

· 综述 ·

脊髓性肌萎缩症新生儿筛查研究进展

钟玉杭* 黄小玲 孙志豪

南方医科大学附属东莞妇幼保健院东莞市新生儿疾病筛查中心 (广东 东莞 523000)

【摘要】 脊髓性肌萎缩症(SMA)作为2岁以内致死率最高的遗传病。随着诺西那生钠、利司普兰等修正治疗药物纳入医保,新生儿时期开展筛查成为SMA早诊早治,获得良好预后的关键。临床上用于拟诊SMA的检测方法有实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)和多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)。在孕前或产前的携带者筛查中,专家推荐使用qPCR进行初筛,MLPA进行验证。但针对新生儿期筛查,需要根据新筛原则选择适合的检测技术和方法学来满足需求。本文对可用于SMA新生儿筛查的技术方法学进行综述,为大规模开展新生儿人群SMA筛查的方法学选择提供参考。

【关键词】 脊髓性肌萎缩症; 新生儿筛查; MLPA

【中图分类号】 R746.4

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.07.02

Research Progress of Neonatal Screening for Spinal Muscular Atrophy

ZHONG Yu-hang*, HUANG Xiao-ling, SUN Zhi-hao.

Dongguan Neonatal Disease Screening Center, Dongguan Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Southern Medical University, Dongguan 523000, Guangdong Province, China

Abstract: Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic disease with the highest mortality rate within 2 years of age. With the inclusion of nosinasan sodium, risapram and other modified treatment drugs in medical insurance, neonatal screening has become the key to early diagnosis and treatment of SMA and good prognosis. Quantitative Real-time PCR (qPCR) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) have been used to detect SMA clinically. In pre-pregnancy or prenatal carrier screening, experts recommend the use of qPCR for primary screening and MLPA for validation. This article reviews the techniques and methodologies that can be used for SMA neonatal screening, and provides a reference for the selection of methodologies for large-scale SMA screening in the neonatal population.

Keywords: Spinal Muscular Atrophy; Newborn Screening; MLPA

1891年,奥地利病理学家Guido Werdnig首次报告了脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)^[1],是由于脊髓前角运动神经元变性,引起以肌无力、肌萎缩为临床特征的常染色体隐性遗传病(AR)。有研究报道新生儿时期发病率为1/6000~1/10000^[2],人群携带率约为1/42^[3],是婴幼儿期致死性最高的遗传性疾病。

近10年,随着药物治疗取得重大突破^[4],SMA成为有药可医的罕见病。2019年2月,国家药品监督管理局(NMPA)正式批准了诺西那生钠(活性成分:诺西那生)上市,开启国内SMA精准治疗新时代^[5],2021年6月,第二款SMA治疗药物利司普兰口服液在中国上市。随后,2款药物于2022,2023年纳入医保,使得SMA治疗有保可依,减轻了患者家庭负担。

国内,SMA筛查主要集中于育龄人群携带者^[6-8],尚未普及开展新生儿期SMA筛查,几乎所有患儿就诊时已有明显的肌无力症状^[9]。新生儿筛查是保证SMA早诊早治,获得良好预后的关键。截止2022年,SMA新生儿筛查已在美国(筛查数量:2395718,发病率:1/13,310)、日本(筛查数量:22209,发病率:0)、澳大利亚(筛查数量:202388,发病率:1/10,652)、加拿大(筛查数量:139810,发病率:1/27,962)、意大利(筛查数量:58558,发病率:1/4880)、俄罗斯(筛查数量:12000,发病率:0)、德国(筛查数量:297163,发病率:1/6911)、比利时(筛查数量:127329,发病率:1/14,148)等^[10-13]国家开展。中国台湾^[14]、浙江杭州^[15]率先开展新生儿SMA筛查的临床方法学探索研究,为我国SMA新生儿筛查开展积累了经验。但针对新生儿筛查体系,如何选择满足新筛原则的技术方法学仍然需要不断的积累经验和创新^[16]。例如基于DBS样本的极微量DNA检测方法学开发,不同实验环境的结果判读参考区间制定及稳定性,准确性评估等。本文对SMA新生儿筛查的相关研究进行综述,为广大临床工作者了解新生儿人群SMA筛查技术提供帮助。

1 SMA分子病理及临床表现

SMA是脊髓前角 α -运动神经元退化变性引起的肌无力、肌萎缩为主要特征的疾病。运动神经元主要是将脊髓及大脑的信号传输至肌肉和内分泌腺,通过一系列的神经传导支配身体的效应器官活动。运动神经元存活基因1(SMNI; OMIM 600354)双等位基因发生致病变

异影响运动神经元存活蛋白表达,导致信号传导异常。SMN1位于染色体5q13,该区域500kb范围内还存在1个高度同源的SMN2(SMNC)基因,二者仅相差5个碱基,其中2个碱基位于外显子7(c.840C/T)和8(c.*239G/A)中,另外3个位于第6、7内含子。SMN基因终止密码子位于外显子7的3'末端,外显子8不编码氨基酸,因此,SMN1和SMN2的编码区序列仅在外显子7中存在1个差异碱基(c.840C/T)。c.840T破坏了剪接增强子(ESE)活性,使得SMN2基因外显子7被剪接掉,产物为截短体,导致有功能的SMN蛋白只占10%^[17]。正常人群中两条染色体上各有一个等位SMN1拷贝,在肯定者人群中约有4%的频率会出现两个SMN1拷贝存在于同一条染色体上,形成[2+0]型携带者,SMN2修饰基因拷贝数可以0~5不等。5%~10%的正常人同源缺失SMN2基因,因此普遍认为SMN2基因不是运动神经元生存所必须的。研究显示,95%~98% SMA患者存在SMN1基因纯合缺失,主要是SMN1基因第7号外显子的纯合缺失,另有2%~5% SMA患者存在复合杂合突变。此外,SMN1基因启动子区域的异常也会影响基因表达及蛋白功能。

SMA临床表现为进行性、对称性肌无力与肌萎缩,近端比远端严重,下肢无力重于上肢,通常不累及眼外肌、膈肌、心肌、面部表情肌,亦无中枢神经系统异常^[18]。神经肌电图显示为典型的神经源性损害,静息时可见纤维颤动波和正锐波,规律自发性运动单元活动单位是SMA的肌电图的特征性改变^[19]。血清酶学检测可以检测到肌酸激酶的异常升高。

根据起病年龄、运动里程碑及病情进展程度将脊髓性肌萎缩症分为0~IV型,发病年龄越早病情越重^[20]。脊髓性肌萎缩症0型患儿一般在出生前发病,若不治疗,一般存活不超过1个月;脊髓性肌萎缩症I型(Werdnig-Hoffman病),[OMIM253300],亦称严重型,患儿于6月龄以内发病,全身出现严重肌无力和肌张力减弱,腱反射消失或减退,没有倚托不能坐,通常在2岁前因肺部感染而死亡,是临床类型最严重类型;脊髓性肌萎缩症II型[OMIM 253550],又称中间型,患儿于出生后6~18个月发病,肢体的近端对称无力为主,下肢比上肢重,能坐却不能站立、行走,大多数患儿能存活到青少年;脊髓性肌萎缩症III型(Kugelburg-Welander病),[OMIM253400],多数儿童期或青春

【第一作者】钟玉杭,女,副主任技师,主要研究方向:新生儿遗传代谢病筛查。E-mail: 369035874@qq.com

【通讯作者】钟玉杭

期发病,患儿可以独立走动,病情缓慢,能存活到成年;脊髓性肌萎缩症IV型[OMIM271150],亦称为成年型,临床表现较轻,发病和进展隐匿,生存时间与常人相近,但患者可有行走困难^[21]。

2 SMA筛查技术

2.1 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) PCR-RFLP基本原理是通过PCR扩增目标序列,利用限制性内切酶切割扩增产物形成长短不一的DNA片段,经过琼脂糖凝胶电泳进行区分。可以根据SMN1与SMN2基因第7和8外显子间碱基不同,形成限制性内切酶位点差异,对SMN1存在的缺失进行区分。白晋丽等^[22]统计了2004年1月至2017年12月采用不同基因诊断技术出具的诊断报告人数和构成比,结果表明PCR-RFLP是常用于早期诊断SMA的技术,但由于不能检测SMN1基因单拷贝状态,会导致对致病变异是复合杂合型的患者产生漏诊或误诊现象^[23]。2012年,金煜炜等^[24]使用PCR-RFLP与MLPA技术对339例疑似病例开展分析,结果显示PCR-RFLP发现194例SMN1纯合缺失,MLPA发现196例,两种技术的一致性达到98.9%,无显著差异($\chi^2=0.2, P=0.88$)。PCR-RFLP仅发现4例SMN1疑似杂合缺失,而MLPA验证有17例,二者一致性为23.5%,存在显著差异($\chi^2=8.29, P<0.01$)。因此,PCR-RFLP尽管特异性高,但对于SMN1杂合缺失并存在点突变的病例仍存在局限性。

2.2 多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) MLPA方法是目前SMN基因拷贝数检测的金标准。以SMN基因的外显子7及外显子8作为靶标,利用外显子上的差异位点设计杂交探针,对每段靶序列/靶位点设计一对寡核苷酸探针。将待测DNA样品变性后与探针进行杂交,当左右两侧的探针都杂交到目标区域时,探针可以被连接酶连接然后进行PCR扩增。MLPA与一般PCR方法的不同之处在于,被扩增的并非靶序列本身,而是被连接起来的探针。此外,还需要使用参考探针,引入多个管家基因作为内参基因进行定量。目前基于MLPA技术已经开发了稳定的SMA拷贝数检测商品化试剂盒,能检测SMN1第7和8外显子拷贝数,明确区分患者、携带者及正常人,同时可检测患者SMN2拷贝数,SMN2作为修饰基因能为临床干预策略制定提供有用的信息^[25-26]。由于该方法对DNA的实验操作复杂,周期较长,成本高、对杂质比较敏感,不适合大规模筛查,也不能用于鉴定SMN1的微小突变及[2+0]型携带者^[27],通常被用作技术对比和验证。

2.3 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR) qPCR主要原理是基于PCR扩增技术,利用Taqman探针法或SYBR Green荧光素染料实现目标序列相对定量,是SMA新生儿筛查以及携带者筛查最经济有效的方法。周成等^[28]利用qPCR法对19297名孕妇进行携带者筛查,对携带者孕妇配偶进行相应检测,如果双方同为携带者对胎儿进行产前诊断。共检出SMA携带者286例,携带率为1.48%,其中6对夫妇同为SMA携带者,经产前诊断确诊纯合缺失患儿1例,SMN1基因E7、E8杂合缺失胎儿4例,正常基因型胎儿1例,qPCR结果与MLPA验证一致。qPCR技术实验周期短、实验操作简便、实验成本低、结果准确可靠、技术灵敏度高优势,非常适合SMA携带者筛查以及新生儿筛查。但其特异性略逊于MLPA方法^[23],为了确保SMN1的特异性并避免SMN2基因的影响,2018年,Francois Boemer等^[29]设计了一种使用锚定核酸探针的定量聚合酶链反应(qPCR)技术,在比利时列日地区启动了一项为期三年的试点项目,对136,339名新生儿进行SMN1第7外显子缺失检测,旨在特异性识别SMN1基因中外显子7纯合缺失^[30]。结果显示本地区SMA发病率为1/13634,纯合子缺失的发生率为1/15149^[31],共发现了9例SMA,对于有神经肌肉疾病症状的患儿均被转诊到NMRC进行MLPA复检确诊,确诊提示qPCR在最初的DBS检测中无假阳性。2018年10月,美国纽约州使用qPCR方法开展新生儿SMA筛查,结果显示34名新生儿呈阳性,经过验证发现qPCR用于SMN1拷贝数检测结果准确可靠^[32-33]。Jennifer L Taylor等^[34]研究发现qPCR不仅能进行新生儿血斑筛查,同时可用于筛查脊髓性肌萎缩症和严重联合免疫缺陷。

2.4 数字PCR(digital polymerase chain reaction, dPCR) 近年

来,微滴式数字PCR(ddPCR)方法发展迅速,原理是以单分子PCR技术为基础,结合统计学方法对DNA进行绝对定量^[35]。实验过程中通过稀释法将样本分到独立区室,每个区室最多包含1拷贝模板,DNA被分配到数千个液滴进行扩增,通过记录每个液滴的荧光信号判断阳性或阴性,随后根据泊松分布推算模板DNA的浓度或基因拷贝数。该方法摆脱了对标准曲线的依赖,非特异性扩增少,对SMN1和SMN2基因拷贝数检测的CV值明显优于qPCR技术^[36-37],Noemi Vidal-Folch^[38]对1530名婴儿和12名SMA患者进行滤纸干血斑SMN1和SMN2外显子7拷贝数检测,开发了一种适用于新生儿筛查、携带者状态和脊髓肌萎缩评估的多重微滴数字PCR方法,可以同时检测DBS和其他组织中的SMN1缺失和SMN2拷贝数变化,证实ddPCR可用于拷贝变异检测^[39-40]。2016年,邹洋等^[41]使用微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)对138例样本(来自56个SMA家系,其中产前诊断样本17例)开展SMN1基因外显子7拷贝数的检测。ddPCR与MLPA技术检测结果的一致率为100%,ddPCR技术可满足临床SMN1基因检测及产前诊断的需求,但是目前数字PCR仪的普及率不高,在临床应用上暂时还无法替代qPCR方法。

2.5 测序法(sequencing)

2.5.1 Sanger测序,上世纪70年代末由美国生物化学家Frederick Sanger提出^[42],因其碱基测序准确度高,被称为基因检测“金标准”。2013年,曹延延等^[43]评价了Sanger测序技术用于诊断缺失型脊髓性肌萎缩症的可行性。通过识别样本扩增片段中SMN1及SMN2的4个差异位点判读SMN1纯合缺失,100例确诊患者和110例对照样本测试结果与MLPA结果一致性为100%。证实Sanger测序法可以用于缺失型脊髓肌萎缩症的分子诊断。2017年,同一课题组对52例患者采用PCR-Sanger测序来检测SMN1基因纯合或杂合缺失以及复合杂合突变,并对诊断效率进行评估,结果显示该方法与MLPA一致性100%,不仅可以用于SMN1基因拷贝数纯合或杂合缺失,还可以筛选SMN1基因上的点突变,进行SMN1基因复合杂合变异病例诊断^[44]。此外,王逸群等^[45]对疑似复合杂合突变患者进行Sanger测序,结果发现有2例患儿分别第5外显子、第1外显子两处非固有差异的碱基位点处发生基因突变,而且均为已报道的SMA致病突变^[44],突变均源于患者母亲。研究提示Sanger测序能检测SMA突变位点,验证突变类型,为疾病及早诊断提供依据,具有重要的临床意义。

2.5.2 二代测序技术(next-generation sequencing, NGS) 是基于PCR和芯片技术发展而来的高通量测序技术,临床上常用于基因组微小变异和拷贝数检测。2017年,Feng等^[46]利用杂交捕获和NGS技术对6738例临床样本进行SMA携带者筛查。结果显示与qPCR或MLPA比较,该方法对于携带者检出灵敏度为100% (CI: 95.9–100%; n=90),特异性为99.6% (95% CI: 99.4–99.7%; n=6,648),而且可以同时检测SMN1拷贝数和SMN2基因微小变异,但微小变异在SMN1和SMN2上的定位还无法明确^[47-48]。2019年,Chen等^[49]使用NGS技术以及新开发的生物信息学方法对12747例样本SMN1和SMN2的拷贝数进行携带者筛查,经数字PCR验证显示SMN1和SMN2拷贝数结果一致性分别为100% (48/48)和98% (47/48),该方法提示利用SMN1与SMN2基因8个基因组参考信息的差异,通过NGS技术和信息学可以对2个基因的拷贝数进行精确鉴定。2020年,Zhao等^[50]采用NGS对来自中国南方5省34个民族的10585对正常夫妇进行SMA携带者筛查泛种族研究,研究揭示了不同民族间携带率的差异(0.3~4.3%),可为未来的大规模筛查应用提供数据参考,但不同民族采集的数据规模差异可能会影响携带率的统计。

2.6 其他方法 除上述筛查技术外,还有DNA质谱法^[15]、液体微珠阵列^[51]、高分辨溶解曲线分析(HRMA)^[52]等方法被应用于SMA突变检测。这些方法各有优缺点,其中HRMA发展迅速,在SMA新生儿筛查中具备较大潜力,目前可区分9种SMN拷贝数组合,但仍需继续研究区分更多拷贝数组合^[53]。

3 总结

SMA是严重致死性神经系统疾病,中国人群携带率高达1/42,95%是由SMN1基因的外显子7纯合缺失引起的。目前已批准用于治

疗的三种药物分别是nusinersen、onasemnogene abeparvovec和risdiplam,也有几种药物正处于临床前或早期临床开发阶段。

随着诺西那生钠和利司普兰被纳入医保,推动了国内SMA新生儿筛查的开展。临床试验证实,在患儿出现症状前开始治疗,患儿在存活率、运动里程碑达成等方面均有更大获益。目前临床上常用于SMA新生儿筛查的技术是qPCR和MLPA。在大多数程序中,首先通过qPCR完成筛查,对于疑诊SMA进行MLPA复核/验证。而数字PCR法、高分辨熔解曲线分析法、NGS等新兴技术方法在临床SMA新生儿筛查中具有巨大的潜力。新疗法的开发让SMA携带者和新生儿筛查在许多国家得以普及,携带者筛查有可能降低人群疾病发病率,但无法针对整个人群,并且明显具有社会导向性,同时携带者筛查无法识别新突变,也不能完全涵盖父亲未知或父母一方或双方缺席的婴儿。而新生儿筛查具有普遍性,适用于所有儿童,无论其父母的状况如何,都能使患者和社会从创新药物中获得最大利益。目前SMA的新生儿筛查已在国外多个国家开展,为我国开展大规模新生儿筛查提供了经验。吴莉萍等^[54]基于滤纸干血斑建立的基因组DNA自动化提取方法及流程,为在现有新生儿筛查体系增加SMA筛查提供了技术基础。新生儿筛查和携带者筛查同时实施将有效降低SMA发病率,对减轻家庭和社会负担、提高人口素质具有重要意义。

参考文献

- [1] Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage[J]. Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, Berlin, 1891, 22: 437-481.
- [2] Verhaart I E C, Robertson A, Wilson I J, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2017, 12(1): 124.
- [3] Su YN, Hung CC, Lin SY, et al. Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17067.
- [4] 冯艺杰, 毛姗姗. 脊髓性肌萎缩症的药物治疗研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(10): 4.
- [5] 熊晖, 宋昉, 袁云. 脊髓性肌萎缩症多学科管理专家共识[J]. 中华医学杂志, 2019(19): 1460-1467.
- [6] Zhang J, Wang Y, Ma D, et al. Carrier Screening and Prenatal Diagnosis for Spinal Muscular Atrophy in 13,069 Chinese Pregnant Women[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(6): 6.
- [7] 龚波, 章莉, 侯雅萍, 等. 中国上海地区4719名孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(6): 3.
- [8] 章印红, 王蕾, 贺静, 等. 云南地区3049名育龄人群脊髓性肌萎缩症携带者筛查结果分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(4): 5.
- [9] 罗智强, 路新国, 刘丽琴, 等. 诺西那生钠治疗症状前5q脊髓性肌萎缩症1例疗效分析[J]. 临床儿科杂志, 2022, 40(3): 4.
- [10] WIJNGAARDE C A, STAM M, OTTO L A M, et al. Population-based analysis of survival in spinal muscular atrophy[J/OL]. Neurology, 2020, 94(15): e1634-e1644.
- [11] Finkel R, Bertini E, Muntoni F, et al. 2019th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Clinical Trial Readiness in Spinal Muscular Atrophy 7-9 November 2014, Heemskerk, The Netherlands[J]. Neuromuscular Disorders, 2015, 25(7): 593-602.
- [12] Czibere L, Burggraf S, Fleige T, et al. High-throughput genetic newborn screening for spinal muscular atrophy by rapid nucleic acid extraction from dried blood spots and 384-well qPCR[J]. European Journal of Human Genetics, 2020.
- [13] WIJAYA Y O S, NISHIO H, NIBA E T E, et al. Dried Blood Spot Screening System for Spinal Muscular Atrophy with Allele-Specific Polymerase Chain Reaction and Melting Peak Analysis[J/OL]. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2021, 25(4): 293-301.
- [14] Chien YH, Chiang SC, Weng WC, et al. Presymptomatic diagnosis of spinal muscular atrophy through newborn screening[J]. J Pediatr, 2017, 190: 124129.e1.
- [15] Lin Y, Lin CH, Yin X, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy in China using DNA mass spectrometry[J]. Front Genet, 2019, 10: 1255.
- [16] Feng Y, Ge X, Meng L, et al. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing[J]. Genetics in Medicine Official Journal of the American College of Medical Genetics, 2017.
- [17] Lorson C L, Androphy E J. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(11): 6307-6311.
- [18] Tizzano E F Z D. Prenatal aspects in spinal muscular atrophy: From early detection to early presymptomatic intervention[J]. European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society, 2018, 22(6): 6.
- [19] 王逸群, 刘长云, 陈晨, 等. 儿童脊肌萎缩症的临床分析与基因诊断[J]. 潍坊医学院学报, 2020, 42(06): 435-438.
- [20] 潘建廷, 谭虎, 周妙金, et al. 脊髓性肌萎缩症的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020(03): 263-264-265-266-267-268.
- [21] Prior TW, Leach ME, Finanger E. Spinal Muscular Atrophy. 2000 Feb 24

- [Updated 2020 Dec 3]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al. editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.
- [22] 白晋丽, 瞿宇晋, 宋昉, 等. 基于脊髓性肌萎缩症注册队列人群的基因诊断技术应用调查分析[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(08): 743-748.
- [23] 北京医学会医学遗传学分会, 北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(40): 3130-3140.
- [24] 金煜炜, 瞿宇晋, 王红, et al. PCR-RFLP法在脊髓性肌萎缩症基因检测中的局限性[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(1): 4.
- [25] Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care[J]. Neuromuscul Disord, 2018, 28(2): 103115.
- [26] McMillan HJ, Kernohan KD, Yeh E, et al. Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy: Ontario Testing and Followup Recommendations[J]. Can J Neurol Sci, 2020: 1-8.
- [27] Dangouloff T, Boemer F, Servais L. Newborn screening of neuromuscular diseases[J]. Neuromuscul Disord, 2021; 31(10): 1070-1080.
- [28] 周成, 宋春林, 黄湘, 等. 广东佛山地区19297名孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(02): 241-245.
- [29] Boemer F, Caberg JH, Beckers P, et al. Three years pilot of spinal muscular atrophy newborn screening turned into official program in Southern Belgium[J]. Sci Rep, 2021; 11(1): 19922. Published 2021 Oct 7.
- [30] Czibere L, et al. High-throughput genetic newborn screening for spinal muscular atrophy by rapid nucleic acid extraction from dried blood spots and 384-well qPCR[J]. Eur. J. Hum. Genet, 28, 23-30 (2020).
- [31] Boemer F, Caberg JH, Dideberg V, et al. Newborn screening for SMA in Southern Belgium[J]. Neuromuscul Disord, 2019 May; 29(5): 343-349.
- [32] Kraszewski JN, Kay DM, Stevens CF, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state[J]. Genet Med, 2018; 20(6): 608-613.
- [33] Lee BH, Deng S, Chiriboga CA, et al. Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy in New York State: Clinical Outcomes From the First 3 Years [published online ahead of print, 2022 Jul 14] [J]. Neurology, 2022; 99(14): e1527-e1537.
- [34] Taylor JL, Lee FK, Yazdanpanah GK, et al. Newborn blood spot screening test using multiplexed real-time PCR to simultaneously screen for spinal muscular atrophy and severe combined immunodeficiency[J]. Clin Chem, 2015; 61(2): 412-419.
- [35] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [36] 傅启华, 郑昭璟. 数字PCR技术在遗传病无创产前诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016(3): 5.
- [37] Hudcova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids[J]. Clin Biochem, 2015; 48: 948-956.
- [38] Vidal-Folch N, Gavrilov D, Raymond K, et al. Multiplex Droplet Digital PCR Method Applicable to Newborn Screening, Carrier Status, and Assessment of Spinal Muscular Atrophy[J]. Clin Chem, 2018; 64(12): 1753-1761.
- [39] Pretto D, Maar D, Yrigollen CM, et al. Screening newborn blood spots for 22q11.2 deletion syndrome using multiplex droplet digital PCR[J]. Clin Chem, 2015; 61: 182-90.
- [40] Härmälä SK, Butcher R, Roberts CH. Copy number variation analysis by droplet digital PCR[J]. Methods Mol Biol, 2017; 1654: 135-49.
- [41] 邹洋, 徐佩文, 李杰, 等. 微滴式数字PCR在脊肌萎缩症基因检测和产前诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(05): 594-597.
- [42] F Sanger. Determination of nucleotide sequences in DNA[J]. Bioscience reports, 1981 Jan; 1(1): 3-18.
- [43] 曹延廷, 瞿宇晋, 宋昉, 等. 应用基因组测序技术诊断缺失型脊肌萎缩症[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(04): 410-414.
- [44] 杨兰, 曹延廷, 瞿宇晋, 等. Sanger测序对运动神经元存活基因1复合杂合突变型脊髓性肌萎缩症的诊断价值[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(6): 6.
- [45] 王逸群, 刘长云, 陈晨, 等. 儿童脊肌萎缩症的临床分析与基因诊断[J]. 潍坊医学院学报, 2020(6): 4.
- [46] Feng Y, Ge X, Meng L, et al. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing[J]. Genetics in Medicine Official Journal of the American College of Medical Genetics, 2017.
- [47] 夏静宜, 郭虎. MLPA联合二代测序, longPCR产物巢式PCR诊断脊髓性肌萎缩一例[J]. 现代医学, 2021, 49(5): 4.
- [48] 曾健, 林炎鸿, 严爱贞, 等. 脊肌萎缩症家系运动神经元生存基因微小突变的鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(7): 5.
- [49] Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data[J]. Genet Med, 2020, 22(5): 945-953.
- [50] Zhao SM, Wang WY, Wang YS, et al. NGS-based spinal muscular atrophy carrier screening of 10,585 diverse couples in China: a pan-ethnic study[J]. Eur J Hum Genet, 2021, 29(1): 194-204.
- [51] Pyatt R E, Mihal D C, Prior T W. Assessment of Liquid Microbead Arrays for the Screening of Newborns for Spinal Muscular Atrophy[J]. Clinical Chemistry, 2007(11): 1879-1885.
- [52] Sa'Adah N, Harahap N I F, Nurputra D K, et al. A Rapid, Accurate and Simple Screening Method for Spinal Muscular Atrophy: High-Resolution Melting Analysis Using Dried Blood Spots on Filter Paper. [J]. Clinical Laboratory, 2015, 61(5-6): 575-580.
- [53] Xiaoqing Z, Bo W, Lichen Z, et al. Accurate diagnosis of spinal muscular atrophy and 22q11.2 deletion syndrome using limited deoxynucleotide triphosphates and high-resolution melting[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 485.
- [54] 吴莉萍, 高玲亮, 杨江涛, 等. 滤纸干血斑用于脊髓性肌萎缩症基因筛查方法的建立[J]. 罕少疾病杂志, 2022, 29(9): 1-4.

(收稿日期: 2023-04-12)

(校对编辑: 谢诗婷)