

# 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识

中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组  
中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会  
中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组  
执笔:刘洪倩 刘俊涛 邬玲仟  
通信作者:邬玲仟,Email:wulingqian@sklmg.edu.cn

**【摘要】** 包括染色体数目异常、大片段缺失/重复及致病性基因组拷贝数变异 (pathogenic copy number variations, pCNVs) 在内的基因组异常是导致出生缺陷的重要原因。基于下一代测序 (next generation sequencing, NGS) 技术的基因组拷贝数变异测序 (copy number variation sequencing, CNV-seq) 为这类异常的产前诊断提供了新的手段。与核型分析、染色体微阵列分析等其他技术相比, CNV-seq 技术具有检测范围广、通量高、操作简便、兼容性好、所需 DNA 样本量低等优点。中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组、中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会、中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组共同成立专家组, 讨论并提出了将 CNV-seq 技术应用于产前诊断的专家共识, 以期规范其临床应用, 更好地为患者服务。

**【关键词】** 低深度全基因组测序; 产前诊断; 专家共识  
**基金项目:** 国家重点研发计划 (2017YFC1001802, 2016YFC0905102)  
DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.001

我国出生缺陷的发生率约为 5.6%<sup>[1]</sup>, 其中染色体畸变约占出生缺陷遗传学病因的 80% 以上<sup>[2]</sup>, 具体包括染色体数目异常、大片段缺失/重复及致病性基因组拷贝数变异 (pathogenic copy number variations, pCNVs) 等。多年来, 染色体核型分析技术一直被认为是确诊染色体畸变的“金标准”, 也是染色体病产前诊断的一线方法, 但其检测周期长、分辨率较低, 无法检出 5 Mb 以下的 CNVs。截至目前, 已明确由 pCNVs 所致的染色体微缺失/微重复综合征已达 300 多种<sup>[3-4]</sup>, 综合发病率近 1/600<sup>[3]</sup>, 占染色体畸变所致出生缺陷的一半<sup>[2]</sup>。有研究表明, 核型分析未见异常但超声提示结构异常的胎儿中, 有 6%~7% 存在明确致病或可能致病的 CNVs<sup>[5-7]</sup>。此外, 核型分析与超声均未发现异常的胎儿中有 1.0%~1.7% 存在明确致病或可能致病的 CNVs<sup>[5-6]</sup>。因此, 对包括 pCNVs 在内的染色体畸变进行及时、准确的产前诊断, 将有利于进一步减少活产儿的严重出生缺陷。

目前主要用于全基因组范围 CNVs 检测的技术为染色体微阵列分析 (chromosomal microarray analysis, CMA)。然而, 该技术较高的成本与较低的通量限制了其在产前诊断中的大规模应用。此外, 由于 CMA 所使用的芯片探针覆盖范围有限, 可能导致

部分 pCNVs 无法被检出<sup>[8-9]</sup>。

基于下一代测序 (next generation sequencing, NGS) 技术的基因组拷贝数变异测序 (copy number variation sequencing, CNV-seq) 为产前诊断提供了新的手段。CNV-seq 采用 NGS 技术对样本 DNA 进行低深度全基因组测序, 将测序结果与人类参考基因组碱基序列进行比对, 通过生物信息分析以发现受检样本存在的 CNVs。与其他技术相比, CNV-seq 技术主要有以下优势: (1) 检测范围广: 覆盖全染色体非整倍体、大片段缺失/重复及全基因组 CNVs; (2) 高通量: 可更好地缓解当前产前诊断服务供给严重不足的矛盾; (3) 操作简便: 实验流程简便, 数据分析自动化程度高, 质控标准清晰, 报告周期短, 可在显著节省人力的同时降低人为误差风险; (4) 兼容性好: 一台高通量测序仪可同时进行无创产前筛查 (noninvasive prenatal screening, NIPS) 和 CNV-seq 检测, 有效节约实验室的空间和设备成本; (5) 低比例嵌合体的检测: CMA 技术对于 < 30% 的嵌合体无法进行准确分析<sup>[10]</sup>, 而 CNV-seq 技术可以检测更低比例的嵌合体, 在理想条件下可检测低至 5% 的染色体非整倍体嵌合<sup>[11-13]</sup>, 在临床样本中可发现超过 10% 的染色体非整倍体嵌合<sup>[14]</sup>; (6) 低 DNA 样本量的检测: 有研究表明, CNV-

seq 技术可精确检测低至 10~50 ng 的 DNA 样本,更具有临床适用性<sup>[15]</sup>。

国内外研究者对 CNV-seq 技术的临床应用进行了一系列的探索,充分评估了该项技术的临床适用性与准确性。结果表明,CNV-seq 技术可以应用于外周血、流产物与胎儿组织以及产前诊断样本分析<sup>[15-19]</sup>。研究还发现在核型分析判定的平衡易位样本中,有 7.9% 的样本在断裂连接处存在 CNVs<sup>[20]</sup>。《美国妇产科学杂志 (American Journal of Gynecology and Obstetrics)》于 2018 年报道的对接受产前诊断且无 CNVs 异常高风险(如胎儿超声检查发现的结构异常等)的羊水样本进行 CNV-seq 的前瞻性临床研究结果显示,与核型分析相比,该技术对致病或可能致病的染色体异常的检出率由 1.8% 提高至 2.8%<sup>[14]</sup>。综上所述,具备条件的产前诊断机构可将 CNV-seq 作为一线产前诊断技术应用于临床。

随着 CNV-seq 技术被逐步用于产前诊断的临床实践,中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组、中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会、中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组共同成立专家组,讨论并提出将低深度全基因组测序技术应用于产前诊断中的专家共识,以期规范其临床应用,更好地服务于临床。

## 1 适用范围

1.1 对于有介入性产前诊断指征或需求的孕妇,在其充分知情的前提下,可将 CNV-seq 作为一线的产前诊断方法供其选择。

1.2 胎儿核型分析不能确定染色体畸变的来源和构成者。

1.3 胎儿新发染色体结构重排且无法排除重排过程是否导致染色体微缺失/微重复者。

1.4 夫妇为染色体平衡重排携带者。

1.5 需要行产前诊断排除染色体异常,但已无法进行羊水细胞培养的中晚期孕妇。

1.6 流产物、死胎或死产胎儿组织需明确遗传学病因者。

## 2 局限性

2.1 CNV-seq 无法检测三倍体及多倍体。

2.2 CNV-seq 无法发现染色体相互易位、倒位等染色体平衡性结构重排,也无法区分游离型三体(例如 47,XX,+21)和易位型三体(例如 46,XX,der(14;

21)),建议结合核型分析进行诊断。而且,在 CNV-seq 技术检测结果提示胎儿为 13、14、15、21、22 号染色体单体或三体时,建议对其父母行外周血染色体核型分析,以排除亲本存在染色体罗氏易位的可能。

2.3 当 CNV-seq 检测提示性染色体拷贝数异常时,为了明确是否为嵌合体以及具体细胞系的组成情况,建议进一步行荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization,FISH)检测。

2.4 对于由 47,XXX 与 45,X 两种性染色体非整倍体构成的嵌合体,若其细胞比例各占 50%,则 CNV-seq 会将其判断为 X 染色体拷贝数无异常。

2.5 CNV-seq 无法对包括单亲二倍体(uniparental disomy,UPD)在内的杂合性缺失(loss of heterozygosity,LOH)进行检测。若临床高度怀疑胎儿为单亲二倍体,则建议用短串联重复序列(short tandem repeats,STR)、单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism array,SNP array)等技术进行检测。

2.6 CNV-seq 检测对人类基因组中的高度重复区域存在局限性,部分染色体微缺失/微重复无法完全被检出。

2.7 CNV-seq 无法对单个碱基突变及小片段缺失/重复所导致的单基因疾病进行检测。

## 3 临床应用路线

3.1 在产前诊断的过程中,建议将 CNV-seq 技术与荧光定量 PCR(quantitative fluorescence PCR,QF-PCR)或者 STR 检测进行联合应用。QF-PCR 或者 STR 检测可以对样本的母源污染情况进行判断,确保检测结果反映胎儿的真实情况。

3.2 CNV-seq 的实验操作主要分为三步 (1)样本基因组 DNA 提取;(2)文库构建;(3)上机测序。其中,文库构建可以选择 PCR 或者 PCR-free 的方法进行。因 PCR-free 建库方法无 PCR 扩增偏好性,检测更精准,推荐使用该方法进行文库构建。实验操作应严格按照产前诊断实验室标准执行。各实验室在实验各环节均应有严格的质控标准。

3.3 在测序完成后,将样本的 DNA 序列与已知人类参考基因组序列进行比对,通过生物信息学分析,判断样本是否存在染色体非整倍体及 CNVs。通过检索数据库及查阅文献,参考美国医学遗传学会(American College of Medical Genetics,ACMG)指南<sup>[21]</sup>,对这些变异的致病性进行客观、全面的评价。

4 检测前遗传咨询

- 4.1 应充分重视检测前的遗传咨询,告知孕妇 CNV-seq 技术的适用范围与局限性,使孕妇及其家属在充分知情的前提下进行自主选择。
- 4.2 对夫妻双方的外周血样本和胎儿样本同时进行 CNV-seq 检测,将有利于及时确定 CNVs 的来源并判断胎儿 CNVs 的致病性。
- 4.3 CNV-seq 检测报告的结果可分为致病、可能致病、致病性未知 (variants of unknown significance, VOUS)、可能良性、良性等 5 种情况。对于致病性未知的结果,受限于目前医学对于人类疾病的认知,无法得到预期的判读。
- 4.4 因部分 CNVs 导致的疾病存在表现度与外显率的差异,同一疾病在不同患者中的临床表型可能会存在较大的差异。因此,即使胎儿与父母携带相同的 pCNVs,也可能无法通过其父母的表型确定胎儿出生后的表型。
- 4.5 CNV-seq 检测可能发现胎儿以及父/母存在迟发性疾病,目前父/母表型正常是由于尚未到发病的年龄。

5 检测后遗传咨询

- 5.1 在充分分析胎儿及其家系的临床信息与 CNV-seq 检测结果后,告知父母检测结果、相应的诊疗措施以及可能的其他后续检测项目。
- 5.2 致病或可能致病结果
- 5.2.1 常染色体非整倍体 建议终止妊娠。对于 13、14、15、21、22 号染色体的非整倍体,建议对父母行外周血染色体核型分析,排除存在罗氏易位的可能性。
- 5.2.2 性染色体非整倍体 可同时结合超声检测的结果,充分告知不同核型的胎儿在出生后可能出现的问题。
- 5.2.3 染色体缺失/重复 对于同时存在染色体末端缺失和重复者,建议对其父母进行染色体核型分析或 FISH 检测,以排除染色体平衡易位的可能性;对于一条染色体末端同时存在重复与缺失者,建议对其父母

- 进行染色体核型分析或者 FISH 检测,以排除染色体倒位的可能性;若 2 次及以上妊娠均发现胎儿存在同一 pCNVs,建议对父母进行染色体核型分析或者 FISH 检测,以排除双方染色体插入易位的可能性。
- 5.2.4 嵌合体 建议结合超声检查的结果进行综合判断,充分告知父母胎儿出生后可能出现的问题,以及无法在产前对胎儿预后进行准确评估。若继续妊娠,则建议胎儿出生后多组织取样进行 CNV-seq 分析并密切随访。
- 5.3 致病性未知结果 若胎儿的 CNVs 遗传自父母,则可参考其父母的表型进行遗传咨询;若胎儿的 CNVs 为新发突变,则建议结合超声检查的结果进行综合判断。受限于医学对人类疾病的认知,目前尚无法对所有的致病性未知结果给出准确的判读。建议加强监测胎儿的宫内发育及出生后情况,并密切随访。
- 5.4 良性或可能良性结果 表明胎儿因此类 CNVs 导致疾病的可能性较小。若胎儿超声及其他临床检测结果未发现明显异常,可建议继续妊娠,并进行常规产检;若胎儿超声或者其他临床检测提示异常结果,则建议转诊至上级产前诊断机构或胎儿医学中心进一步评估。
- 5.5 意外发现 若 CNVs-seq 检测中发现了有文献报道或病历记载的与神经系统、智力、迟发性疾病、胚细胞变异所致恶性肿瘤等相关的 pCNVs,同样需要告知患者,使其充分知情。
- 6 规范化临床应用
- 6.1 机构及人员资质 机构及人员资质应符合产前诊断管理办法的相关要求。
- 6.2 知情同意原则 在进行产前 CNV-seq 检测之前,应为孕妇及其家属提供充分的咨询并签署知情同意书,详细说明 CNV-seq 检测的适用范围和局限性。
- 6.3 报告发放 产前诊断报告应由具有副高以上职称、且具有产前诊断服务资质的临床医师签发,应在报告上明确说明所使用的 CNV-seq 检测技术平台以及该技术平台的检测内容和局限性。
- 利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突

参与本共识审定的专家(按姓氏拼音排序)

陈素华(华中科技大学同济医学院附属同济医院) 董昱岳(浙江大学医学院附属妇产科医院) 孔祥东(郑州大学第一附属医院)

李岭(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室) 梁德生 谭虎 郭玲仟(中南大学医学遗传学研究中心、湖南家辉遗传专科医院)

廖世秀(河南省人民医院) 刘洪倩 刘珊玲(四川大学华西第二医院) 刘俊涛(北京协和医院) 刘艳秋(江西省妇幼保健院)

强荣(西北妇女儿童医院) 孙路明(上海市第一妇婴保健院) 王华(湖南省妇幼保健院) 王治国(卫生部临床检验中心)

徐两蒲(福建省妇幼保健院) 尹爱华(广东省妇幼保健院) 朱宝生(云南省第一人民医院)

## 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告[S]. 2012. Ministry of Health, People's Republic of China. Report on Prevention and Treatment of Birth Defects[S]. 2012.
- [2] Evans MI, Wapner RJ, Berkowitz RL. Noninvasive prenatal screening or advanced diagnostic testing: caveat emptor[J]. Am J Obstet Gynecol, 2016, 215(3): 298-305. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.04.029.
- [3] Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review[J]. Genet Mol Biol, 2014, 37(1 Suppl): 210-219.
- [4] Weise A, Mrasek K, Klein E, et al. Microdeletion and microduplication syndromes[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60: 346-358. DOI: 10.1369/0022155412440001.
- [5] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(23): 2175-2184. DOI: 10.1056/NEJMoal203382.
- [6] Callaway JL, Shaffer LG, Chitty LS, et al. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(12): 1119-1123. DOI: 10.1002/pd.4209.
- [7] Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 41(6): 610-620. DOI: 10.1002/uog.12500.
- [8] Hayes JL, Tzika A, Thygesen H, et al. Diagnosis of copy number variation by Illumina next generation sequencing is comparable in performance to oligonucleotide array comparative genomic hybridization[J]. Genomics, 2013, 102(3): 174-181. DOI: 10.1016/j.ygeno.2013.04.006.
- [9] Dong Z, Zhang J, Hu P, et al. Low-pass whole-genome sequencing in clinical cytogenetics: a validated approach[J]. Genet Med, 2016, 18(9): 940-948. DOI: 10.1038/gim.2015.199.
- [10] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(8): 570-572. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2014.08.002.
- Collaborative Group for Application of Chromosome Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. Expert consensus on the application of chromosome microarray analysis in prenatal diagnosis[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2014, 49(8): 570-572. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2014.08.002.
- [11] Wang Y, Chen Y, Tian F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing[J]. Clin Chem, 2014, 60(1): 251-259. DOI: 10.1373/clinchem.2013.215145.
- [12] Wang Y, Zhu J, Chen Y, et al. Two cases of placental T21 mosaicism: challenging the detection limits of non-invasive prenatal testing[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(12): 1207-1210. DOI: 10.1002/pd.4212.
- [13] Mao J, Wang T, Wang BJ, et al. Confined placental origin of the circulating cell free fetal DNA revealed by a discordant non-invasive prenatal test result in a trisomy 18 pregnancy[J]. Clin Chim Acta, 2014, 433: 190-193. DOI: 10.1016/j.cca.2014.03.011.
- [14] Wang J, Chen L, Zhou C, et al. Prospective chromosome analysis of 3429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 219: 287.e1-287.e18. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.05.030.
- [15] Liang D, Peng Y, Lv W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(5): 519-526. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.05.002.
- [16] Xie C, Tammi MT. CNVS-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 80. DOI: 10.1186/1471-2105-10-80.
- [17] Liu S, Song L, Cram DS, et al. Traditional karyotyping vs copy number variation sequencing for detection of chromosomal abnormalities associated with spontaneous miscarriage[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 46(4): 472-477. DOI: 10.1002/uog.14849.
- [18] Cohen K, Tzika A, Wood H, et al. Diagnosis of fetal submicroscopic chromosomal abnormalities in failed array CGH samples: copy number by sequencing as an alternative to microarrays for invasive fetal testing[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(4): 394-401. DOI: 10.1002/uog.14767.
- [19] Zhu X, Li J, Ru T, et al. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(4): 321-327. DOI: 10.1002/pd.4782.
- [20] Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(10): 976-985. DOI: 10.1002/pd.3945.
- [21] Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants[J]. Genet Med, 2011, 13(7): 680-685. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a.

(收稿日期:2019-01-30)

(本文编辑 李岭)