

染色体基因组芯片在儿科遗传病的临床应用专家共识

中国医师协会医学遗传学分会

中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组

中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组

自 21 世纪初发现并证实基因组拷贝数变异 (copy number variations, CNV) 可导致人类遗传病以来^[1], 基因组病作为遗传病中的一类重要疾病, 受到越来越多关注。在欧美国家, 染色体基因组芯片分析 (chromosome microarray analysis, CMA) 目前已成为一项常规的临床遗传学诊断工具。继美国医学遗传学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 专家委员会 CMA 指南 (2010 年 10 月) 发布后^[2], 加拿大、澳大利亚、法国和比利时等国相继发布各自的相关 CMA 临床应用指南或共识^[3-4]。2014 年美国食品药品监督管理局首次批准 Affymetrix CytoScan Dx 芯片应用于临床检测, 为染色体芯片的临床应用提供了标准化的产品。近几年我国 CMA 的临床应用在逐步推广, 为众多遗传病患者提供了精确分子诊断。值得注意的是, 由于此项技术是一项复杂的临床检测项目, 涉及临床适用指征、芯片要求、实验流程和质量控制、数据分析、芯片结果验证、临床相关性解释、患者遗传咨询及转化研究等许多重要环节, 我国 CMA 的临床应用存在诸多不规范行为, 因此中国医师协会医学遗传学分会、中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组、中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组组织专家, 对 CMA 技术各个环节展开交流讨论, 形成了专家共识, 对该技术临床应用进行规范指导, 以期更好地发挥 CMA 在儿科遗传病的临床检测效果, 提高技术操作及数据分析的科学性、准确性、可靠性, 为更多地实验室开展 CMA 临床检测提供指导和依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.06.004

基金项目:科技部“中国重大出生缺陷与遗传病调查与生物资源收集”(2014FY110700);“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAI09B04)

通信作者:顾学范,200092 上海交通大学医学院附属新华医院上海市儿科医学研究所小儿内分泌/遗传科, Email: gu_xuefan@163.com

另外, 特别建议通过专家共识建立公共数据分享平台, 可更好地了解中国人群基因组失衡和临床表型之间的关系, 为 CMA 检测结果的临床解释提供更为可靠的依据。

一、基因芯片种类及原理

基于设计原理的不同, 基因芯片主要有两大平台。一种是比较基因组杂交芯片 (array-based comparative genomic hybridization, aCGH), 其基本原理是将待测样本 DNA 与正常对照样本 DNA 分别用不同的荧光标记, 通过与芯片上固定探针进行竞争性杂交获得定量的拷贝数检测结果; 另外一种单核苷酸多态性微阵列芯片 (single nucleotide polymorphism array, SNP array), 其基本原理是将探针连接在微珠上, 然后将携带探针的微珠随机黏附在芯片上, 待测样本 DNA 和探针进行杂交及单碱基延伸, 通过对荧光信号扫描, 分析待测样本 CNV 及基因型, 该平台在分析患者的基因组时不需要正常对照样本^[5]。通过 aCGH 技术能够准确地检出 CNV, 而 SNP array 除了能够检出 CNV 外, 还能够检测出大多数的单亲二倍体 (uniparental disomy, UPD) 和一定比例的嵌合体^[5]。近年来, 两大平台技术不断改进, 同时涵盖 CNV 和 SNP 的芯片具备双重优势, 在检测的敏感性、特异性、可靠性等方面有了很大改善。

二、CMA 在儿童遗传病诊断中的临床推荐指征

1. 推荐指征: 对以下临床表型的疾病, 建议将 CMA 作为一线检测手段: (1) 不明原因的智力落后和 (或) 发育迟缓。 (2) 非已知综合征的多发畸形。 (3) 自闭症谱系障碍。

国内外也有临床研究支持将身材矮小、肥胖、语言发育延迟、癫痫及其他精神神经发育障碍等作为 CMA 的应用指征。对此我们需要进一步积累临床数据, 以制定相应的指南。

当某种疾病或综合征根据临床评估可能为单

和(或)多基因点突变为主的疾病时,CMA 不应作为首选检测方法。

2. CMA 检测的优点^[6]:(1) 可在全基因组范围内同时检测多种染色体不平衡导致的遗传病。(2) 可同时检测染色体缺失和重复,且能比较准确、客观地界定 CNV(区间及大小),而不像核型分析那样依赖对区带强度的主观观察和判断。(3) 利用 SNP array 探针平台可同时检测杂合性缺失(loss of heterozygosity)和 >10% 比例的嵌合体。(4) 与核型分析相比,CMA 检测不需要进行细胞培养,分辨率高出近千倍,几乎可用于任何组织的 DNA 分析。

3. CMA 检测的局限性:(1) 不能检测染色体平衡易位、倒位及复杂性重排。(2) 不能检测出点突变和小片段插入。(3) 不能检测出低比例嵌合体(<10%)。(4) 可能检出临床意义不明的 CNV。

需要说明的是,没有一种芯片平台可检出某种综合征的所有相关突变,也无法检出芯片探针未覆盖的区域的 CNV,且目前 CMA 技术不能检测低于探针覆盖和检测能力以下的重复和缺失、基因表达异常和甲基化异常。

4. 可能的阳性率:CMA 的检测阳性率与疾病应用指征、疾病种类和芯片类型有关。

本多中心临床研究前期的数据表明:针对智力落后和(或)发育迟缓疾病患者,阳性率约为 19.2%,针对多发畸形疾患阳性率约 32.6%。此结果与国外的数据基本一致(13%~20%)^[2,7,9]。

三、CMA 实验室检测流程及质量控制

1. 实验前准备:(1) 临床应用芯片的基本参数要求:① 芯片探针应涵盖复发性基因组病(recurrent genomic disorders)及常见微缺失/微重复综合征区域,并覆盖亚端粒区域;② 全基因组的芯片(非靶向芯片)应可以检出 >400 kb 的 CNV;③ 芯片探针应包括能检出已知印迹区域的纯合区(absence of heterozygosity, AOH),及能评估血缘关系水平的全基因组 SNP 探针;④ 分辨率并非越高越好,需结合临床设计合适的芯片;⑤ 对已知致病性基因,在全基因组检测中需要针对这些基因增加探针密度以提高诊断的敏感性和准确性;⑥ 针对重复序列,良性的拷贝数多态位点和(或)会呈现假阳性重复或缺失导致不能真实反映样本 CNV 的区域,可不设计芯片探针。

(2) 芯片结果的临床验证:对全基因组 CMA 检测的临床验证应有别于对单基因病或特定综合征的检测方法,要求验证每一探针的性能是不现实的,也

没有必要。实验室应根据所选择的芯片平台,界定平台特异性检测最小变异(CNV, AOH)的能力,进而用携带有大于最小变异的阳性样本进行验证实验设计,采用规范的操作流程,以证明平台检测 CNV 及 AOH 的敏感性、特异性及可重复性。

(3) 受检样本的准备:CMA 检测的基因组 DNA 标本来源包括外周血、组织、唾液或口腔黏膜拭子等。不同的组织来源应使用恰当的基因组 DNA 提取方法并适合不同芯片平台对浓度和纯度的要求。

2. 实验质量控制:(1) 芯片流程质量控制:根据平台要求不同,芯片流程质量控制的原则是符合平台特异性的 QC 参数。(2) 软件分析:利用与平台配套的软件,通过前期验证制定合适的软件分析参数设置。软件的版本及设置需要在实验室的质量控制报告中明确显示,以便查询或重新分析数据时参考。

四、分析及解读报告原则^[5,10]

1. CNV 的解读原则:(1) 考虑基因组失衡区间的大小。从原则上讲,基因组失衡的区间越大,越可能有临床意义。但人类基因组中也有一些大于 1 Mb 的非致病性失衡;一些很小的 CNV 涉及关键基因或关键基因的一部分,也可能为致病性失衡。(2) 考虑所包含及邻近的基因及数目。从原则上讲,失衡区域包含的基因越多,越可能有临床意义。但包含基因的功能及致病性更为重要。在基因组中已经揭示一些非编码区域有重要的调控元件,也可能有重要的临床意义。(3) 与数据库资料进行比较。如:DECIPHER(<https://decipher.sanger.ac.uk/>)、DGV(<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)、ClinVar(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)、本地数据库(local database)和统一的中国人 CNV 数据库等。正常人群中出现类似的 CNV 变异越多,显示其临床意义良性的可能性就越大,但并不是在正常人群中出现过的变异就一定没有临床意义。(4) 一般缺失比重复更有临床意义。基因组中也有一些三倍剂量敏感基因(triplosensitivity)具有肯定的致病性。(5) 新发(*de novo*)变异比父母传递下来(*inherited*)的变异更可能具有致病性。但从正常父母传递下来的变异不一定没有临床意义;从患病的父母一方传递下来的变异也不一定致病,需要根据变异区域的剂量、大小、基因及数据库资料综合分析。

2. CNV 分类:依据 ACMG 指南,建议将 CNV 分成三大类 5 级,分类的基本原则如下:(1) 致病性 CNV:一段缺失或重复与一个已报道的微缺失/微重复综合征致病区域在位置和大小上匹配,或缺失中

包含因单倍剂量不足 (haploinsufficiency) 而致病的基因或基因的一部分,或重复中包含三倍剂量敏感基因的全部 (有关单倍剂量不足和三倍剂量敏感基因可查询 ClinGen 网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>。另外涉及多个基因的大片段缺失 (通常远大于 1 Mb) 或重复也为致病性,特别是新发变异。因不完全外显、表现多样等原因,相同致病类 CNV 并不一定导致相同的临床表型。(2) 可能致病性 CNV (90% 致病可能): 一段缺失或重复与一个已报道的致病性缺失或重复有部分重叠,或涉及可疑但并未在疾病致病机制中证实的基因,或涉及的基因虽有支持单倍剂量不足或三倍剂量敏感的证据,但不足以得出肯定结论。(3) 临床意义不明性 CNV (VUS): 此类变异不符合致病条件也不符合良性条件,文献报道中的结论尚未一致,暂没有足够的证据做肯定的分类。(4) 可能良性 CNV: 含有基因的变异在正常人群中多次发生,但发生率未达 1%。(5) 良性 CNV: 涉及的 CNV 在 DGV 数据库或内部数据库中的发生率 > 1%; 或该 CNV 已在多个同行审议的出版物或经审校的数据库 (如 ClinVar) 中报告为良性; 或正常人群中有发生,但不到 1% 的发生率, CNV 不包含任何基因或重要的基因组成部分。

3. AOH 的解读原则: AOH 大致有 3 种起因: (1) 血缘同一 (identity by descent, IBD): 这是由于父母是远亲关系。在基因组中表现为小的 AOH 分散在少数几条染色体上面。(2) 近亲关系 (consanguinity): 这是由于父母亲缘关系较近。在基因组中表现为许多染色体上有较大的 AOH 片段, 纯合区总和在基因组中所占比例可以反映亲缘关系的程度: 25% 左右的比例提示一级亲缘关系, 12.5% 左右的比例提示二级亲缘关系, 6.25% 左右的比例提示三级亲缘关系。虽然这些 AOH 本身不致病, 但会增加隐性遗传病的发生风险^[11]。对于近亲关系也需要做好检测前后的咨询。(3) 单亲二倍体 (uniparental disomy, UPD): 这是一类特殊的遗传现象, 是指某一染色体的两个拷贝均来源于父亲或母亲。包含异单亲二倍体 (heterodisomy) 和等单亲二倍体 (isodisomy) 两种情况。CMA 只能检测出等单亲二倍体。由 UPD 引起的 AOH 一般只发生在一条染色体上面, 有时整条染色体表现为 AOH, 有时因异单亲二倍体和等单亲二倍体发生在同一染色体上, AOH 表现为区域性 (segmental UPD)。已知第 6、7、11、14、15 及 20 号染色体有印迹致病基因^[12],

当 AOH 发生在这几条中的一条染色体 (较大可能性为 UPD) 时, 该 AOH 可分类为可能致病, 需进一步证实是 UPD, 并结合临床表征进行分析^[3]。

对于报告 AOH, 除了第三类 AOH 中提到的发生在第 6、7、11、14、15 及 20 号染色体上的 AOH 归属可能致病外, 其他 AOH 临床意义均不明确, 应结合临床表型, 寻找隐性致病基因外显的可能。

五、实验室报告

1. 实验室报告的标准: 每个实验室根据自己的规定报告分类后的 CNV/AOH。实验室可以选择不报告良性甚至可能良性 CNV。实验室报告中对每一个 CNV, 应包含以下信息: (1) 细胞遗传学定位 (染色体编号和细胞遗传学条带名称); (2) 剂量: 例如拷贝数重复及重复的次数和 (或) 缺失及缺失的拷贝数结果, 特别表明男性 X 或 Y 染色体上一个拷贝数缺失导致的 0 拷贝结果; (3) 指定的基因组版本下的 CNV 大小与坐标。

参考模板: 人类细胞遗传学命名国际系统 (ISCN) 的标准写法^[13]:

Arr[hg19] 7q11.22(70133271-70201544)x1

另外 CNV 还需要用通俗的方式描述出来, 参考格式如表 1。

2. 特殊情况下的报告: (1) 隐性遗传基因的携带状态。在此类情况下, 可能有必要建议对该疾病做进一步的分子检测, 若未确认有第二个突变, 此 CNV 对所患疾病无诊断价值, 但是被检测者为隐性致病基因的携带者。(2) 报告成年发病者症状发生前或未确诊疾病的突变状态。某些 CNV 尽管与患者就诊原因无关, 但可能对尚未发生或临床上未检测到的疾病具有明确的诊断价值 (例如涉及 Y 染色体上 AZF 区的基因缺失引起的男性不育), 遵照 ACMG 指南, 建议报告出此 CNV, 以指导就医。个别实验室可能希望对特定疾病采取不予报告, 但在实验室报告中申明。

六、遗传咨询

1. 检测前遗传咨询: 临床医生在开具 CMA 检查前, 应对监护人详细告知检测方法、芯片类型、可检测的疾病、可能出现的检测结果。

2. 针对检测报告的遗传咨询: 临床医生需针对报告结果给家属提供准确的遗传咨询: (1) 基因型与表型的关系, 疾病的遗传方式: 将已报道的携带类似 CNV 的患者主要表型与先证者进行对比, 了解基因型与表型的关系; 从 CNV 的来源, 以及数据库等综合信息判断, 解释先证者 CNV 的类型。(2) 再发

表 1 拷贝数变异描述的参考格式

染色体	坐标(hg19)	变异大小(kb)	细胞遗传学条带	变异类型(缺失, 重复)	基因	变异分类
Chr7	70133271-70201544	68	7q11.22	缺失(1 个拷贝)	AUTS2	致病性

风险以及其子代的发生风险评估:根据 CNV 是否来自父母,或源于父母的染色体平衡易位,评估再发风险。根据 CNV 的类型,评估先证者子代的发生风险。(3)疾病的自然进程以及必要的预防性措施:对已报道的类似 CNV 携带者文献进行回顾,将此类患者的疾病进程,可能出现的疾病风险,以及应采取的预防措施告知监护人。(4)产前诊断的方法:对已知的致病性 CNV,告知可通过何种方法进行产前诊断及不同方法的优缺点。(5)先证者确诊对家族中其他成员的影响,是否有必要对家族中其他成员进行遗传学检测,为家族中可能的携带者进行遗传咨询和必要的遗传学检测。

(余永国 沈亦平 执笔)

参与本共识审定人员(以姓氏拼音为序):广西妇幼保健院儿童内分泌遗传代谢科(陈少科);上海交通大学医学院附属新华医院儿童内分泌/遗传科(范燕洁、顾学范、韩连书、邱文娟、叶军、余永国、张惠文);首都医科大学附属北京儿童医院儿内分泌遗传代谢中心(巩纯秀);华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科(罗小平);北京协和医院儿科(邱正庆);上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心遗传科(沈亦平);湖南省妇幼保健院遗传研究室(王华);北京大学第一医院小儿神经内科(王静敏);中南大学湘雅医院产科(邹玲仟);南京市妇幼保健院产前诊断中心(许争峰);中日友好医院儿科(张知新)

参与本共识讨论人员(以姓氏拼音为序):广西妇幼保健院儿童内分泌遗传代谢科(陈少科);上海交通大学医学院附属新华医院儿童内分泌/遗传科(范燕洁、顾学范、韩连书、邱文娟、叶军、余永国、张惠文、梁黎黎);首都医科大学附属北京儿童医院儿内分泌遗传代谢中心(巩纯秀、吴迪);北京大学第一医院小儿神经内科(姜玉武、王静敏);华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科(梁雁、罗小平);上海交通大学附属儿童医院内分泌科(李斌);广州市妇女儿童医疗中心内分泌代谢科(刘丽);复旦大学附属儿科医院内分泌与遗传代谢科(罗飞宏);中国医科大学附属盛京医院儿保科(麻宏伟);上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心遗传科(沈亦平);南京医科大学附属南京儿童医院内分泌科(石星);温州市中心医院妇产科(唐少华);湖南省妇幼保健院遗传研究室(王华);上海交通大学医学院附属瑞金医院儿内科(王伟);南京市妇幼保健院产前诊断中心(许争峰);中日友好医院儿科(张知新)

参 考 文 献

[1] Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders [J].

- Nature genetics, 2007, 39(7 Suppl): S48-54. DOI: 10.1038/ng2092.
- [2] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749-764. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
- [3] Dawson AJ, Chernos J, McGowan-Jordan J, et al. CCMG guidelines: prenatal and postnatal diagnostic testing for uniparental disomy [J]. *Clin Genet*, 2011, 79(2): 118-124. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01547.x.
- [4] Palmer EE, Peters GB, Mowat D. Chromosome microarray in Australia: a guide for paediatricians [J]. *J Paediatr Child Health*, 2012, 48(2): E59-67. DOI: 10.1111/j.1440-1754.2011.02081.x.
- [5] Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities [J]. *Genet Med*, 2010, 12(11): 742-745. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181f8baad.
- [6] Cooley LD, Lebo M, Li MM, et al. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders [J]. *Genet Med*, 2013, 15(6): 484-494. DOI: 10.1038/gim.2013.49.
- [7] Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray [J]. *Genet Med*, 2008, 10(6): 415-429. DOI: 10.1097/GIM.0b013e318177015c.
- [8] Thureson AC, Bondeson ML, Edeby C, et al. Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 118(1): 1-7. DOI: 10.1159/000106434.
- [9] Lu XY, Phung MT, Shaw CA, et al. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis [J]. *Pediatrics*, 2008, 122(6): 1310-1318. DOI: 10.1542/peds.2008-0297.
- [10] 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.
- [11] Wang JC, Ross L, Mahon LW, et al. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(5): 663-671. DOI: 10.1038/ejhg.2014.153.
- [12] Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Uniparental disomy and human disease: an overview [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010, 154c(3): 329-334. DOI: 10.1002/ajmg.c.30270.
- [13] Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013) [M]. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers, 2013.

(收稿日期:2016-03-20)

(本文编辑:江澜)