

全基因组测序在遗传病检测中的临床应用 专家共识

中国医师协会医学遗传医师分会

中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组

中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组

上海市医学会分子诊断专科分会

通信作者:余永国,上海交通大学医学院附属新华医院儿内分泌/遗传科,200092,

Email: yuyongguo@shsmu.edu.cn; 邬玲仟,中南大学医学遗传学研究中心,长沙 410008,

Email: wulingqian@sklmg.edu.cn

Consensus on the application of clinical whole genome sequencing in the diagnosis of genetic diseases

The Society of Medical Geneticists, Chinese Medical Doctor Association; the Subspecialty Group of Endocrinologic, Hereditary and Metabolic Diseases, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; Clinical Genetics Group, Adolescent Medicine Committee, Chinese Medical Doctor Association; Molecular Diagnosis Society, Shanghai Medical Association

Corresponding author: Yu Yongguo, Department of Pediatric Endocrinology / Genetics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China, Email: yuyongguo@shsmu.edu.cn; Wu Lingqian, Medical Genetics Center, Central South University, Changsha 410008, China, Email: wulingqian@sklmg.edu.cn

【摘要】 下一代测序(NGS)技术近年来在遗传病检测领域得到了广泛应用,以靶向测序及全外显子组测序为代表的技术已成为遗传病诊断的重要工具。全基因组测序(WGS)理论上可以同时检测单核苷酸变异、结构变异(含拷贝数变异)及线粒体变异等,有望进一步提升临床遗传检测的效能。由于WGS产生的数据涵盖受检者的几乎全部遗传信息,为了实现其临床意义以及妥善处理检测相关的复杂遗传咨询问题,39位医学遗传学专家共同探讨了WGS作为临床遗传病检测手段的关键特征,并从检测申请、检测及分析流程、报告及遗传咨询等方面给出了建议。本共识适用于以NGS技术为主的高覆盖度WGS(通常>40X)在遗传病临床诊断性检测中的应用,主要针对符合孟德尔遗传规律的基因或基因组疾病。

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1002200)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2019.06.004

遗传病是指由于基因或基因组的结构或功能改变所导致的疾病。下一代测序(next-generation sequencing, NGS)是遗传病检测领域的一项革新性技术。近年来靶向测序和全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)得到广泛认可,逐渐成为辅助医生进行遗传病诊断的重要工具^[1]。这些检测手段尽管有效,仍然存在一些技术限制,特别是在检测结构变异(structural variations, SV)等方面。全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)有望进一步提升临床遗传检测的效能^[2]。WGS对受

检者基因组中的全部DNA序列进行检测,较WES所覆盖的区域更广,不仅覆盖了几乎全部基因的外显子序列,也覆盖了内含子序列和基因间序列。现在认为WGS可有效避免在对相关基因组区域进行靶向富集时产生的技术偏差,不仅可以检出单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNV),还可以对SV进行分析,并常规性地对线粒体基因组(mitochondrial genome DNA, mtDNA)变异进行分析^[2-3]。同时其操作步骤相对简化,能更加快速获得更完整的基因组信息。因此,WGS应用于临

床遗传诊断有望提高诊断率,缩短诊断流程,节省时间及降低诊疗费用^[4]。

由于 WGS 产生的数据涉及受检者的几乎全部遗传信息,其应用于临床遗传病检测需遵循医学伦理中的自愿、患者受益、不伤害和公平原则。为了实现其应有的临床意义,并妥善处理检测可能带来的复杂遗传咨询问题,本共识列出了 WGS 作为遗传病诊断检测手段的关键特征,并在检测申请、检测及分析流程、报告及遗传咨询等方面给出建议,但其实施流程及效能验证的具体步骤不在本共识的涵盖范围。本共识适用于以 NGS 技术为主的高覆盖度 WGS(通常>40X)在遗传病临床诊断性检测中的应用,主要针对符合孟德尔遗传规律的基因或基因组疾病。对于 WGS 在预测性检测、筛查等场景中的应用,不在本共识的讨论范畴。

一、送检目的及临床适应证

1. 送检目的:本共识认为 WGS 可用于以下送检目的,(1)临床诊断不明但怀疑为遗传病的患者,通过 WGS 寻求相关的分子诊断和鉴别诊断;(2)临床诊断明确的遗传病患者,为进一步指导治疗或生育寻求分子水平的确诊。

2. 临床适应证:WGS 适用于怀疑遗传病是患者全部或部分症状原因的所有情况。(1)推荐 WGS,①高度怀疑患者有遗传病的可能(如临床症状、体征和其他检测结果提示,家族史阳性或近亲结婚家系),但先前经过如染色体核型、微阵列芯片或全外显子组测序等一种或多种遗传学检测未获得明确的分子诊断;②患者表型为非特异性[不明原因的智力落后和(或)发育迟缓、非已知综合征的多发畸形等]或临床诊断明确但目标疾病遗传异质性强(先天性白内障、腓骨肌萎缩症、脑白质病等),为获得时间或经济效益而寻求一次性、全面性的遗传学检测(新生儿重症患儿等)^[5]。(2)可使用 WGS,但应结合具体情况选择优先的检测方法:目标疾病遗传异质性低,虽已有公认的靶向检测方法,但有可能部分致病变异(非编码区变异等)不在靶向检测的范围(神经纤维瘤 1 型等)。(3)不推荐使用 WGS,①目标疾病致病基因的相当一部分变异类型不在 WGS 检测范围,例如 Beckwith-Wiedemann 综合征等基因印迹疾病;②目标疾病致病基因存在同源区域等情况,如先天性肾上腺皮质增生(CYP21A2 基因相关)等。

二、检测前咨询

1. 遗传咨询的必要性:受检者在进行 WGS 前,

原则上应由接受过医学遗传学培训的临床医生(含继续教育)或遗传咨询师进行遗传咨询以明确检测目的,了解检测方法及其局限性,知晓预期结果和可能的风险,并知悉数据及样本的相关处理。

2. 检测前遗传咨询及知情同意的内容:在 WGS 检测前进行遗传咨询有助于受检者充分知情,建议以书面的形式获得受检者或其监护人签署的知情同意书。遗传咨询及知情同意的内容应包括:(1)送检的目的及意义;(2)检测方法、周期及局限性;(3)预期结果及可能的风险:检测结果可能为阳性,即在与受检者表型相关的基因中找到致病性变异;阴性,即未发现与受检者表型相关的致病性变异;或结果不确定,即在与受检者表型相关的基因中找到意义不明的变异,或在与受检者表型可能相关但是不确定的基因中找到致病性变异。受检者应知悉次要发现的可能及其意义和风险,确认“不知权”。检测过程中及知晓结果后,受检者可能会出现不同程度的精神压力和心理负担^[6];(4)数据及样本处理的相关规则;(5)数据再分析的可能性。

三、检测流程

1. 信息和样本采集:检测前应收集尽可能详细的表型信息。表型信息包括临床症状、体征、实验室检查、病理检查和影像学及其他检查结果等。建议使用人类表型标准用语(human phenotype ontology, HPO)或中文人类表型标准用语(China human phenotype ontology, CHPO)等统一术语。家族史信息收集建议达到三代或三代以上,对于家族史阳性的,应详细记录每个患者的表型信息,含发病年龄、轻重程度等。临床医生与实验室和受检者沟通后,可以在缺乏部分辅助检测结果的情况下先提供 WGS 检测,然后在结果分析时或分析后针对性地对患者进行检查。样本采集应按实验室要求,采集含基因组 DNA 的生物样本,包括但不限于全血、组织、培养的细胞等。

2. 标准操作程序(standard operating procedure, SOP)的建立及检测性能确认:检测机构需建立符合相关规定的 SOP。此 SOP 需对每一个环节的质控和操作关键参数有明确界定。检测性能确认时建议采用国际通用的标准样本,以已确认的变异为对象,分析界定其对不同变异类型的敏感性、特异性,并对检测性能的稳定可靠性做批间、批内的差异分析,界定可接受和可报告的范围。应遵循 SOP 进行检测及质控。操作流程中的重要成分或处理方法有改变时应对检测性能进行再次确认,并记录

与原SOP的主要差别和改进。实验室SOP及其性能确认报告应为含有效期和版本号的书面文本,以备培训、操作时参阅和检查时展示递交。

3. 确认性实验:用于诊断目的的变异检测结果,建议经过确认性实验后报出。确认性实验目的—为排除样品混淆等人为错误,二为排除变异的假阳性。(1) 样本真实性的追踪及确认。为了排除样本混淆的风险,实验室应建立样本追踪方案,如通过单核苷酸多态性(SNP指纹图谱)来确认送检样本与数据相符。(2) 用于诊断目的的变异确认。对于SNV、拷贝数变异、SV和mtDNA变异,可以根据涉及变异的位置和特性选择适合的方法进行确认,如Sanger测序确认SNV、微阵列芯片或多重连接探针技术等确认拷贝数变异、核型分析和荧光原位杂交等确认SV、特异性高的mtDNA检测确认线粒体基因组变异。对变异进行确认性实验时,应考虑到不同方法间灵敏度的差异,如WGS可检出等位基因频率占比低的嵌合性变异,但此类变异可能无法通过Sanger测序检出及确认。(3) 对新发变异应通过父母亲源关系检测确认。

4. 检测的局限性:WGS检测的局限性主要包括,(1) 涉及高度重复或同源的基因组区域的检测及分析可能不准确。在染色体着丝粒DNA、着丝粒旁的异染色质、端粒、亚端粒区间或线粒体基因组等高度重复或同源的区间,较短的读长在与参考基因组进行比对时可能存在不唯一性。这些区域还存在活跃的重组,也会增加比对难度。临床常见的与高度重复或同源基因或基因组相关疾病包括耳聋(STRC基因相关)^[7],先天性肾上腺皮质增生(CYP21A2基因相关)^[8],Lynch综合征(PMS2基因相关)等^[9]。(2) 对于mtDNA变异识别存在局限性,需用特异性高的mtDNA检测方法进行验证。原因是线粒体基因组变异有杂质性的特点^[10]。准确区分同质性和杂质性,以及测定杂质性的水平对于线粒体基因组变异的分类有非常重要的意义。由于线粒体基因组存在大量与核基因同源的序列,WGS测序可能出现mtDNA变异假阳性、不能准确区分同质性和杂质性以及不能对杂质性进行准确定量的情况^[3]。(3) 人类基因组参考序列仅来源于有限个体,部分基因组区域还存在参考序列的误差和空白间隙,变异识别可能出现假阳性和假阴性。(4) 鸟嘌呤和胞嘧啶(guanine and cytosine, GC)占比高区域的覆盖可能不完全。WGS的覆盖均一性虽较捕获测序有显著改善,但由于基因组构型的复杂

性,高GC含量区域的变异评估应谨慎。(5) 部分变异类型,如环状染色体等复杂结构变异,WGS的检出率及准确性仍有待进一步的确认。

值得一提的是,上述讨论的局限性并非一成不变,由于技术及算法的改进,这些局限性相关的问题在将来可能得到解决,例如某些涉及高度同源基因的疾病已有通过NGS方法进行检测的文献报道^[11]。

四、检测报告

检测报告是其在临床应用的重要依据。建议检测机构参照2018年2月发表的“临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨”^[12],出具符合行业标准和规范的检测报告。

1. 报告发放的对象:建议检测报告先发给送检者指定的有遗传咨询或临床遗传医师资质的专业人员,考虑国情也可同时发放给送检者(或其法定监护人、代理人)。

2. 报告的形式及内容:报告的形式须简明扼要,所列内容定义明确,结果解读依据充分,检测报告的适用范围和局限性须明确说明。检测报告应包括如下主要方面,① 一般信息:检测单位或实验室信息、受检者信息、送检单位和医师信息、报告出具和签发时间等。② 检测信息及局限性:包括检测技术的范围、方法的说明、局限性等具体描述。对于WGS检测,应特别说明分析所包含的变异类型,如是否包含结构变异及线粒体变异等,以及是否采用其他方法对结果进行验证。③ 检测结果的报告、解读和结论:建议报告与临床表型相关的致病、疑似致病及意义不明变异。对于与临床表型无关但有临床意义的次要发现,依情况而定是否报告。应对检测到的基因变异及其分类进行解读,包括对致病性与否进行具体解释,其所导致的相关疾病应进行简单解释和说明,并给出基于变异分类的报告结论。④ 遗传咨询和建议:报告应明确说明由具遗传咨询或临床遗传医师资质的专业人员进行相应遗传咨询或下一步临床决策。可在必要时对可能的遗传咨询提出建议,如根据获得的临床信息或其他相关信息进一步明确遗传变异致病相关性的建议。

五、检测后遗传咨询

无论何种检测结果,均应给予受检方相应的检测后遗传咨询,就检测的意义及结果进行解释和教育,辅导其进行知情选择,使其对所患疾病及其再发风险有所认知和接受,并提供有关的治疗、求助

渠道等信息。

咨询内容包括是否可就检测结果做出明确的基因诊断;是否需要针对性的辅助检查来进一步明确检出变异的致病相关性,尤其是对意义不明的变异;是否需要进一步对受检者或家庭成员进行检测验证或排除诊断;根据基因检测结果,是否需进行适当的治疗干预,调整治疗方案或饮食,明确药物禁忌等;根据做出的基因诊断对患者的病情预后发展等进行评估,制定治疗及随访观察计划、并发症的预防干预;对患者和家属提供心理干预或社会救助资源和渠道等;根据遗传规律对父母的再生育风险的评估及其再生育指导,包括产前诊断或辅助生育计划的方式等;患者或先证者的下一代风险评估及其再生育指导;家族内其他家庭成员的风险评估;疾病的有关研究进展信息等。需注意的是,如受检方要求进行产前诊断或辅助生殖等,则需根据相关共识或指南明确告知风险,进行相应的指导或咨询。

六、其他相关问题

1. 次要发现:WGS的主要目的是揭示可解释患者临床表型的致病基因(组)变异,但在部分个体基因组中还可能检测出与受检指征不相关但具有重要临床功效性(主要是指能较好预测未来发病的可能并可进行预防性干预或治疗)的基因(组)变异。当这些变异是无意中被发现时,曾被称为意外发现^[13]。美国医学遗传及基因组专家委员会(American college of medical genetics and genomics, ACMG)建议有意识地分析这些有重要临床意义的基因(组)变异,并将称其为次要发现^[15]。ACMG建议对59个推荐的基因进行数据分析并根据患者的选择意愿报告其中的致病性和可能致病性变异,建议对于意义未明的相关罕见变异不进行报告^[14]。本共识专家团队原则上认可报告次要发现的临床功效及意义,同时建议结合国情制定执行层面的政策和方案。具体建议如下,(1)应该为所有参与WGS检测的患者(或家属)提供有关次要发现的介绍,并在知情同意的情况下明确选择是否接受报告次要发现。(2)ACMG推荐的59个基因可以作为分析和报告次要发现的主要对象,但需要在综合考虑以下因素的情况下决定删增基因及病种,①在中国人群中的发生频率及外显率;②目前医疗条件下提前干预治疗或预防的可及性及有效性。(3)只对根据ACMG变异分析指南判定为致病性和可能致病性的变异进行报告。(4)建议对报告的次要发

现进行跟踪随访,以评估其实际的临床功效,积累致病变异外显率相关数据并以此为依据建立更新修改次要发现的报告原则、基因和疾病种数及报告内容的机制。基于核心家系的WGS测序能发现父母的近亲关系和非亲子关系,这也属于一种检测的意外发现,除非对患者的诊断治疗有特别的必要性,建议不在检测报告中体现这些信息。建议有遗传咨询资质的专业人员在检测后的遗传咨询过程中酌情处理。

2. 样本及数据的处理:(1)样本及数据的保存,基因检测的样本及数据应由检测机构长期保存(建议至少保存2年)。检测机构应根据不同的样本及数据类型选择合适的保存方式。检测机构可以在送检知情同意书中约定保存的年限,若超过年限则可以自行销毁或交由委托人自己保存。数据保存的考量应包括原始数据的可溯源性、现有技术(包括测序技术、遗传变异位点处理技术)的版本可溯源性、基于目前知识注释解读的可溯源性。基于数据安全考虑,要实施必要的防火墙、加密和管理;基于患者隐私考虑,个人信息、医疗记录和WGS数据要有效地分开管理。(2)样本及数据的调用及所有权,检测机构应建立样本库和数据库,采用二级分层(检索库和匿名化的主库)管理,调用样本或数据需要设置流程并规范执行。因为样本及数据涉及患者隐私,应对样本及数据调用者进行必要的身份验证,即仅提供给患者本人、法定监护人或获得其书面授权的人员,并将调用样本或数据的目的、时间、形式(如生物样本的类型和数量等)、调用者信息及签名等记录在案。(3)数据的再分析,随着基因组学技术的不断发展,对基因(组)疾病的认识也在不断更新和深入。建议检测单位可应送检者要求,根据自身情况制定相应的标准操作流程,对数据进行重新解读和再分析。(4)数据共享,在基因或基因组疾病科研以及临床应用飞速发展的大背景下,WGS数据共享是值得大力提倡、积极促进的。目标包括①鼓励患者及家庭积极参与,以捐赠形式共享自身遗传测序数据;②鼓励科研人员、临床医生或医院、检测机构在保护隐私、保证数据安全、符合伦理知情同意等前提条件下共享测序数据;③科研成果按照行业惯例分享,形成正面良性循环。

3. 研究与临床诊断的界限:由于WGS检测的特殊性以及基因与疾病关联性知识的快速更新,临床检测与科学研究的界限容易模糊。但鉴于检测目的的不同以及临床医学的特殊性,WGS在临床

诊断和科学研究中的应用有清晰的区别。诊断性检测是指为了直接解决患者医疗过程中的临床问题进行的检测,其目的是为临床诊治提供依据和指导,此类检测应由经认可的临床检测实验室完成,并限于已知与疾病相关的基因。其分析结果可以产生理论假设,在符合医学伦理原则的前提下,可用作科学研究数据。

科学研究性质的检测是指为了探索或者证明某种科学假说而进行的检测,其结果对于参与研究项目的患者可能临床意义有限。应该告知患者及家庭研究项目存在发现潜在遗传病的可能性;若研究中发现临床相关结果,应该经由诊断体系证实之后方可纳入患者临床病历。

(余永国 范燕洁 沈亦平
张巍 郭玲仟 执笔)

参与本共识制定的人员(以单位及姓名拼音为序):安徽医科大学(曹云霞);北京大学第一医院(姜玉武);北京协和医学院(黄尚志);复旦大学附属妇产科医院(张锋);广东省妇幼保健院(尹爱华);广西壮族自治区妇幼保健院(沈亦平);河南省人民医院(侯巧芳、廖世秀);湖南省妇幼保健院(王华);华中科技大学同济医学院附属同济医院(陈素华、罗小平);江西省妇幼保健院(刘艳秋);空军军医大学第一附属医院(张建芳);美国贝勒医学院(John Belmont、王菁、于福利、张巍);美国费城儿童医院应用基因组中心(王伟);美国哈佛大学医学院附属布莱根妇女医院(沈珺);美国辛辛那提儿童医院(黄涛生);南京市妇幼保健院(胡平);山东省临沂市人民医院(李培美);上海交通大学医学院(周在威);上海交通大学医学院附属新华医院(范燕洁、顾学范、孙昱、余永国);上海市临床检验中心(王华梁、肖艳群);四川大学华西第二医院(刘洪倩);温州市中心医院(唐少华);云南省第一人民医院(朱宝生);浙江大学医学院附属第一医院/附属邵逸夫医院(祁鸣);郑州大学第一附属医院(孔祥东);中南大学生殖与干细胞工程研究所(谭珂);中南大学医学遗传学研究中心(梁德生、谭虎、郭玲仟);中日友好医院(张知新)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(16): 1502-1511. DOI: 10.1056 / NEJMoa1306555.
- [2] Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test [J]. *Genet Med*, 2018, 20(4): 435-443. DOI: 10.1038 / gim.2017.119.
- [3] Cui H, Li F, Chen D, et al. Comprehensive next-generation sequence analyses of the entire mitochondrial genome reveal new insights into the molecular diagnosis of mitochondrial DNA disorders[J]. *Genet Med*, 2013, 15(5): 388-394. DOI: 10.1038/gim.2012.144.
- [4] Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization[J]. *NPJ Genom Med*, 2018, 3: 10. DOI:10.1038/ s41525-018-0049-4.
- [5] Miller NA, Farrow EG, Gibson M, et al. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases[J]. *Genome Med*, 2015, 7: 100. DOI:10.1186/s13073-015-0221-8.
- [6] Andersen J, Sandberg S, Raaheim M, et al. Psychosocial aspects of predictive genetic testing for acute intermittent porphyria in norwegian minors[J]. *JIMD Rep*, 2011, 1: 1-7. DOI:10.1007/ 8904_2011_8.
- [7] Francey LJ, Conlin LK, Kadesch HE, et al. Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment[J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(2): 298-308. DOI:10.1002/ajmg.a.34391.
- [8] Tsai LP, Cheng CF, Chuang SH, et al. Analysis of the CYP21A1P pseudogene: indication of mutational diversity and CYP21A2-like and duplicated CYP21A2 genes[J]. *Anal Biochem*, 2011, 413(2): 133-141. DOI: 10.1016 / j. ab.2011.02.016.
- [9] De Vos M, Hayward BE, Picton S, et al. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(5): 954-964. DOI:10.1086/420796.
- [10] Zhang W, Cui H, Wong LJ. Comprehensive one-step molecular analyses of mitochondrial genome by massively parallel sequencing[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(9): 1322-1331. DOI: 10.1373/clinchem.2011.181438.
- [11] 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]. *Genet Med*, 2017, 19(8): 936-944. DOI:10.1038/gim.2016.215.
- [12] 黄辉, 沈亦平, 顾卫红, 等. 临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(1): 1-8. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.01.001.
- [13] Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing[J]. *Genet Med*, 2013, 15(7): 565-574. DOI: 10.1038/gim.2013.73.
- [14] 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.

(收稿日期:2019-01-04)

(本文编辑:刘瑾)