、疗效监测及合理用药等方面的应用进入了全新的时代。

分子诊断技术具有特异性好、灵敏度高、针对性强、诊断快速等优点,但同一实验室不同检测批次或不同实验室针对同一标本的检测结果存在很大差异,一定程度上限制了分子诊断技术在临床诊断的应用,因此需要解决检测方法标准化的问题。我国的分子诊断技术也还存在方法不够成熟和稳定性、规范性较差的问题。因此,目前迫切需要建立标准化的实验操作程序,保证分子诊断安全、有效。

该书前半部分重点阐述了从临床医师申请医嘱到标本预处理的内容,涉及标本类别的选择与采集流程、标本采集前注意事项、标本稳定性、标本运输、标本接收与处理及标本的储存等。后半部分重点阐述了检测分析中、分析后的所有内容,涉及基因变异的基本知识、临床报告内容及注意事项等,并在肿瘤、遗传病、感染性疾病、无创产前筛查和PGS/PGD五个方面举例分析了分子诊断报告的全过程。

该书不仅为临床实验室开展临床分子诊断检测提供了质量保障,也为检验医师完成临床分子诊断检测报告、临床沟通与咨询提供了参考依据,有利于检验医师对临床分子诊断全过程的质量控制。

该书以“中国医师协会检验医师分会血液肿瘤个体化诊断检验医学专家委员会”全体委员和“武汉大学人民医院检验医学中心”为主体进行编写,内容丰富,主题鲜明突出,实用性强,是我国从事精准医疗和临床分子诊断领域的专业工作者不可或缺的优秀参考书籍。

中国医师协会检验医师分会会长 张 曼

2017年4月10日

序 二

在《临床分子诊断分析前与分析后》即将出版之际,本人应邀欣然作序。

个体化医疗是以分子诊断为基础,借助基因组学技术、蛋白质组学技术及生物信息学与大数据科学的交叉应用,精确寻找到疾病的原因和治疗的靶点,并对疾病不同状态和过程进行精确分类,最终实现疾病和特定患者个体化的精准治疗目的。截至 2017 年初,可根据临床分子诊断进行个体化医疗的疾病病种已多达 4949 种,涉及相关基因 5875 个,并已在 700 多家 CAP 认证实验室开展。国内的个体化医疗也在迅速发展。

ISO15189、CAP 和 CLSI 等机构逐步将分子诊断质量控制纳入到管理体系中,而分子诊断检测分析前和分析后质量控制对检测结果的准确性和可靠性至关重要,是决定分子诊断检测结果的关键性环节。

《临床分子诊断分析前与分析后》系统全面地介绍了临床实验室开展分子诊断的基本条件、分析前与分析后的主要内容和质量控制,为个体化医疗分子诊断的质量保障提供了很好的参考,具有很好的实用性和前瞻性。

相信该书的推出,不仅有助于临床医师、检验人员、药剂师、科研及教学工作者全面了解分子诊断质量控制,促进我国个体化医疗的发展;也有利于规范化个体化医疗中临床分子诊断分析前与分析后的质量控制,提高检测质量,为个体化医疗的开展和质量保障提供技术支持和科学依据。

中国医师协会检验医师分会候任会长 尚 红

2017 年 3 月 1 日

序 三

2003 年人类基因组计划的完成开启了医学研究与临床实践的基因组时代,随着检测技术的飞速发展和循证数据的不断积累,越来越多的基因检测项目被纳入疾病诊疗指南,为医疗保健和公共卫生转向精准化与个体化提供了坚实的基础。

临床分子诊断项目如雨后春笋般兴起,如何对临床分子检测进行过程监管、质量控制,更好地为临床疾病诊疗提供精准可靠的依据,促进个体化医疗的健康发展,是迫切需要解决的问题。

《临床分子诊断分析前与分析后》一书从临床分子检测的全过程控制中的难点入手,规范了分子诊断分析前和分析后的操作流程,为分子诊断分析前和分析后的质量控制提供了参考,为提高分子诊断结果的准确性和可靠性提供了保障。

该书详细介绍了我国临床实验室常用分子诊断技术与平台,并着重阐述了实验室选取自建检测项目的原则和依据,同时对临床分子诊断从业人员提出了相应的资质要求和职责分工,为分子诊断分析前与分析后的质量控制提供了保障。

该书描述了分子诊断在不同类型疾病应用中的结果分析与报告解读的注意事项,并结合临床应用实例,为个体化的分子诊断报告内容与形式设计提供了依据。同时,对临床分子诊断分析前与分析后的风险评估和过程管理进行了阐述,有利于实验室分子检测质量控制的持续改进。

该书主题新颖、内容翔实,凝集了编者团队的辛勤付出。对现阶段从事个体化医疗及临床医学、分子诊断学、分子病理学和药物基因组学等有关学科的国内临床、科研及教学工作者而言,是一本不可多得的优秀专业参考书籍。

复旦大学附属中山医院 潘柏申

2017 年 3 月 20 日

前言

2015年美国宣布启动“精准医疗计划”，尝试通过收集基因组学和其他分子学信息为患者提供个体化医疗。同年，中国成立了“精准医疗战略专家组”，由国家卫生与计划生育委员会和科技部牵头，启动精准医疗计划，积极跟进精准医疗的研究，中国精准医疗计划的正式启动预示着中国正式进入个体化医疗时代。个体化医疗是以分子诊断为基础，借助基因组学技术、蛋白质组学技术，以及生物信息学与大数据科学的交叉应用，对大样本人群特定疾病类型进行生物标志物的分析与鉴定、验证与应用，精确寻找到疾病的原因和治疗的靶点，并对疾病不同状态和过程进行精确分类，最终实现疾病和特定患者个体化的精准治疗目的，从而为疾病的诊断、治疗、预防与预后评价等提供信息和决策依据。截至2017年2月7日，可根据临床分子诊断进行个体化医疗的疾病病种已多达4948种，涉及相关基因5874个，涉及心血管疾病、代谢性疾病、内分泌疾病、线粒体疾病和肿瘤等。越来越多的基因检测被纳入疾病诊断指南，用于疾病的诊断、治疗、预防与预后评价等个体化医疗。临床分子诊断涉及的基因众多，覆盖的专业领域广泛，无论是临床实验室技术人员还是临床医师，迫切需要充分认识临床分子诊断分析前及分析后的内容及质量控制，为临床分子诊断检测提供质量保障。这也是本书编写的初衷。

本书从临床实验室常用分子诊断项目入手，阐述了项目选择的原则及依据、检测平台建立、常用的分子诊断技术和人员配置与要求，为建立规范化的临床分子诊断实验室提供了参考。随后阐述了从临床医师申请医嘱到标本预处理的临床分子诊断分析前的主要内容与质量控制，包括标本类别的选择与采集流程、标本采集前注意事项、标本稳定性、标本运输、标本接收与标本处理及标本储存等。还阐述了检测后包括基因变异的基本知识、临床报告内容及注意事项等，并在肿瘤、遗传病、感染性疾病、无创产前筛查和PGS/PGD五个方面举例分析了分子诊断报告的全过程。为了便于临床医师或相关标本采集人员知晓环境对核酸的影响，详细阐述了采集用具对核酸的影响，有利于根据检测项目的要求选择恰当的采集用具。此外，本书还就临床分子诊断中的生物安全及医学伦理学问题进行了讨论，以期能够为临床医师和从事临床分子诊断的工作人员在实际工作中遇到生物安全问题，以及伦理和法律问题提供帮助。

本书的编者以“中国医师协会检验医师分会血液肿瘤个体化诊断检验医学专家委员会”全体委员和“武汉大学人民医院检验医学中心”为主体，在编写过程中，我们尽可能结合自身的实际工作经验，同时查阅了大量的国内外文献、书籍、临床疾病诊疗指南和分子诊断领域相关的标准，用近一年半的时间对本书进行了精雕细琢，使之尽可能条理清晰、图表丰富，内容系统、

全面。本书可供从事个体化医疗及临床医学、分子诊断学、分子病理学和药物基因组学等有关学科的临床、科研及教学的工作者参考,同时也可以作为培训和医学继续教育的教材,特别适合作为本科生、研究生及博士后的学习教材。

由于编者水平有限,参编人员较多,书中不可避免存在重复乃至错误之处,诚恳欢迎广大读者和专家批评指正,以供我们再版时修改完善。

武汉大学人民医院检验医学中心主任 李 艳
国家卫生与计划生育委员会临床检验中心副主任 李金明

2017年2月25日

目 录

第1章 绪论	(1)
第一节 个体化医疗的发展与现状	(1)
第二节 临床分子诊断与个体化医疗	(3)
一、基因扩增技术	(4)
二、基因测序技术	(4)
三、分子杂交技术	(4)
第三节 分子诊断检测平台的建设	(5)
一、常见的分子诊断项目与分子检测平台	(5)
二、分子检测平台建设实践	(6)
第四节 分子诊断人员能力要求	(7)
一、职责	(7)
二、培训内容	(8)
第五节 个体化医疗的展望	(8)
第2章 检测项目的选择依据和平台设置	(10)
第一节 分子诊断的常见检测项目	(10)
一、病原微生物检测	(10)
二、肿瘤相关基因检测	(12)
三、常见遗传病基因检测	(15)
四、药物相关基因检测	(18)
第二节 分子诊断检测平台的设置	(21)
一、定性 PCR 检测平台	(21)
二、荧光定量 PCR 检测平台	(22)
三、基因芯片检测平台	(22)
四、Sanger 测序检测平台	(23)
五、高通量测序检测平台	(23)
六、质谱检测平台	(25)
第三节 项目选择的基本原则及依据	(25)
一、基本要求	(25)
二、依据	(30)
第3章 个体化医疗分子诊断适宜技术	(34)

第一节 常用的个体化医疗分子诊断技术	(34)
一、实时荧光定量 PCR 技术	(34)
二、定性 PCR 技术	(46)
三、基因芯片技术	(60)
四、核酸分子杂交技术	(67)
五、染色体核型分析	(74)
六、Sanger 测序技术	(82)
七、高通量测序技术	(85)
八、质谱技术	(90)
第二节 分子诊断技术选择的基本原则	(94)
一、以测序技术为基础的分子诊断技术	(94)
二、以扩增技术为基础的分子诊断技术	(95)
三、以分子杂交为基础的分子诊断技术	(97)
第三节 分子诊断检测技术与平台建设	(98)
一、实时荧光定量 PCR 技术	(98)
二、定性 PCR 技术	(99)
三、基因芯片技术	(100)
四、测序技术	(101)
五、核酸杂交技术	(104)
六、染色体核型分析技术	(105)
七、生物质谱技术	(106)
第 4 章 人员配置与要求	(108)
第一节 实验室人员的职责	(108)
一、人员配置的原则	(108)
二、实验室人员的资质与职责	(109)
第二节 分子诊断人员的培养	(111)
一、检验技师	(111)
二、检验医师	(112)
三、生物信息学人员	(113)
第 5 章 分子诊断分析前的质量控制	(115)
第一节 标本类别及采集流程	(115)
一、血液标本	(116)
二、组织标本	(116)
三、产前诊断标本	(116)
四、骨髓标本	(118)
五、尿液标本	(118)
六、粪便标本	(119)
七、尿道及宫颈标本	(120)
八、痰液标本	(120)

九、支气管肺泡灌洗液标本	(121)
十、其他标本	(121)
第二节 标本采集前注意事项	(122)
一、肿瘤组织标本	(122)
二、血液标本	(123)
三、骨髓标本	(124)
四、体液标本	(124)
第三节 标本的稳定性	(125)
一、外周血标本	(125)
二、组织标本	(125)
三、其他标本	(126)
第四节 标本运输设备与条件	(127)
一、运输设备	(127)
二、运输条件	(127)
第五节 标本接收与处理	(128)
一、标本拒收标准与妥协	(128)
二、细胞富集/筛选	(129)
三、病原体富集和浓缩方法	(129)
第六节 标本储存	(130)
一、原始标本	(130)
二、DNA 标本	(131)
三、RNA 标本	(131)
四、分离的细胞标本	(131)
第 6 章 分子诊断分析后的质量控制	(133)
第一节 基因变异及临床报告	(133)
一、基因变异及诊断依据	(133)
二、临床报告前涉及的内容	(152)
三、临床分子诊断检测流程及注意事项	(155)
第二节 报告模式与案例分析	(160)
一、肿瘤分子诊断结果报告	(160)
二、遗传病分子诊断结果报告	(177)
三、感染性疾病分子诊断结果报告	(190)
四、无创产前筛查结果报告	(206)
五、PGD/PGS 检查结果报告	(217)
第 7 章 分析前与分析后的风险评估和过程管理	(245)
第一节 风险评估与过程管理	(245)
一、风险管理	(245)
二、过程管理	(247)
第二节 分子诊断实验室的分析前风险管理	(249)

一、风险识别	(249)
二、风险评估	(250)
三、风险控制和风险监控	(251)
第三节 分子诊断实验室的分析后风险管理	(252)
一、风险识别	(252)
二、风险评估	(252)
三、风险控制和风险监控	(253)
第8章 采集用具对检验结果的影响	(254)
第一节 样本采集用具的选择	(254)
一、血液标本	(254)
二、体液标本	(256)
三、组织标本	(257)
四、产前诊断标本	(258)
第二节 样本采集用具对检验结果的影响	(259)
一、真空采血管	(259)
二、其他采集器具	(261)
第9章 分子诊断实验室的生物安全	(263)
第一节 生物安全的概念及意义	(263)
一、概念	(263)
二、重要意义	(264)
第二节 分子诊断实验室生物安全的基本原则	(265)
一、科学合理	(265)
二、安全首位	(265)
三、管理严格	(265)
四、远离病原体	(265)
五、预防为主	(266)
第三节 生物安全操作及管理要求	(266)
一、样本采集、运输和保存	(266)
二、样本保存	(269)
三、标本的影响因素及前处理	(270)
第四节 分子诊断实验室的污染来源及防污染措施	(270)
一、污染主要来源	(270)
二、防污染措施	(271)
第五节 操作规程化的安全操作要点	(273)
一、一级和二级生物安全防护实验室	(273)
二、三级生物安全防护实验室	(274)
第六节 生物安全技术管理要素	(276)
一、实验室中标本的安全操作	(276)
二、标本容器的选用	(276)

三、标本在设施内的传递	(276)
四、标本接收	(276)
五、打开包装	(276)
六、移液管和移液辅助器的使用	(276)
七、避免感染性物质的扩散	(277)
八、生物安全柜的使用	(277)
九、避免皮肤和眼睛的接触	(278)
十、避免感染性物质的注入	(278)
十一、血清的分离	(278)
十二、离心机的使用	(278)
十三、匀浆器、摇床、搅拌器和超声处理器的使用	(279)
第 10 章 分子诊断的医学伦理	(281)
第一节 基因伦理学	(282)
一、基因诊断与法律法规	(283)
二、医学社会学问题	(284)
第二节 基因诊断的伦理问题	(285)
第三节 基因诊断医学伦理学涉及的主要问题	(288)
一、产前诊断的伦理研究	(288)
二、基因歧视问题	(292)
三、基因隐私问题	(293)
四、人类基因诊断与检测中的知情同意权问题	(294)
第四节 遗传病筛查的伦理问题	(295)
一、遗传筛查	(296)
二、出生后遗传病检测	(297)
第五节 临床分子诊断的医学伦理学案例分析	(298)
一、知情同意书	(298)
二、家庭信息泄露、保密并有责任告诫	(299)
三、不充分的基因检测	(299)

第 1 章

绪 论

● 内容提要

随着现代分子生物学的发展、人类基因组计划的完成、药物基因组学和药物遗传学的深入研究,个体化医疗已颠覆了传统的医疗模式,将疾病的早期诊断、预后判断、疗效监测及合理用药等方面的应用引入了全新的时代。同时,分子诊断技术的飞速发展也为个体化医疗的临床实际应用提供了全新的契机。本章简要介绍了个体化医疗的发展与现状、分子诊断的平台建设及人员能力要求,期望能够指导临床医师和分子诊断实验室工作人员正确开展个体化医疗相关的分子诊断项目。

当有医学实践时就产生了个体化医疗。广义的个体化医疗是指医师使用体外试验、成像技术及症候学等诊断工具,确定某一特定疾病状况,然后采用合适的治疗方式和药物。但随着检测技术的不断发展和进步,个体化医疗的定义也进一步明确,是指通过分子诊断检测个体基因及表达上的差异,然后进行针对性的药物治疗。应指出的是个体化医学并不意味着给每例患者生产特定的药品或医疗设备,而是指按照个体对某种特定疾病易感性的不同或对某种特定治疗反应性的不同把人分为不同的亚群,进而对患者进行有效的预防或治疗性干预,从而达到节约费用和避免副作用的目的。

第一节 个体化医疗的发展与现状

20 世纪以来,医学在现代技术的帮助下发生了巨大变化,在疾病的预防、诊断和治疗等方面取得了长足的进步,疾病的诊断和治疗方法得到很大的丰富和发展,然而这些方法的选择仍然带有较重的经验主义色彩,缺乏较为科学的客观依据,因此经常导致诊疗效率低下问题的出现。循证医学(evidence-based medicine,EBM)的出现在很大程度上改善了这种不足,它以多中心随机对照为原则,对大量已发表的数据进行科学评价并将其合理应用于患者的诊疗,极大地纠正了医学中的非科学因素,使诊疗方法的使用更为科学和合理。然而,循证医学基本上是采用统计学分析,通过集体的来说明个体的有效性为原则,虽然从整体的来看是科学合理的,但循证医学尚不能很好地解释一些疾病诊疗效果中的个体差异。

随着现代分子生物学的发展,人类基因组计划(human genome project,HGP)的完成,人类对自身基因组的信息有了完整的了解。继 HGP 后,国际人类基因组单体型图计划建立了

人体全基因组遗传多态图谱,描述了人体基因组中常见遗传多态性的形式、目录及位置,并呈现了在同一群体内部和不同人群间遗传差异的分布状况,为疾病的易感性研究及个体化差异提供了科学基础。

著名分子医学网站 Genetest 的统计结果显示,截至 2016 年 4 月 21 日,可根据个体基因诊断的疾病病种已多达 4571 种(图 1-1),涉及相关基因 5 395 个(图 1-2),可提供基因检测经过

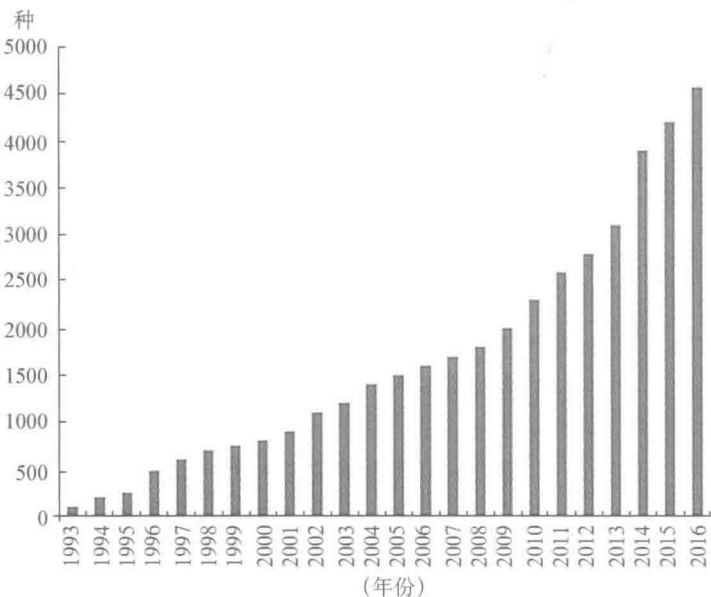


图 1-1 1993—2016 年基因相关疾病增长趋势

注:医学网站 Genetest 的统计结果

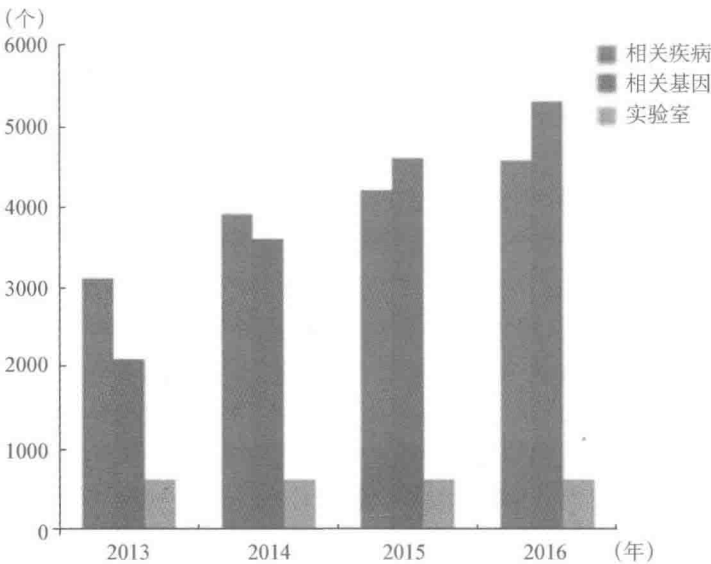


图 1-2 2013—2016 年基因相关疾病、相关基因、实验室增长趋势

注:医学网站 Genetest 的统计结果