

采用全基因组测序技术快速诊断危重症新生儿的临床实践

肖非凡¹ 卢宇蓝¹ 吴冰冰¹ 董欣然¹ 程国强²胡黎园² 周文浩^{1,2} 彭小敏¹ 杨琳¹ 王慧君¹

(国家儿童医学中心/复旦大学附属儿科医院 1.分子医学中心; 2.新生儿科, 上海 201102)

[摘要] **目的** 探索全基因组测序在危重症新生儿临床快速诊断中的应用。**方法** 前瞻性纳入2019年8—9月复旦大学附属儿科医院新生儿重症监护病房中进行核心家系全基因组测序的危重症患儿。结合测序数据和患儿的临床特征, 分析患儿基因检测结果、临床转归。**结果** 共检测15例患儿, 男9例, 女6例。主要入院原因为呼吸异常7例, 反应差、喂养困难各2例, 发热、低体温、早产、抽搐各1例。全基因组测序平均检测周期为4.5 d。最终, 3例患儿获得基因诊断, 诊断阳性率为20% (3/15)。其中, 2例患儿因病情较重, 父母放弃治疗; 1例患儿于送检样本当日死亡, 基因检测结果可解释病因。**结论** 全基因组测序技术可为临床怀疑遗传性疾病的危重症新生儿提供及时有效的诊断, 为临床处置危重症病例提供遗传学依据。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (2): 135-139]

[关键词] 危重症; 遗传性疾病; 全基因组测序; 新生儿

Clinical practice of whole-genome sequencing in the rapid diagnosis of critically ill neonates

XIAO Fei-Fan, LU Yu-Lan, WU Bing-Bing, DONG Xin-Ran, CHENG Guo-Qiang, HU Li-Yuan, ZHOU Wen-Hao, PENG Xiao-Min, YANG Lin, WANG Hui-Jun. Center for Molecular Medicine, Children's Hospital of Fudan University/National Children's Medical Center, Shanghai 201102, China (Wang H-J, Email: huijunwang@fudan.edu.cn)

Abstract: Objective To explore the application of whole-genome sequencing (WGS) in the rapid clinical diagnosis of critically ill neonates. **Methods** The critically ill neonates who admitted to the neonatal intensive care unit of Children's Hospital of Fudan University and underwent WGS from August to September, 2019 were enrolled in this prospective study. The genetic testing results and clinical outcome were analyzed with reference to the sequencing data and clinical features of the neonates. **Results** A total of 15 neonates were tested, among whom there were 9 boys and 6 girls. The main reason for hospitalization included abnormal breathing in 7 neonates, poor response in 2 neonates, feeding difficulty in 2 neonates, fever in 1 neonate, hypothermia in 1 neonate, preterm birth in 1 neonate, and convulsion in 1 neonate. The mean turn-around time was 4.5 days for WGS. Finally a genetic diagnosis was obtained for 3 neonates, with a positive diagnostic rate of 20% (3/15). Among the 3 neonates, 2 neonates were withdrawn from the treatment due to severe conditions and 1 neonate died on the day when the sample was sent for genetic testing, whose etiology could be explained by the results of genetic testing. **Conclusions** WGS technique can provide a timely and effective diagnosis for critically ill neonates suspected of genetic diseases and provide genetic evidence for clinical treatment of critically ill cases.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(2): 135-139]

Key words: Critical illness; Genetic disease; Whole-genome sequencing; Neonate

儿童是遗传性疾病的高发人群^[1-2], 遗传因素是导致危重症新生儿早期死亡的重要原因^[3]。但是, 遗传性疾病在生命早期的临床表现缺乏特异

性, 临床诊断困难。因此, 早期明确是否存在遗传性病因, 对危重症新生儿的治疗及预后至关重要^[4]。目前, 快速基因检测技术已在危重症新生

[收稿日期] 2022-10-21; [接受日期] 2022-12-30

[作者简介] 肖非凡, 男, 硕士研究生, 住院医师。

[通信作者] 王慧君, 女, 研究员。Email: huijunwang@fudan.edu.cn。

儿疾病诊断方面具有良好的应用^[5]。全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 可检测整个基因组的编码区和非编码区序列, 是检测范围最广的技术, 可为遗传性疾病的诊断提供更为全面的线索^[6-7]。本文旨在通过临床的应用研究, 探索 WGS 在临床快速诊断危重症新生儿中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为前瞻性研究, 经复旦大学附属儿科医院伦理委员会审核批准 (批准号: 2019-066), 并获得患儿监护人知情同意。以 2019 年 8—9 月间在复旦大学附属儿科医院进行 WGS 检测的危重症患儿为研究对象, 分析患儿临床特征、基因检测结果、结局转归。纳入标准: (1) 在新生儿重症监护病房 (neonatal intensive care unit, NICU) 中怀疑为遗传因素致病的危重症新生儿 (日龄 ≤ 28 d), 出现肌力或肌张力异常、先天结构畸形、反复感染、血或尿串联质谱遗传代谢指标异常等; (2) 进行了一家三口 (患儿和其父母) 的 WGS 检测。排除标准: (1) 患儿已经获得产前基因诊断; (2) 无法取得患儿监护人知情同意。

1.2 WGS 的检测方法

抽取患儿及其父母外周静脉血各 2 mL, 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 抽提基因组 DNA。通过 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。患儿样本测序深度为 $40\times\sim 50\times$, 测序数据量为 120 Gb; 患儿父母样本的测序深度为 $8\times\sim 10\times$, 测序数据量为 30 Gb。应用 Illumina 公司的 Dynamic Read Analysis for GENomics Bio-IT (DRAGEN) 平台对测序数据进行超快速分析。依据美国医学遗传学与基因组学学会评级标准对检测到的变异进行评级^[8]。上述流程中, DNA 提取和建库用时约 12 h, 基因组测序约 42 h, 测序数据处理及变异检测约 19 h, 测序数据解读约 1 h。

1.3 临床资料收集

收集患儿性别、入院年龄、孕产次、出生体重、孕周、出生方式、入院主诉、主要症状等资料。通过门诊或电话随访患儿预后情况。

1.4 WGS 的数据分析流程

针对危重症家系的 WGS, 采用快速反应流程, 优化了从血样和临床信息采集到向临床医生报告候选致病变异的数据分析流程^[9]。

全部流程包括: 测序实验; 原始数据快速生成; 序列生成、变异格式转化和筛选; 临床信息处理; 候选变异解读。其中, 测序实验包括血液样本编号和家系关系登记、DNA 质控、测序上机、FastQ 产出与质控。测序数据分析过程包括使用 DRAGEN 进行数据生成、快速变异检测、再次质控, 校验性染色体, 变异注释筛选, 校验家系关系以辅助遗传模式分析。临床信息处理包括病史标准术语化处理和基于临床表型的候选基因分析。病史标准术语化处理包括基本的自然语言处理和现有的国际疾病分类 (第 10 版) 转化等, 以将原始病历转化为人类表型术语 (Human Phenotype Ontology)。临床表型分析以基于表型的候选基因优选为目标, 主要采用 PhenoPro 算法, 根据综合的标准化人类表型术语对可能的致病基因进行排序。最后, 遗传诊断团队基于筛选的变异和患儿的表型, 对变异的致病性进行综合评估。

2 结果

2.1 一般情况及临床特征

共纳入 15 例患儿, 入院年龄为 2 h 至 28 d, 中位年龄为 5 d, 其中男 9 例 (60%), 女 6 例 (40%); 早产儿 8 例 (53%), 足月儿 7 例 (47%); 剖宫产 9 例 (60%), 顺产 6 例 (40%)。主要入院原因为呼吸异常 7 例 (47%), 反应差、喂养困难各 2 例 (13%), 发热、低体温、早产、抽搐各 1 例 (7%)。详细临床特征见表 1。

表 1 15 例患儿的基本临床特征、基因检测结果及临床转归

编号	性别	入院原因	主要诊断	致病基因变异	临床转归
1	女	喂养困难	新生儿败血症, 新生儿喂养问题, 新生儿脑病	未发现	好转
2	女	反应差	室间隔缺损、动脉导管未闭、卵圆孔未闭, 皮肤赘生物 (先天性多发), 面横裂	未发现	好转
3	女	呼吸异常	先天性脑积水, 动脉导管未闭, 膈膨升, 新生儿高胆红素血症	未发现	死亡
4	男	反应差	新生儿脑病, 新生儿肌张力障碍, 新生儿窒息, 小颌畸形	未发现	放弃治疗

表 1 (续)

编号	性别	入院原因	主要诊断	致病基因变异	临床转归
5	男	呼吸异常	中枢性呼吸衰竭, 新生儿脑病 (脑损伤), 新生儿高胆红素血症, 硬膜下出血	未发现	放弃治疗
6	女	低体温	代谢性酸中毒 (高乳酸血症), 心肌酶谱异常 (心肌损害), 动脉导管未闭、卵圆孔未闭	未发现	好转
7	男	呼吸异常	肥厚型梗阻性心肌病、卵圆孔未闭、室间隔缺损、肺动脉高压	<i>PTPN11</i> : c.1528C>G (致病变异)	死亡
8	男	呼吸异常	消化道穿孔 (剖腹探查术后)、肠扭转、肠坏死、腹水、胎粪性腹膜炎, 早产儿, 新生儿窒息、新生儿呼吸衰竭, 代谢性酸中毒, 新生儿败血症	<i>CHD7</i> : c.8639C>T (临床意义未明变异)	死亡
9	男	喂养困难	皮-罗综合征, 新生儿肺炎, 隐匿性阴茎, 心包积液 (少量)、卵圆孔未闭	<i>COL11A1</i> : c.2295+1G>A (可疑致病变异)	死亡
10	男	发热	前脑无裂畸形、胼胝体先天性畸形 (无胼胝体)、小头畸形, 隐匿性阴茎, 甲状腺功能异常	未发现	好转
11	女	呼吸异常	中枢性呼吸衰竭, 新生儿败血症, 动脉导管未闭、房间隔缺损	<i>PHOX2B</i> : c.756_776dup (致病变异)	死亡
12	男	早产	高氨血症、高乳酸血症, 多脏器损伤	未发现	死亡
13	男	呼吸异常	多脏器损伤, 凝血障碍, 新生儿败血症	未发现	放弃治疗
14	男	呼吸异常	新生儿败血症, 弥散性血管内凝血, 新生儿血小板减少	未发现	死亡
15	女	抽搐	新生儿惊厥, 小头畸形, 脑积水	未发现	好转

2.2 WGS检测结果分析

WGS平均检测周期为4.5 d, 最短为72 h。3例患儿 (患儿7、9、11) 经WGS检测后获得基因诊断, 诊断阳性率为20% (3/15)。

患儿7因早产生后气促呻吟入院, 临床表型为肥厚型梗阻性心肌病、室间隔缺损、肺动脉高压, WGS检测到*PTPN11*基因存在错义变异c.1528C>G (p.Q510E)。*PTPN11*基因是常染色体显性遗传的Noonan综合征的致病基因。截至2022年12月, ClinVar数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) 已有20余篇文献与该变异有关, 并将其评为致病变异。本例患儿父母均未携带该变异, 分析为新发变异, 其心脏表现是典型的Noonan综合征心脏表型, 结合临床与变异位点分析, 该患儿诊断为Noonan综合征。患儿入院后反复出现经皮血氧饱和度波动, 后因呼吸困难明显、血氧饱和度持续降低予以气管插管, 气管插管加压下可维持血氧饱和度。患儿家属基于患儿病情及家庭经济情况, 选择放弃治疗, 拔管后患儿死亡。分析文献显示, 该位点的多个病例均在数月内因严重心脏问题夭折^[10-11]。

患儿9因生后2 d喂养困难入院, 临床表现为皮-罗综合征, WGS检测到*COL11A1*基因存在剪接变异c.2295+1G>A, 该变异位点未见报道, 经Sanger验证, 确认遗传自父亲 (父亲自述表型正

常, 但未来院进行相关检查)。*COL11A1*基因变异可导致常染色体显性遗传病Stickler综合征II型。本例患儿下颌短小、舌根后坠、腭裂、隐匿性阴茎, 符合该综合征表型。根据美国医学遗传学与基因组学学会评级依据^[8], 该变异评为可疑致病变异 (PVS1+PM2_S), 该患儿诊断为Stickler综合征。本例患儿因舌根后坠及下颌短小导致呼吸困难, 血氧饱和度不能维持。外科会诊后建议手术, 家属拒绝并出院。最终患儿死亡。结合患儿病史及基因检测结果, 推测该基因变异导致的畸形引起呼吸功能障碍是患儿的直接死亡原因。

患儿11因阵发性发绀半天入院, 主要表型为中枢性呼吸衰竭, WGS检测到*PHOX2B*基因存在新发插入变异c.756_776dup(p.Ala254_Ala260dup)。*PHOX2B*基因是先天性中枢性低通气综合征的致病基因, 呈常染色体显性遗传。ClinVar数据库记录有7篇文献报道该变异, 评级为致病变异。既往文献^[12]报道该病患儿需有创机械通气支持。本例患儿临床表现为中枢性呼吸衰竭, 住院期间需呼吸机辅助呼吸, 基因检测结果回报前, 患儿家属已要求放弃治疗, 后患儿死亡。

此外, 在患儿8的*CHD7*基因编码区38号外显子上发现一个临床意义未明变异: c.8639C>T (p.Q510E), 变异位点遗传自母亲。

2.3 临床结局及转归

3 例基因诊断阳性的患儿（患儿 7、9、11）均死亡。携带临床意义未明变异的患儿 8，因胎粪性腹膜炎行剖腹探查术，术中见全肠全坏死，患儿父母决定放弃治疗后患儿死亡。11 例基因检测结果为阴性的患儿中，5 例病情好转；3 例患儿需呼吸机辅助通气，家属考虑患儿预后不良，放弃治疗；3 例患儿随访结局死亡。

3 讨论

我们前期的数据显示，约 20%（44/223）的 NICU 死亡患儿存在遗传致病因素^[13]。早期基因诊断可协助临床医生改善危重症新生儿的管理策略。一些传统的遗传检测方法，如核型分析和基因芯片技术，难以检测单基因位点的变异。目前，国内已有多项研究^[14-16]证实基因包测序和/或全外显子组测序技术具有很好的临床应用价值。但是，这些测序技术并不能全面覆盖整个基因组的变异情况。近年来，一些团队已经尝试将 WGS 用于危重症患儿的快速遗传性病因检测。一项纳入 11 篇文献的荟萃分析^[5]结果表明，快速 WGS 技术在危重症婴儿中的综合诊断率为 37%，说明快速 WGS 在危重症患儿的遗传性病因检测中具有良好的应用价值。

本研究检测 15 例患儿，其中 3 例获得基因诊断，诊断阳性率为 20%，与国外的 WGS 诊断阳性率接近^[17]。结合国内临床实际应用情况，本研究采用高性价比的测序方案，即对患儿样本使用测序深度为 $40\times\sim 50\times$ ，父母样本使用 $8\times\sim 10\times$ 的低覆盖测序，在确保有效检测效果的同时降低测序成本。常规高通量测序，因需要进行目标区域捕获建库，需要耗时 3 周以上，本研究中 WGS 检测，因不需要进行目标序列捕获，节省建库时间，平均检测周期仅为 4.5 d，极大地缩短了检测时间。WGS 检测数据量庞大，数据处理和变异解读是目前一个难点问题。本研究基于实验室已经开发的高通量测序数据一体化全流程分析系统^[9]，根据不同变异类型的特点，按照单核苷酸变异和小插入/缺失，拷贝数变异、结构变异、非编码区域的变异注释、线粒体和杂合性缺失分别进行注释和筛选，将结果统一汇总至基因层面进行分析，便于数据解读人员结合受检患儿的临床表型，提升

解读效率。当然，对于在 WGS 数据中发现的临床意义未明变异，仍需结合人工判读、病例表型随访进行致病性分析。

遗传性疾病的临床表型在新生儿期没有特异性，临床诊断困难，易错过最佳治疗时间。既往研究^[6]显示，仅有 10% 的病例可根据典型的临床表型预测出最有可能导致疾病的基因。与既往报道^[6]类似，本研究纳入的 15 例患儿入院主诉均不典型，主要表现为呼吸系统异常、反应差及喂养困难等常见的新生儿疾病临床症状。在明确诊断后，我们对基因诊断阳性患儿的表型与基因诊断阴性的患儿表型进行比较，无法获得较为特异性的表型，难以根据表型进行阳性诊断的预测。因此，采用快速 WGS 检测有利于尽早查明 NICU 患儿的病因，明确诊断，确定治疗方案并进行相应的遗传咨询。

目前 NICU 日均住院费用在 2 000 元以上，长时间的维持治疗给患儿家庭带来了沉重的经济负担，家属急迫需要知道具体的病因。有些遗传性疾病需要在生命早期尽快干预，而一些遗传性疾病在现有的医疗条件下缺乏有效治疗手段，只能进行姑息治疗。快速的基因检测的结果可以为病因诊断提供重要依据，辅助临床医生做出最佳的医疗决策，还有可能减轻患儿及其家庭的痛苦，避免无效努力。这其中需要遵循遗传咨询的相关伦理问题。在基因检测前，临床医生应详细地向患儿家属解释基因检测在病因诊断中的意义。获得基因检测结果后，临床医生应客观地告知患儿家属关于该疾病的知识，强调遗传性疾病在个体间存在的差异，科学引导患儿家属做出合理选择。

本研究尚有两点局限性值得探讨。首先，WGS 数据量庞大，对生物信息学分析和临床解读要求非常高，需要配备相应的信息处理系统和生物信息分析团队，短期内难以在各医院推广应用；其次，WGS 数据的变异解读基于对现有疾病知识的认知，一些患儿的数据可能在之后的数据更新中获得诊断，可能需要医生和家属配合提供进一步的临床随访信息，定期更新数据分析。

综上，WGS 可为临床怀疑为遗传性疾病的危重症新生儿提供全面、快速、高性价比的遗传检测技术，缩短等待时间，为临床处置危重症病例提供诊断依据。

利益冲突声明：所有作者均声明不存在利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] Kingsmore SF, Cakici JA, Clark MM, et al. A randomized, controlled trial of the analytic and diagnostic performance of singleton and trio, rapid genome and exome sequencing in ill infants[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105(4): 719-733. PMID: 31564432. PMCID: PMC6817534. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.08.009.
- [2] Ceyhan-Birsoy O, Murry JB, Machini K, et al. Interpretation of genomic sequencing results in healthy and ill newborns: results from the BabySeq Project[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 104(1): 76-93. PMID: 30609409. PMCID: PMC6323417. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.11.016.
- [3] Jacob J, Kamitsuka M, Clark RH, et al. Etiologies of NICU deaths[J]. *Pediatrics*, 2015, 135(1): e59-e65. PMID: 25489010. DOI: 10.1542/peds.2014-2967.
- [4] de Castro MJ, González-Vioque E, Barbosa-Gouveia S, et al. Rapid phenotype-driven gene sequencing with the NeoSeq panel: a diagnostic tool for critically ill newborns with suspected genetic disease[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(8): 2362. PMID: 32718099. PMCID: PMC7464859. DOI: 10.3390/jcm9082362.
- [5] Xiao F, Yan K, Tang M, et al. Diagnostic utility of rapid sequencing in critically ill infants: a systematic review and meta-analysis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2022, 22(8): 833-840. PMID: 36082848. DOI: 10.1080/14737159.2022.2123704.
- [6] French CE, Delon I, Dolling H, et al. Whole genome sequencing reveals that genetic conditions are frequent in intensively ill children[J]. *Intensive Care Med*, 2019, 45(5): 627-636. PMID: 30847515. PMCID: PMC6483967. DOI: 10.1007/s00134-019-05552-x.
- [7] Wang H, Lu Y, Dong X, et al. Optimized trio genome sequencing (OTGS) as a first-tier genetic test in critically ill infants: practice in China[J]. *Hum Genet*, 2020, 139(4): 473-482. PMID: 31965297. DOI: 10.1007/s00439-019-02103-8.
- [8] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405-424. PMID: 25741868. PMCID: PMC4544753. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- [9] 陈宾,董欣然,王慧君,等.复旦大学附属儿科医院高通量测序数据一体化全流程闭环分析及临床应用案例分析[J]. *中国循证儿科杂志*, 2022, 17(3): 202-209. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2022.03.006.
- [10] Faienza MF, Giordani L, Ferraris M, et al. *PTPN11* gene mutation and severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy: what is the link? [J]. *Pediatr Cardiol*, 2009, 30(7): 1012-1015. PMID: 19582499. DOI: 10.1007/s00246-009-9473-7.
- [11] Chen H, Li X, Liu X, et al. Clinical and mutation profile of pediatric patients with RASopathy-associated hypertrophic cardiomyopathy: results from a Chinese cohort[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 29. PMID: 30732632. PMCID: PMC6367752. DOI: 10.1186/s13023-019-1010-z.
- [12] Woo HY, Oh C, Han JW, et al. Clinical features of children with Haddad syndrome: a single-center experience[J]. *J Pediatr Surg*, 2020, 55(3): 387-392. PMID: 30850150. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2019.01.066.
- [13] Yang L, Liu X, Li Z, et al. Genetic aetiology of early infant deaths in a neonatal intensive care unit[J]. *J Med Genet*, 2020, 57(3): 169-177. PMID: 31501239. DOI: 10.1136/jmedgenet-2019-106221.
- [14] Zhu T, Gong X, Bei F, et al. Application of next-generation sequencing for genetic diagnosis in neonatal intensive care units: results of a multicenter study in China[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 565078. PMID: 33240318. PMCID: PMC7677510. DOI: 10.3389/fgene.2020.565078.
- [15] 齐志业,段江,贺湘英,等.全外显子组测序在危重症新生儿单基因遗传病中的临床应用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(7): 640-643. PMID: 31315761. PMCID: PMC7389093. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.07.005.
- [16] 陈玉兰,张又祥,杨秀芳,等.全外显子测序技术在危重症新生儿遗传病中的应用价值[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(12): 1261-1266. PMID: 33327995. PMCID: PMC7735930. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2007109.
- [17] Dimmock DP, Clark MM, Gaughran M, et al. An RCT of rapid genomic sequencing among seriously ill infants results in high clinical utility, changes in management, and low perceived harm[J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 107(5): 942-952. PMID: 33157007. PMCID: PMC7675004. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.10.003.

(本文编辑:王颖)