

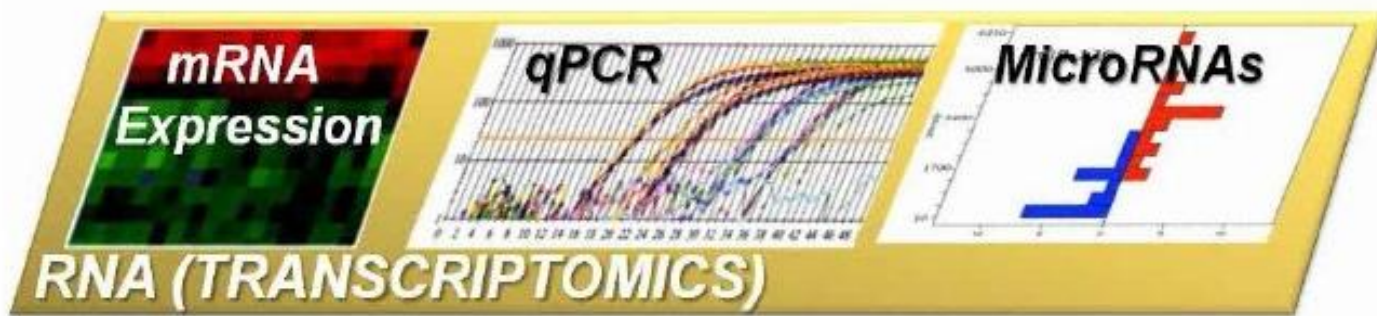
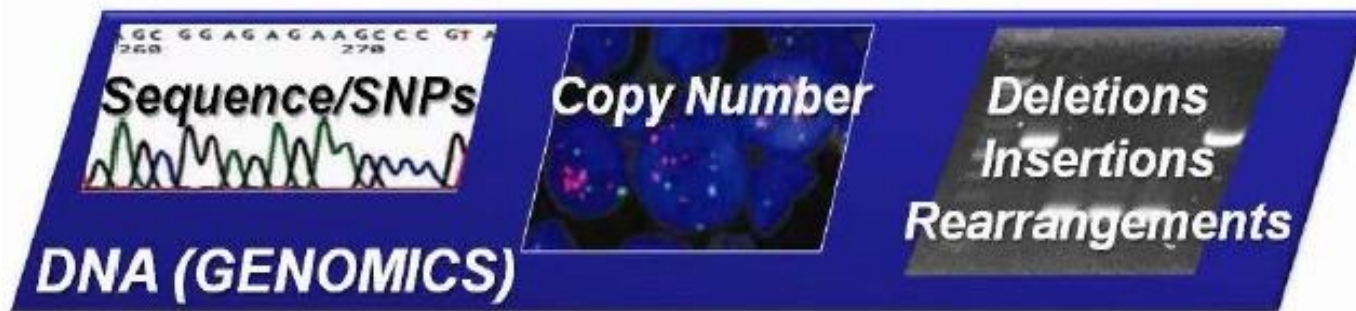
分子诊断在无创产前筛查和 个性化诊疗中的应用

中山大学附属第一医院 黄彬



2015年，“精准医疗”在全球生命科学和医学等领域掀起了新的热潮！





随着技术的进步，我们进入分子医学时代，
基因测序等技术带动的精准医疗应运而生！

精准医疗

——新型的医学概念 与医疗模式



- **2015年1月20日**美国总统奥巴马宣布启动“精准医疗”计划，**2.15亿美元**
 - 通过分析逾**100**万名志愿者的基因信息，了解遗传性变异在疾病发生发展中的作用
 - 了解疾病治疗的分子基础
 - 为药物研发和患者的“精准治疗”明确靶标
- 其短期目标是为癌症找到更多更好的治疗手段
- 长期目标则是为实现多种疾病的**个性化治疗**

精准检测



精准医疗



个性化精准治疗



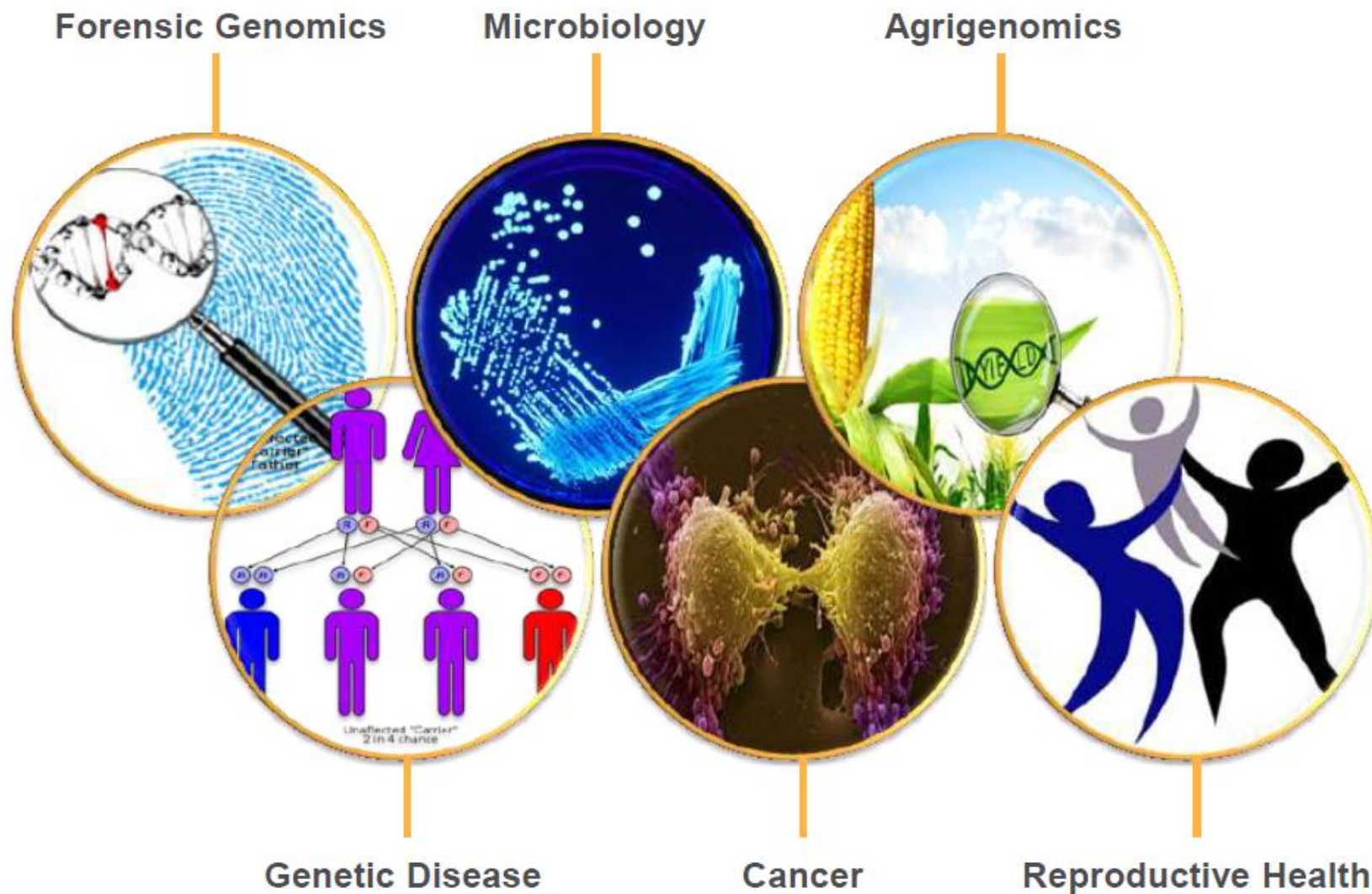
精准医疗下的分子诊断

基因测序技术
疾病发病机制
临床疾病分子分型
指导诊治标记物
药物设计靶点
临床队列研究
生物学大数据

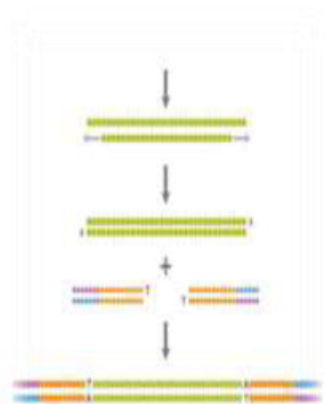


- 易感筛查
- 发病机制
- 诊断
- 治疗方案选择及制定
（个性化治疗）
- 治疗监测
- 预后判断

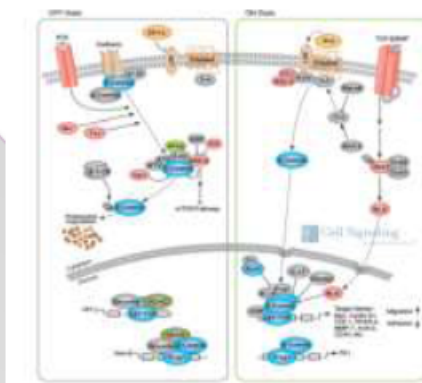
高通量测序技术的应用



高通量测序技术流程



illumina二代测序仪



测序样品制备

簇生成
Clustering

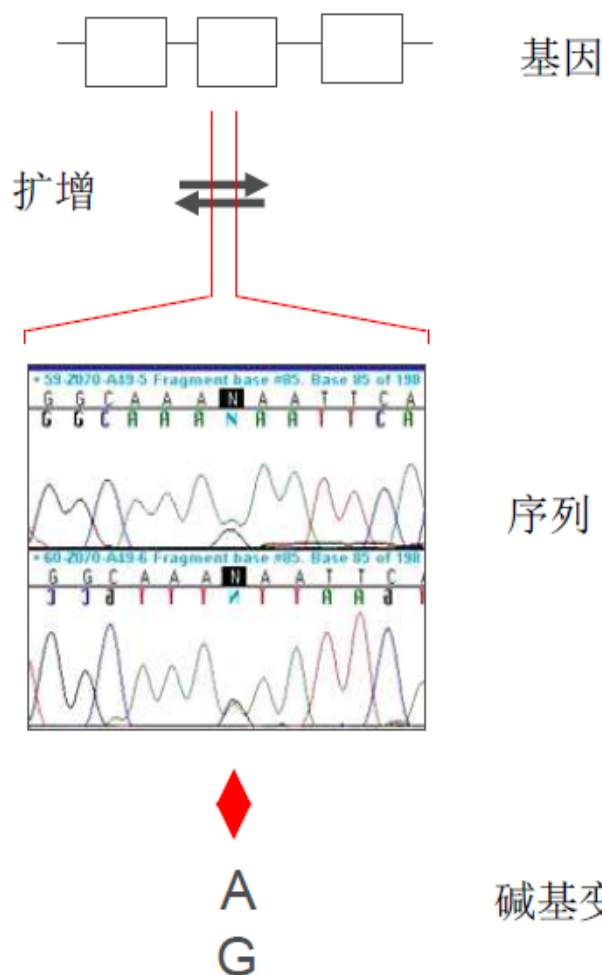
测序
Sequencing

数据分析
Analysis

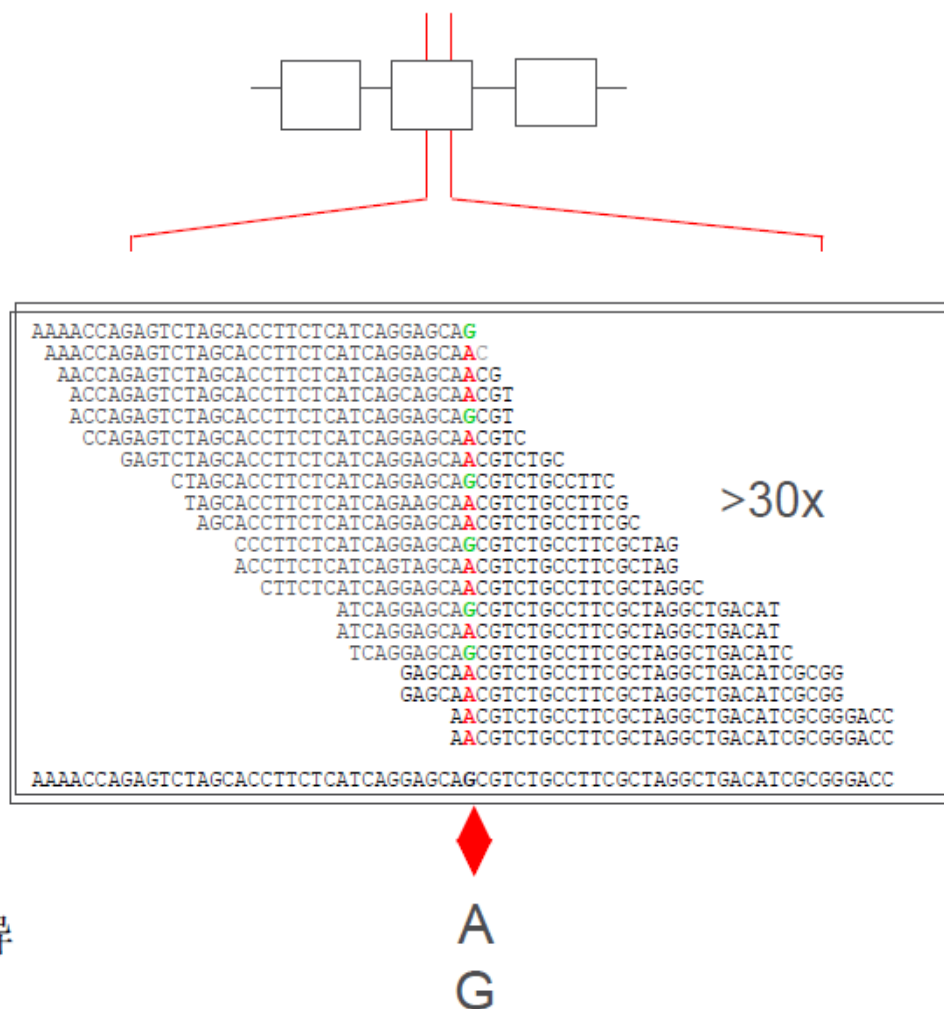
生物学意义
Biological
Meaning

新一代测序 (NGS) 和一代Sanger测序法对比

A. 毛细管测序方法



B. 二代测序方法（深度测序）





胎儿染色体非整倍体检测（NIPT） ——无创产前筛查

NIPT（non-invasive prenatal testing）

无创产前筛查技术，采用高通量测序平台对母亲外周血游离胎儿DNA进行深度测序，筛查胎儿21号、18号、13号染色体是否存在非整倍体异常。

常见的染色体非整倍体疾病



唐氏综合征（21三体）

- ◆发病率：1:600-1:800
- ◆占小儿染色体遗传病的70%~80%
- ◆我国每年26,600例唐氏患儿出生
- ◆平均每20min出生1例唐氏患儿
- ◆我国目前100万唐氏患儿



Edwards综合征（18三体）

发病率：1:3500-1:7000

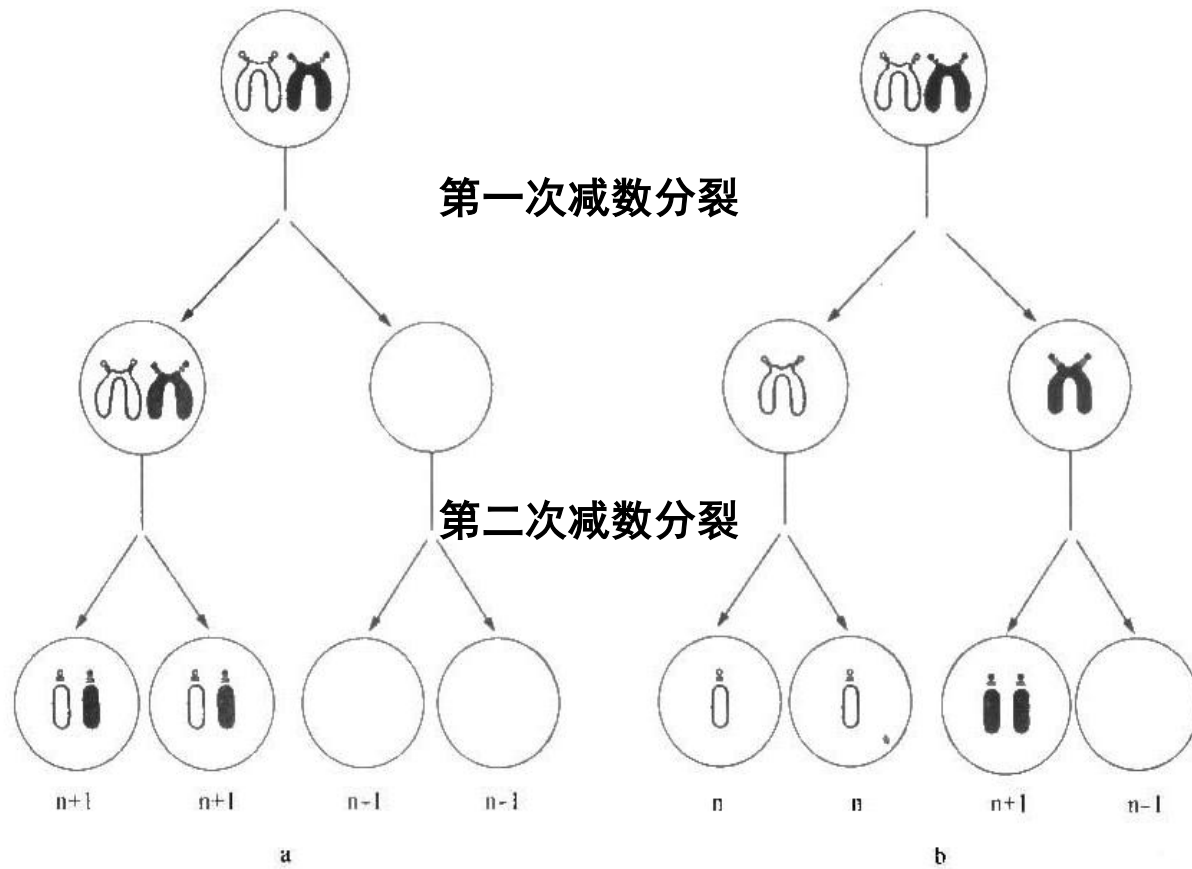


Patau综合征（13三体）

发病率：1:5000-1:6000

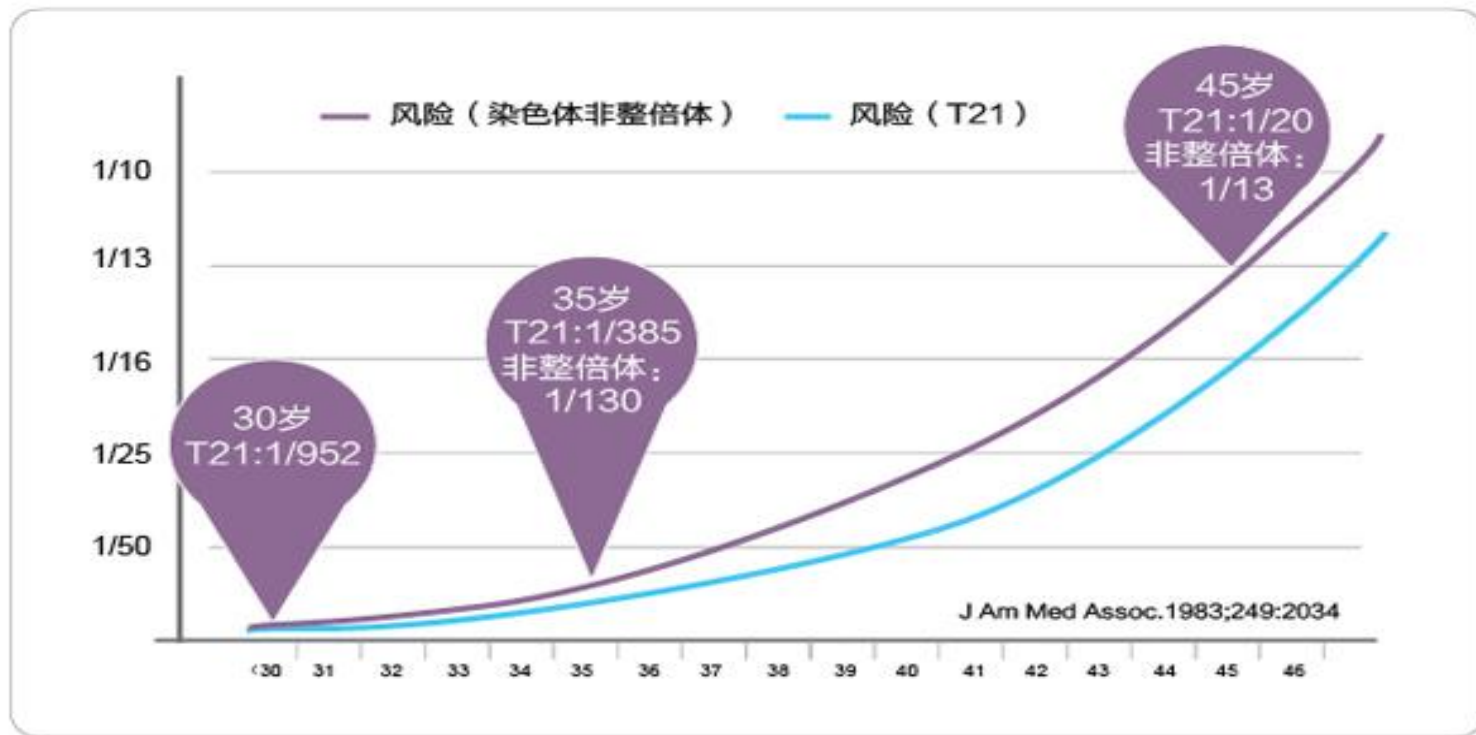
染色体非整倍体病发病机理

减数分裂中染色体不分离

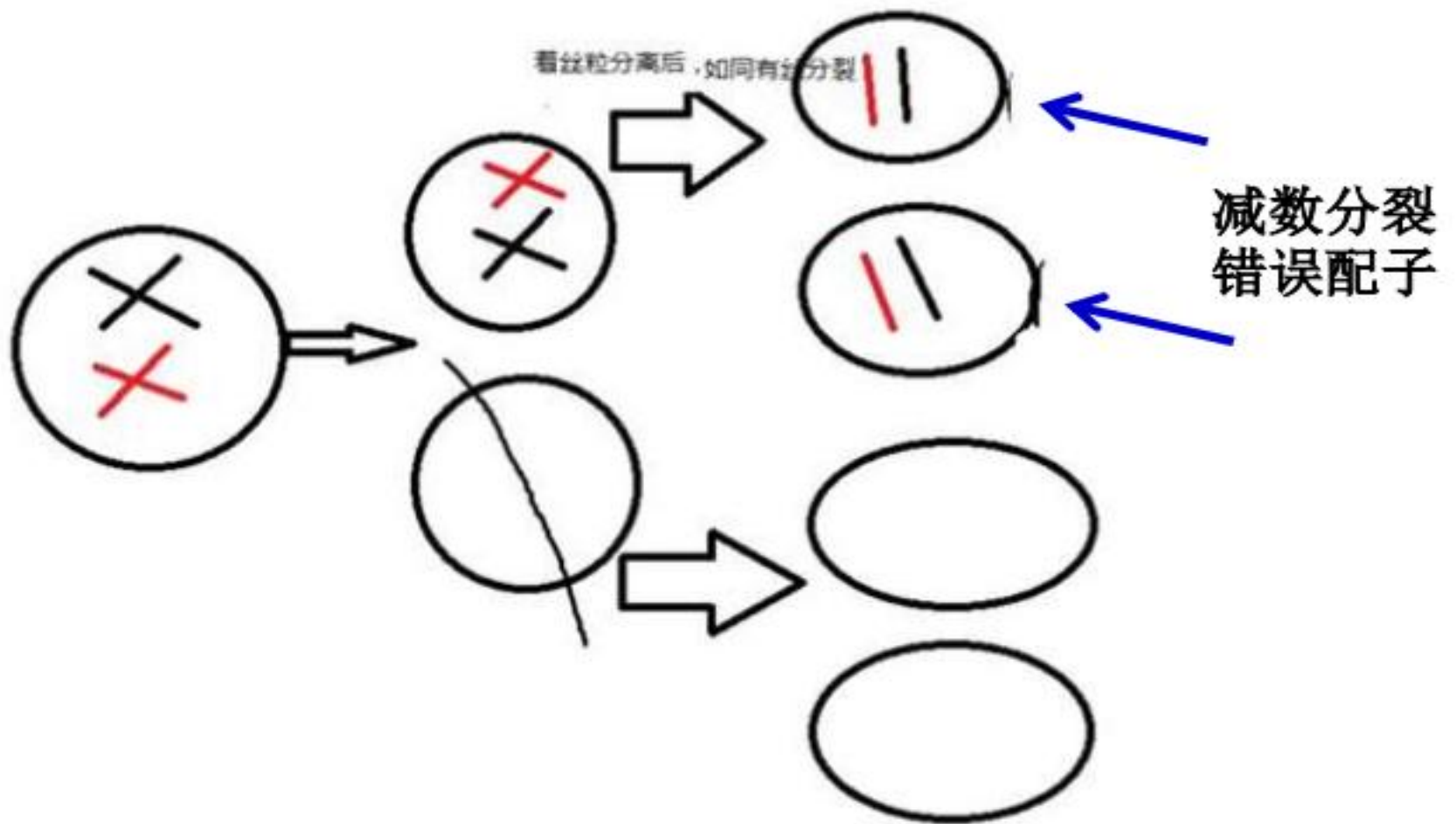


a. 同源染色体不分离; b. 姐妹染色单体不分离

孕妇年龄与发病风险关系



- 染色体疾病的发生具有随机性、偶然性，每对夫妻都有生育染色体病患儿的潜在风险；
- 发病率随孕妇年龄的增高而升高

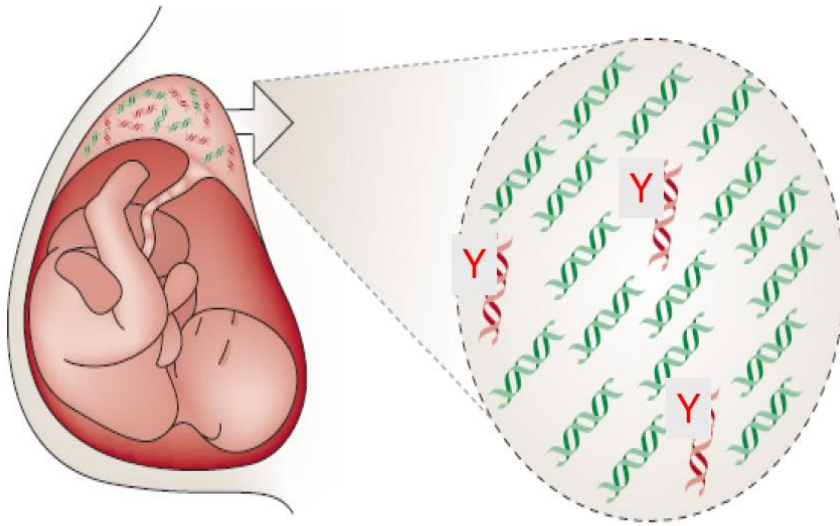


减数分裂错误引起完全的非整倍体

产前筛查/产前诊断方法的比较

检测技术	检测孕周	描述
血清学筛查 (唐氏筛查)	9~13周 (早期) 14~20周 (中期)	5%的假阳性率; 20%-40%漏诊率
绒毛膜穿刺	10~13周	侵入性, 有1%~3%流产风险
羊水穿刺	16-21周	侵入性; 有一定的流产风险0.5%~1%
脐静脉血穿刺	20-28周	侵入性; 有一定的流产风险 1%~3%
NIPT技术	12-26周	非侵入性, 安全; 准确率99%以上

NIPT检测的理论依据—— 孕妇外周血中存在胎儿DNA

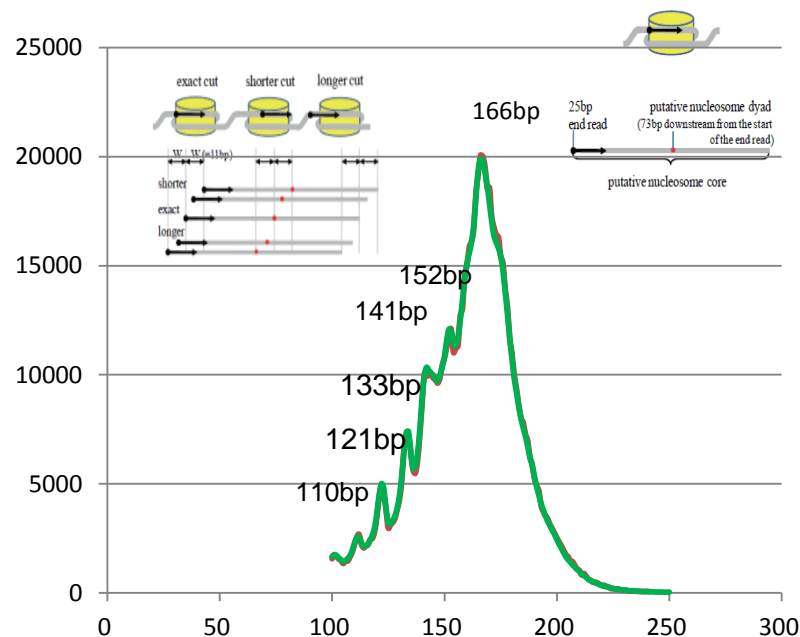
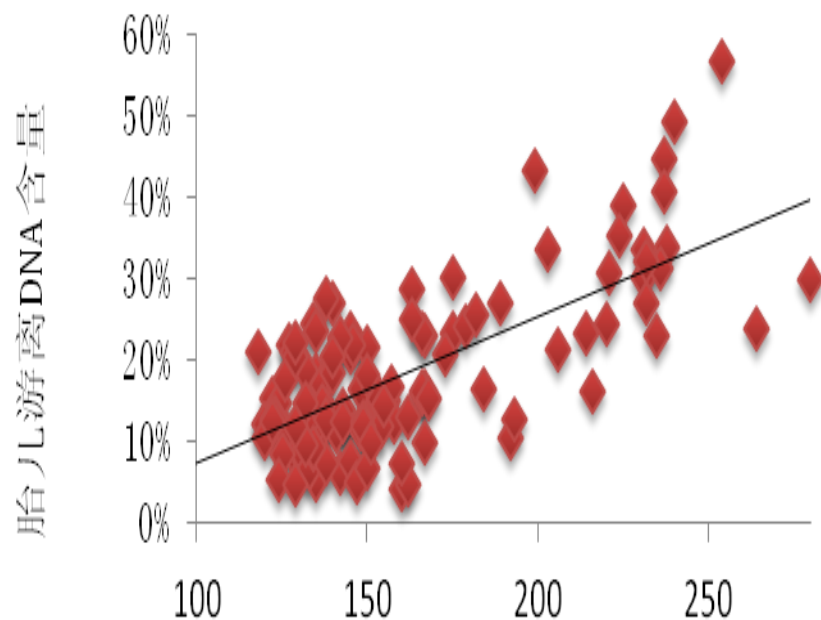


胎儿游离DNA：cell-free fetal DNA (cffDNA)

Lancet 1997; **350**: 485–87

- 母体外周血含有的cffDNA，主要来源于胎盘滋养细胞，小部分来源于胎儿造血细胞；
- 怀孕4周可检出，8周后含量上升并稳定存在；
- 母体外周血中的cffDNA含量在5%-30%之间；
- 孕周越大cffDNA含量越高，且与母亲体重有关。

母血浆胎儿游离DNA



- ◆ 半衰期短，产后2h后消失（避免前次妊娠的假阳性）
- ◆ 以稳定的核小体形式存在

1000 genome-equivalents/ml

100 胎儿; 900母体

正常胎儿

胎儿 Chr21 : 200
母亲 Chr21:1800

正常胎儿
Chr21:2000

21-三体胎儿

胎儿 Chr21 : 300
母亲 Chr21:1800

21-三体胎儿
Chr21:2100

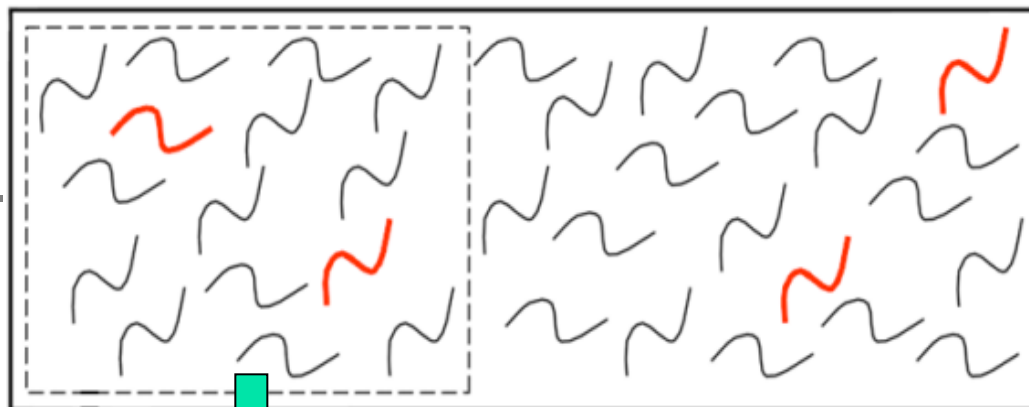
数据比较: 21-三体胎儿 > 正常胎儿

高通量测序+正态分布模型准确解决筛查难题

- 采集母体血浆
- 提取血浆DNA
- 制备测序文库

在第二代测序
仪上测序

测得的序列与人
的参考基因组比
对并作统计分析



36 bp

AAGCT...
CTAGT...
TAGGC...
GCATG...

⋮

nth sequence

Bioinformatics
alignment

Chr1

Chr7

ChrX

Chr13

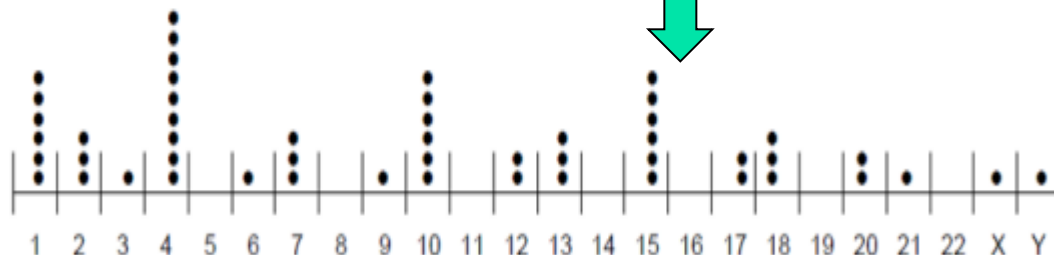
Chr1

Chr21

Chr18

ChrY

and so on...



通过大规模并行测序MPSS，获得分布在每条染色体上的DNA片段数量，
经过算法与数据库比较，得出胎儿的Z值，参考范围(-3, 3)

Z值计算公式

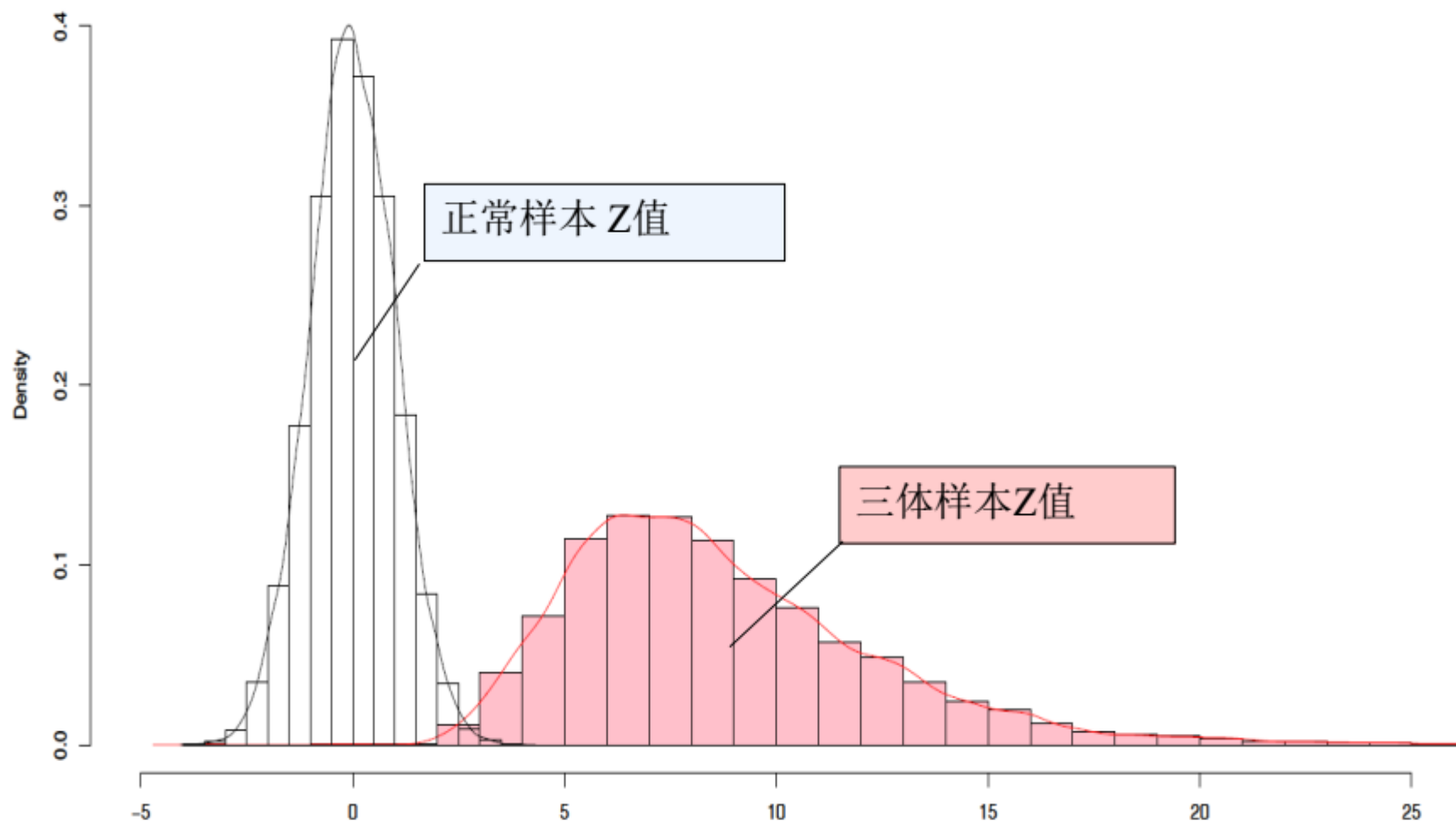
% representation
of unique
sequences
mapped to a
chromosome

$$\% \text{ chrN} = \frac{\text{Unique count for chrN}}{\text{Total unique count}}$$

Disease status
determination

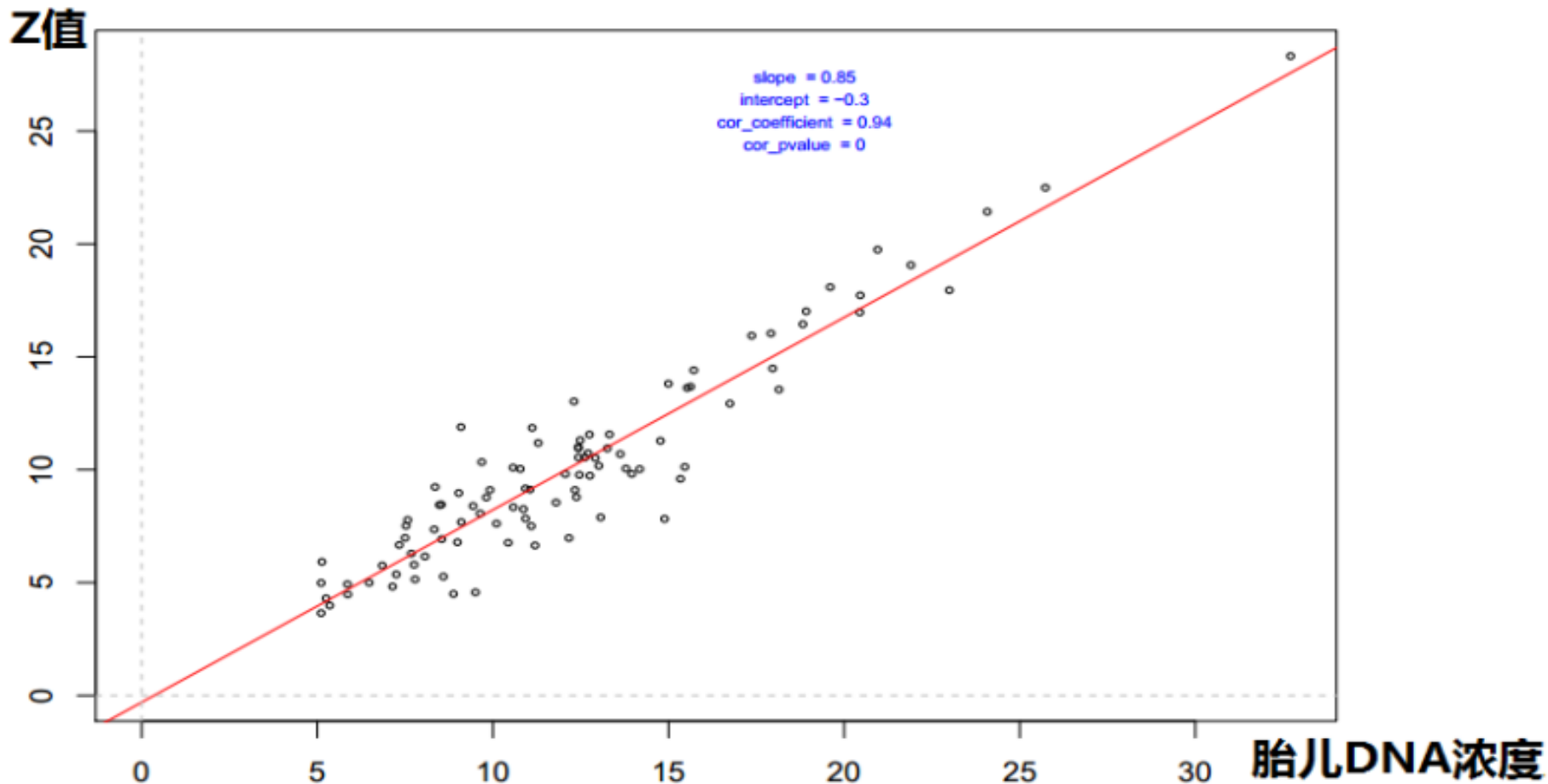
$$\text{chrN z-score for test sample} = \frac{\% \text{ chrN}_{\text{sample}} - \text{mean } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}{\text{S.D. } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}$$

Z值分布



胎儿DNA浓度越高，临界值样本越少，需要重做的标本越少

胎儿DNA浓度与阳性样本Z值的关系



cffDNA浓度与阳性样本Z值成正比，浓度越高，Z值越大

NIPT的敏感性和特异性

- T21的敏感性： 99.8% , 特异性99.9%
- T18的敏感性： 98.8% , 特异性99.9%
- T13的敏感性： 100% , 特异性99.9%

190,277例样本的结果统计

NIPT检测判断	阳性	阴性
T21阳性	996	54
T21阴性	2	189,225
T18阳性	256	60
T18阴性	3	189,958
T13阳性	34	72
T13阴性	0	190,171



NIPT的技术特点

- 采集孕妇外周血(6-10ml)，提取DNA，采用高通量测序技术，结合生物信息分析，得出胎儿患染色体非整倍性疾病的风险（唐氏综合征、18三体、13三体）。
- 该方法最佳筛查时间为孕早、中期（12-22⁺⁶）。
- 具有无创取样、无流产风险、高灵敏度，准确性高的特点。
- 非侵入性，避免流产，感染等风险
- 筛查分析周期短——10天
- 检测通量大

各学会指导性意见

2012年11月20日，美国妇产科医师学会（ACOG）与美国母胎医学会（SMFM）共同发表委员会指导意见，按照以下适应症，可推荐NIPT作为染色体非整倍体高危人群的初筛检测：

- 母亲年龄超过35岁；
- 超声结果显示非整倍体高危；
- 生育过三体患儿；
- 早孕期、中孕期或三联筛查、四联筛查呈现非整倍体阳性结果；
- 父母为罗伯逊易位，且胎儿显示为13三体或21三体高危。



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PARTNERS



The Society for
Maternal-Fetal Medicine

COMMITTEE OPINION

Number 545 • December 2012

The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics
The Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee

*This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change.
The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.*

Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy

ABSTRACT: Noninvasive prenatal testing that uses cell free fetal DNA from the plasma of pregnant women offers tremendous potential as a screening tool for fetal aneuploidy. Cell free fetal DNA testing should be an informed patient choice after pretest counseling and should not be part of routine prenatal laboratory assessment. Cell free fetal DNA testing should not be offered to low-risk women or women with multiple gestations because it has not been sufficiently evaluated in these groups. A negative cell free fetal DNA test result does not ensure an unaffected pregnancy. A patient with a positive test result should be referred for genetic counseling and should be offered invasive prenatal diagnosis for confirmation of test results.

Noninvasive prenatal testing that uses cell free fetal DNA from the plasma of pregnant women offers tremendous potential as a screening tool for fetal aneuploidy. Circulating cell free fetal DNA, which comprises approximately 3–13% of the total cell free maternal DNA, is thought to be derived primarily from the placenta, and is cleared from the maternal blood within hours after childbirth (1). Recently, cell free fetal DNA analysis has become clinically available for women at increased risk of fetal aneuploidy.

Early attempts to detect trisomic fetuses using cell free fetal DNA required the use of multiple placental DNA or RNA markers, which made the screening test time consuming and expensive (2–4). Recently, a number of groups have validated a technology known as massively parallel genomic sequencing, which uses a highly sensitive assay to quantify millions of DNA fragments in biological samples in a span of days and has been reported to accurately detect trisomy 13, trisomy 18, and trisomy 21 (5–7) as early as the 10th week of pregnancy with results available approximately 1 week after maternal sampling. Another group has described a more targeted approach, using chromosome selective sequencing to detect trisomy 18 and trisomy 21 (8). Using archived blood samples from women who were undergoing prenatal diagnosis

and were at increased risk of aneuploidy, several large-scale validation studies have demonstrated detection rates for fetal trisomy 13, trisomy 18, and trisomy 21 of greater than 98% with very low false-positive rates (less than 0.5%) (6–13). Although no prospective trials of this technology are available, cell free fetal DNA appears to be the most effective screening test for aneuploidy in high-risk women.

The American College of Obstetricians and Gynecologists has recommended that women, regardless of maternal age, be offered prenatal assessment for aneuploidy either by screening or invasive prenatal diagnosis regardless of maternal age. Cell free fetal DNA is one option that can be used as a primary screening test in women at increased risk of aneuploidy (Box 1). This includes women aged 35 years or older, fetuses with ultrasonographic findings that indicate an increased risk of aneuploidy, women with a history of a child affected with a trisomy, or a parent carrying a balanced Robertsonian translocation with increased risk of trisomy 13 or trisomy 21. It also can be used as a follow-up test for women with a positive first-trimester or second-trimester screening test result. Counseling regarding the limitations of cell free fetal DNA testing should include a discussion that the screening test provides information regarding only

2013年1月美国遗传学顾问协会 (NSGC) 发表NIPT指导意见

- ◆ NIPT目前只作为产前染色体非整倍体疾病**高风险人群的补充检测**，高风险人群包括高龄孕妇、筛查高风险孕妇、超声显示染色体非整倍体高危孕妇、三体患儿生育史孕妇；
- ◆ 重视NIPT检测前和检测后的正确遗传咨询，**检测需在孕妇对检测知情同意的基础上进行**；检测后，对于NIPT 检测异常或NIPT 检测正常但其他检测显示胎儿异常的孕妇，**需经过遗传咨询确认是否需要进一步进行产前诊断。**

J Genet Counsel
DOI 10.1007/s10345-012-9564-0

PROFESSIONAL DEVELOPMENT PAPER

Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis: the Position of the National Society of Genetic Counselors

Patricia L. Deters · Amy Crowther · Kelly E. Ormond ·
Heidi Fuchs · Campbell R. Brasington · Pamela Flidman

Received: 29 June 2012 / Accepted: 20 December 2012
© National Society of Genetic Counselors, Inc. 2013

Abstract The 1997 discovery of free fetal DNA in maternal plasma launched clinical research efforts to establish a reliable method for non-invasive prenatal testing for fetal genetic conditions. Various methods, including, but not limited to, massively parallel sequencing (MPS) and selective analysis of cell-free fetal DNA in maternal plasma, have recently been developed as highly sensitive and specific noninvasive screening tools for common fetal chromosome aneuploidies.

P. L. Deters
University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
e-mail: pldeters@med.unc.edu

A. Crowther
Integrated Genetics, Durham, NC, USA
e-mail: amy.crowther@integratedgenetics.com

K. E. Ormond
Department of Genetics and Stanford Center for Human Genome
Biology, Stanford University, 300 Pasteur Drive,
Stanford, CA 94304-5084, USA
e-mail: kornel@stanford.edu

H. Fuchs
Bryn Mawr, PA, USA
e-mail: helen.fuchs@gmail.com

C. R. Brasington
Lurie Children's Hospital at Northwestern Medical Center,
Chicago, IL, USA
e-mail: cbrasington@luriechildrens.org

P. Flidman
Division of Genetic and Metabolic, Department of Pediatrics,
University of California, Irvine, CA, USA
e-mail: pfidman@uci.edu

Keywords Noninvasive prenatal diagnosis · Aneuploidy screening · Prenatal diagnosis · Down syndrome · Trisomy 13 · Trisomy 18 · Trisomy 21 · Miscarriage · X-Positive
Stillbirth · The National Society of Genetic Counselors
Outline fetal DNA (cfDNA)

Incorporating these new noninvasive technologies into clinical practice will impact the current prenatal screening paradigm for fetal aneuploidy, in which genetic counseling plays an integral role. The National Society of Genetic Counselors (NSGC) currently supports Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis (NPT/NPD) as an option for patients whose pregnancies are considered to be at an increased risk for certain chromosome abnormalities. NSGC argues that NPT/NPD only be offered in the context of informed consent, education, and counseling by a qualified provider, such as a certified genetic counselor. Patients whose NPT/NPD results are abnormal, or who have other factors suggestive of a chromosomal abnormality, should receive genetic counseling and be given the option of standard confirmatory diagnostic testing.

Keywords Noninvasive prenatal diagnosis · Aneuploidy screening · Prenatal diagnosis · Down syndrome · Trisomy 13 · Trisomy 18 · Trisomy 21 · Miscarriage · X-Positive
Stillbirth · The National Society of Genetic Counselors
Outline fetal DNA (cfDNA)

Introduction

The National Society of Genetic Counselors (NSGC) releases position statements that are intended to convey to the public the Society's unique views and opinions on issues of relevance to the practice of genetic counseling. The NSGC Public Policy Committee (PPC) leads the creation of new statements or revision of existing statements based on emerging data or issues. This paper highlights the background data that informed the task force members' discussion and shaped the statement on noninvasive prenatal testing put forward to the NSGC membership and Board of Directors for comments and approval.

BACKGROUND

Definitive prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through the analysis of amniocytes or chorionic villus samples (CVS) is an accepted part of prenatal care. Chromosome numerical changes (aneuploidy, polyploidy), large deletions and duplications, and rearrangements can be detected through conventional chromosome analysis (karyotyping) and smaller copy number variations can be detected using microarrays (Wagner et al., 2012). However, aneuploidy and CVS procedures carry some degree of risk for miscarriage or other pregnancy complications (Tabor and Alfirevic, 2010). Therefore, in most developed countries it is routine practice to provide a woman's personal risk for fetal aneuploidy (screening) and to offer definitive diagnosis through amniocentesis or CVS if the risk is high. In the USA it has been recommended that amniocentesis and CVS should be available to all women whether or not they had noninvasive screening (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2007a) although it is recognized that screening can be helpful to women before they decide whether to accept or reject invasive prenatal diagnostic testing (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2007b). Many countries, for example Canada, have national guidelines that recommend noninvasive screening prior to invasive testing (Chavira et al., 2011). In other countries there is no such national recommendation and in some countries and regions, a large proportion of women do receive invasive prenatal diagnosis regardless of screening results.

Fetal aneuploidy risk can be evaluated on the basis of a combination of maternal age, prior affected pregnancy or family history, maternal serum biochemical tests and fetal ultrasound markers (Cuckle and Benz, 2010). Recently, new non-invasive prenatal testing based on massively parallel sequencing of circulating free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma has been shown to be highly effective for aneuploidy detection. These analytic validation studies were performed on stored samples from women who were established to being high-risk on the basis of maternal age and/or maternal serum and

2013年4月国际产前诊断协会 (ISPD) 发表NIPT指导意见

- 多项研究证实NIPT在临床应用中具有很高的准确性，较低的失败率；
- 对于性染色体的筛查率很低；
- NIPT目前不能作为诊断技术应用，也不能代替羊水穿刺和CVS。有些病例会被漏诊同时也有假阳性发生的可能，筛查阳性的孕妇应做羊水穿刺或CVS行染色体核型分析以明确诊断；
- 目前有效性的研究主要集中在高危人群（基于母亲年龄或其它筛查高危）。低危人群中的有效性尚未证实。现有的有限数据表明在低危人群中检测失败率没有明显提高，假阳性率也较低；
- 对于嵌合体（包括局限性胎盘嵌合体），结果将不准确；当发生双胎一胎早期流产时，结果将不准确；
- 对于部分检测失败或胎儿DNA含量较低无法得出检测结果者，需要重复检测；
- 目前该方法的cost-effective欠佳，不适合全民应用；
- 孕妇在接受NIPT之前应得到充分咨询，应告知孕妇该检测的益处以及局限性。

美国医学遗传学及基因组学会 (ACMG) 发表NIPT指导意见

2013年4月，ACMG针对NIPT发表：目前染色体非整倍体疾病的筛查不是常规性产前检测，而是一种**推荐性产前检测**，所以NIPT的产前和筛查后的遗传咨询是必须的

建议进行的筛查前遗传咨询：

1. 解释NIPT的目的；
2. 相对于血清学筛查的优势，如：
 - 1) 有严格的临床试验，准确性很高；
 - 2) 有很高的T21阴性预测值，可避免不必要的有创性产前诊断；
 - 3) 较低的假阳性率，减少进行有创性产前诊断的孕妇数量；
 - 4) 检测结果的计算不依赖于孕周，避免了孕周不准对检测结果的影响。
3. NIPT异常结果必须进行有创产前诊断；
4. NIPT的局限性
 - 1) NIPT的检测结果目前还不能视为诊断，异常结果必须通过有创性产前诊断；
 - 2) NIPT不能检测非平衡易位、缺失、重复等染色体异常，仍需有创性产前诊断或查。因为早孕期超声检查能精确确定孕周、microarray技术进行检测；
 - 3) NIPT不能检测单基因疾病；
 - 4) NIPT目前不能代替早孕期超声检测能做NT检测、能判断胎儿数目和胎盘异常等；
 - 5) NIPT目前缺少双胎或多胎孕妇的临床研究数据，还不能用于双胎或多胎孕妇的产前检测；



最新进展

2016年7月28日美国医学遗传和基因组学会（ACMG）发表最新声明：

NIPT能够在不同年龄人群中替代传统的三体综合征筛查技术

针对筛查高风险或高龄
人群的一线筛查手段



针对所有孕妇的常规一
线筛查手段



ACMG建议

- 应告知所有孕妇，**NIPT**是产前筛查**21、18、13**三体综合征最敏感的技术；
- 因肥胖孕妇外周血**cffDNA**浓度通常较低，建议肥胖孕妇直接用传统筛查方法；
- 性染色体异常的假阳性率相对较高；
- 对于已知拷贝数变异（**CNVs**）有较高的假阳性和假阴性，若发现**CNVs**，应进行产前诊断验证



ACMG不建议将NIPT用于

- 筛查21、18、13染色体以外的其他常染色体异常
- 筛查全基因组CNVs
- 接受过骨髓移植、器官移植的患者
- 筛查单基因疾病
- 筛查开放性神经管缺陷
- 因胎儿cffDNA浓度过低导致的NIPT检测失败，建议使用产前诊断，而不是重抽血进行NIPT

国家卫生和计划生育委员会办公厅文件

国卫办妇幼发〔2016〕45号

国家卫生计生委办公厅关于 规范有序开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作的通知

各省、自治区、直辖市卫生计生委，新疆生产建设兵团卫生局：

为推动落实全面两孩政策，满足广大孕妇对产前筛查与诊断分子遗传新技术服务的需求，规范有序开展以胎儿 21 三体综合征、18 三体综合征和 13 三体综合征为目标疾病的孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作，预防出生缺陷，提高出生人口素质，现就有关事项通知如下。

一、合理规划布局，完善服务网络

各级卫生计生行政部门要按照《产前诊断技术管理办法》要求，将孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断纳入辖区内产

前诊断技术统一管理。省级卫生计生行政部门要根据当地实际合理规划，建立以产前诊断机构为核心、以产前筛查机构为采血点、以具备能力的医学检验所和其他医疗机构为技术支撑的孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断网络，优化服务流程，建立转诊机制，满足群众需求。产前诊断机构可独立或与具备相应检测能力的医学检验所和其他医疗机构合作开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断服务。产前筛查机构应当在产前诊断机构指导下承担采血服务，并与其建立合作机制，落实后续检测与产前诊断服务。

二、规范技术服务，提高服务质量

我委在总结前期产前诊断机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断临床应用试点工作经验的基础上，组织制定了《孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断技术规范》（以下简称《技术规范》，见附件 1，可从国家卫生计生委网站下载），指导全国规范有序开展相关工作。医疗机构要严格按照《技术规范》要求，完善规章制度，做好筛查、诊断和随访等环节的有效衔接，规范提供孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断服务。医务人员要按照医学伦理原则，全面、准确告知孕妇相关服务内容，尊重孕妇知情权和选择权，保护孕妇隐私，维护孕妇权益。各地要积极开展专业技



不适用人群

- 有直接产前诊断指针的孕妇（如超声提示胎儿结构异常）
- 不满12孕周的孕妇
- 夫妇一方有明确的染色体异常
- 孕期合并恶性肿瘤
- 有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患基因病高风险，如怀疑胎儿有微缺失微重复综合征
- 1年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等
- 医师认为有明显影响结果准确性的其他情形



慎用人群

- 早、中孕期产前筛查高风险
- 预产期年龄 ≥ 35 岁（现行的产前诊断技术管理规范规定应进行产前诊断）
- 重度肥胖（体重指数 > 40 ）
- 通过体外受精——胚胎移植方式受孕
- 有染色体异常胎儿分娩史
- 双胎及多胎妊娠等
- 医师认为可能影响结果准确性的其他情形



局限性

- ◆ 该技术**不能发现染色体结构异常**，包括平衡易位、小片段的重复和缺失，但告知患者绝大多数属于染色体数目异常，结构异常较少。**不能发现嵌合体**；
- ◆ 有1%-2%可能在孕妇外周血中无足够的胎儿DNA进行筛查，需要孕周稍大后**重新抽血筛查**或直接行羊水、脐带穿刺；
- ◆ 该技术为**唐氏高精度筛查**、能发现21号染色体数目异常，且准确性99%以上，远远高于传统唐氏筛查。如果发现阳性的必须进行进一步羊水穿刺或脐带穿刺核型分析。



2017美国母胎医学会（SMFM）指南

指南意见	证据级别
对于 NIPT 低风险的孕妇，不要做 NT 检测	1B
NIPT 低风险的孕妇，单独的软指标异常不用去穿刺确诊	1B
NIPT 或者早中孕期筛查低风险的孕妇，临床意义不强的超声单独软指标可判断为正常变异	2B
胎儿超声结构异常的孕妇，建议介入性诊断和 CMA 检测	1A
不推荐开展针对染色体微缺失微重复的 NIPT 筛查	1B

SMFM: Society for Maternal-Fetal Medicine

[Am J Obstet Gynecol](#). 2017 Mar;216(3):B2-B7. doi: 10.1016/j.ajog.2017.01.005. Epub 2017 Jan 17.
The role of ultrasound in women who undergo cell-free DNA screening.

国家卫生计生委妇幼司关于产前诊断机构
开展高通量基因测序产前筛查与诊断
临床应用试点工作的通知

各省、自治区、直辖市卫生计生委妇幼处，新疆生产建设兵团
卫生局妇社处：

根据《中华人民共和国母婴保健法》、《产前诊断技术管理办法》及其配套文件和《关于加强临床使用基因测序相关产品和技术管理的通知》（食药监办械管〔2014〕25号）要求，为指导产前诊断机构规范开展高通量基因测序产前筛查与诊断临床应用试点工作，我司委托中华医学会、全国产前诊断技术专家组评估确定了第一批试点产前诊断机构（名单见附件1），研究制定了《高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范（试行）》（以下简称《技术规范》）（见附件2）。现就试点工作有关事项通知如下：

一、试点目的

通过在试点产前诊断机构的临床应用验证与评价，完善高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范，明确该项技术在孕产

基因测序用于临床

2014年2月前，仪器、试剂、软件都没有
经过临床验证，**产业应用先于法律法规**

公司开展
基因测序

2014.2.14发文叫停，
《食品药品监管总局办
公厅 国家卫生计生委办
公厅关于加强临床使用
基因测序相关产品和技术
管理的通知》

两部委
紧急叫停

2014.12、2015.4医政医
管局公布4家遗传、5家
NIPT、2家植入前诊断、
20家肿瘤检测试点单位；

批准测序
试点单位

2015.1妇幼司分别公布全
国108家NIPT、13家
PGD/PGS试点单位

规范管理
技术准入

造福患者

■高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范、规范知情同意书、检测报告

■未纳入试点的产前诊断机构和不具备产前诊断技术资质的医疗保健机构，不得擅自开展高通量基因测序产前筛查与临床诊断应用，或向任何机构递送样本开展高通量基因测序产前筛查与临床诊断服务。



假阴性



临床病例一

- ◆ 孕妇黄XX，40岁，2016年10月在我院进行NIPT检测，孕周13周。
- ◆ 检测结果：T21、T18、T13均低风险。
- ◆ B超提示胎儿异常，在我院进行有创穿刺，结果为21三体。
- ◆ 查找原因：
 - ◆ NIPT质控：阴、阳性样本均在控，胎儿游离DNA浓度为12%，满足测序要求。
 - ◆ NIPT复查：低风险
 - ◆ 将原始血浆送第三方检测机构：低风险
 - ◆ 临床及实验室其他结果：高龄孕妇，肥胖，血脂高，总胆固醇8.4mmol/L(3.1-5.7mmol/L)，甘油三酯3.83mmol/L(0.33-1.7mmol/L)。

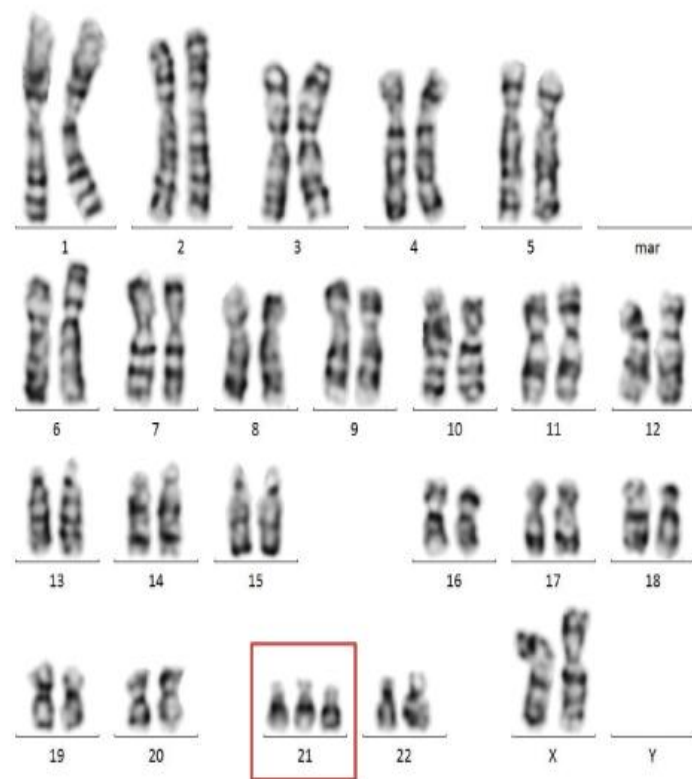
临床病例二

假阴性

◆ 孕妇邹XX，37岁，自然妊娠，孕22⁺₃，20161201博罗县中医院送XX检验（第三方检测机构），20161206报告T21、T18、T13均低风险。

◆ B超提示胎儿鼻骨缺失，长骨短，枕后皮层增厚，NT3.1，提示21三体，建议产前诊断。

◆ 20170222在我院产前诊断（羊水）为21三体。



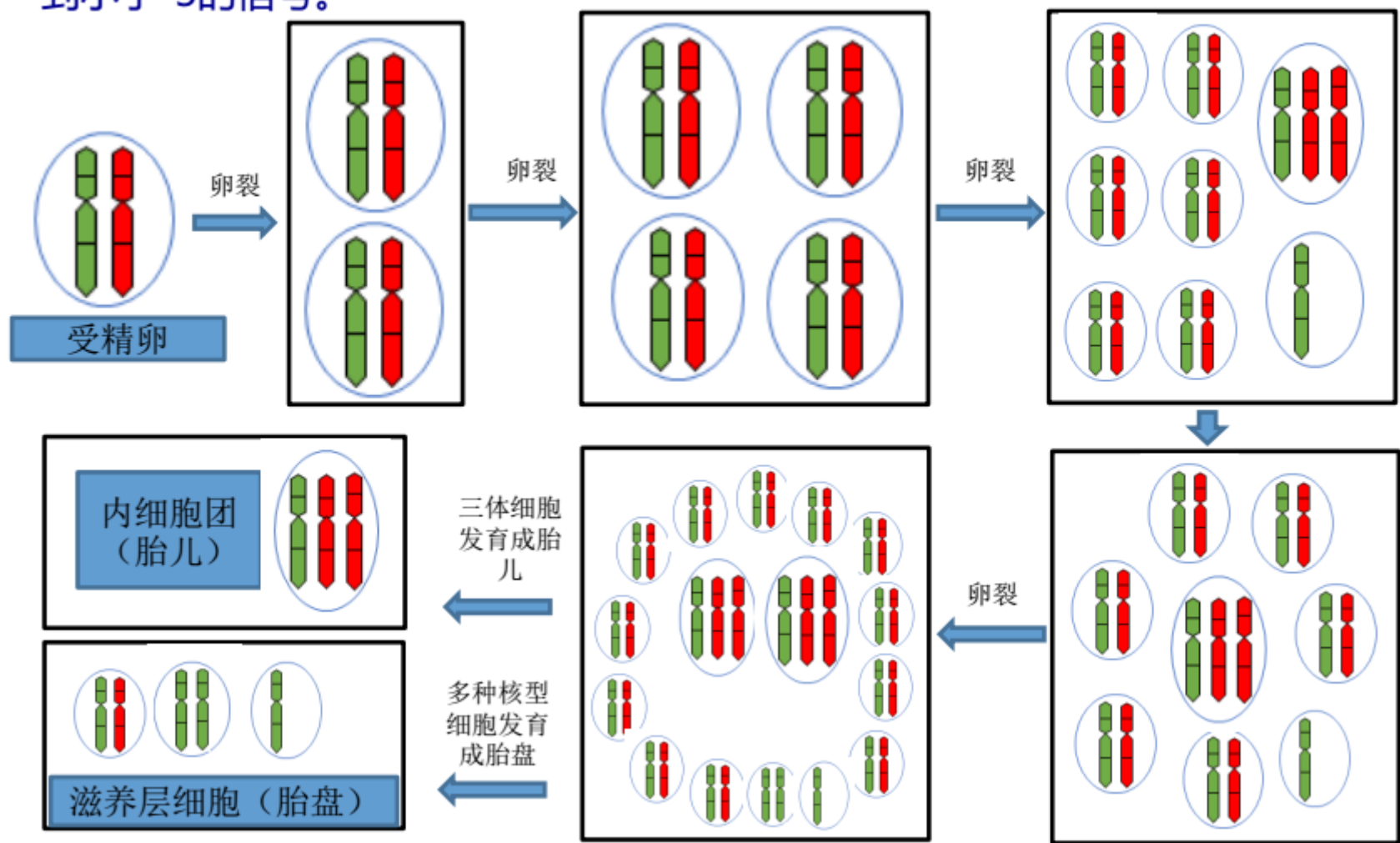


NIPT假阴性的原因

- ◆胎儿游离**DNA**浓度过低
 - ◆孕周小
 - ◆体重过重
 - ◆**IVF-ET**妊娠
 - ◆双胞胎妊娠
- ◆**GMDD (generalised mosaicism confined direct normality)**: 胎儿及间充质核心细胞染色体异常，而细胞滋养层仍然正常
- ◆**CFM (confined placental mosaicism)**: 限制性胎盘嵌合体，**STC-、LTC-villi**核型正常，胎儿核型异常

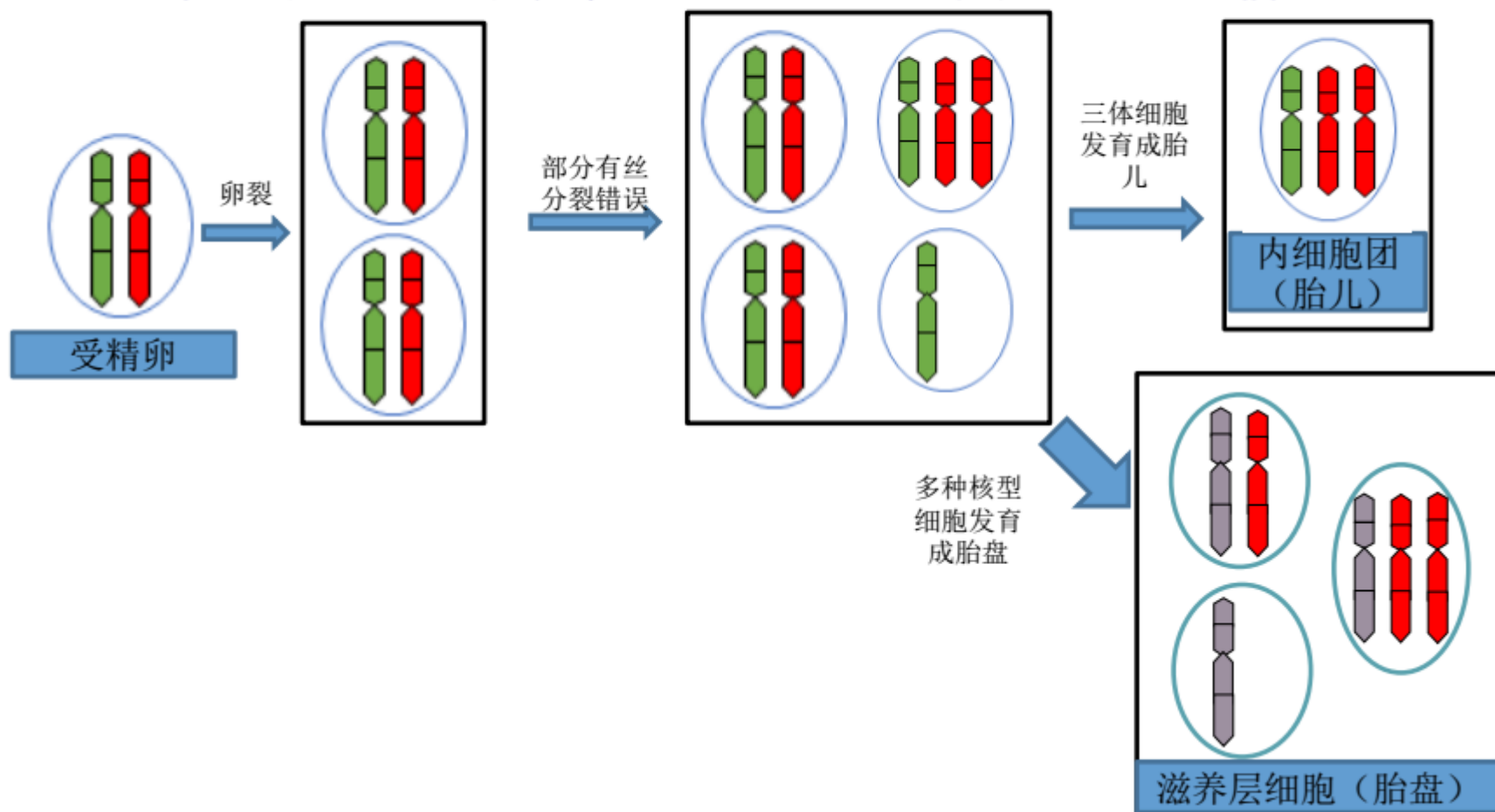
假阴性的原因

8细胞期出现3体细胞，此时由于单体细胞比例太低，血浆游离DNA无法检测到小于-3的信号。



Z值低于-3的情况

有丝分裂错误的三体细胞恰好发育成胎儿而胎盘细胞由多种核型细胞组成，此时由于单体细胞比三体细胞多，血浆游离DNA可能检测到小于-3的信号。





NIPT的假阴性问题无法避免

- ◆ 因染色体嵌合问题和**NIPT**的标本来源导致假阴性问题无法避免
- ◆ **NIPT**在低风险和高风险人群中的假阴性率分别为**0.02%**和**0.26%**。
- ◆ **18**三体的假阴性率高于**21**三体。



NIPT假阳性的原因

- ◆ 胎盘限制性嵌合体**CPM**，胎儿核型与胎盘核型不一致
 - ◆ **CPM1型**：（嵌合的）异常细胞局限于滋养细胞
 - ◆ **CPM2型**：（嵌合的）异常细胞局限于间充质核心细胞
 - ◆ **CPM3型**：（嵌合的）异常细胞局限于滋养细胞和间充质核心细胞
- ◆ 母体自身染色体异常
 - ◆ 母体非整倍体
 - ◆ 母体拷贝数变异
 - ◆ 母体染色体嵌合体
- ◆ 外源性或特殊游离**DNA**干扰
 - ◆ 双胎之一停育
 - ◆ 母体恶性肿瘤
 - ◆ 外源性输血
 - ◆ 淋巴细胞免疫治疗等

针对目的染色体的假阳性率：
<1%

CASE REPORT

Open Access



Birth of a child with trisomy 9 mosaicism syndrome associated with paternal isodisomy 9: case of a positive noninvasive prenatal test result unconfirmed by invasive prenatal diagnosis

Jingmei Ma¹, David S. Cram², Jilanguang Zhang², Ling Shang², Huixia Yang^{1*} and I

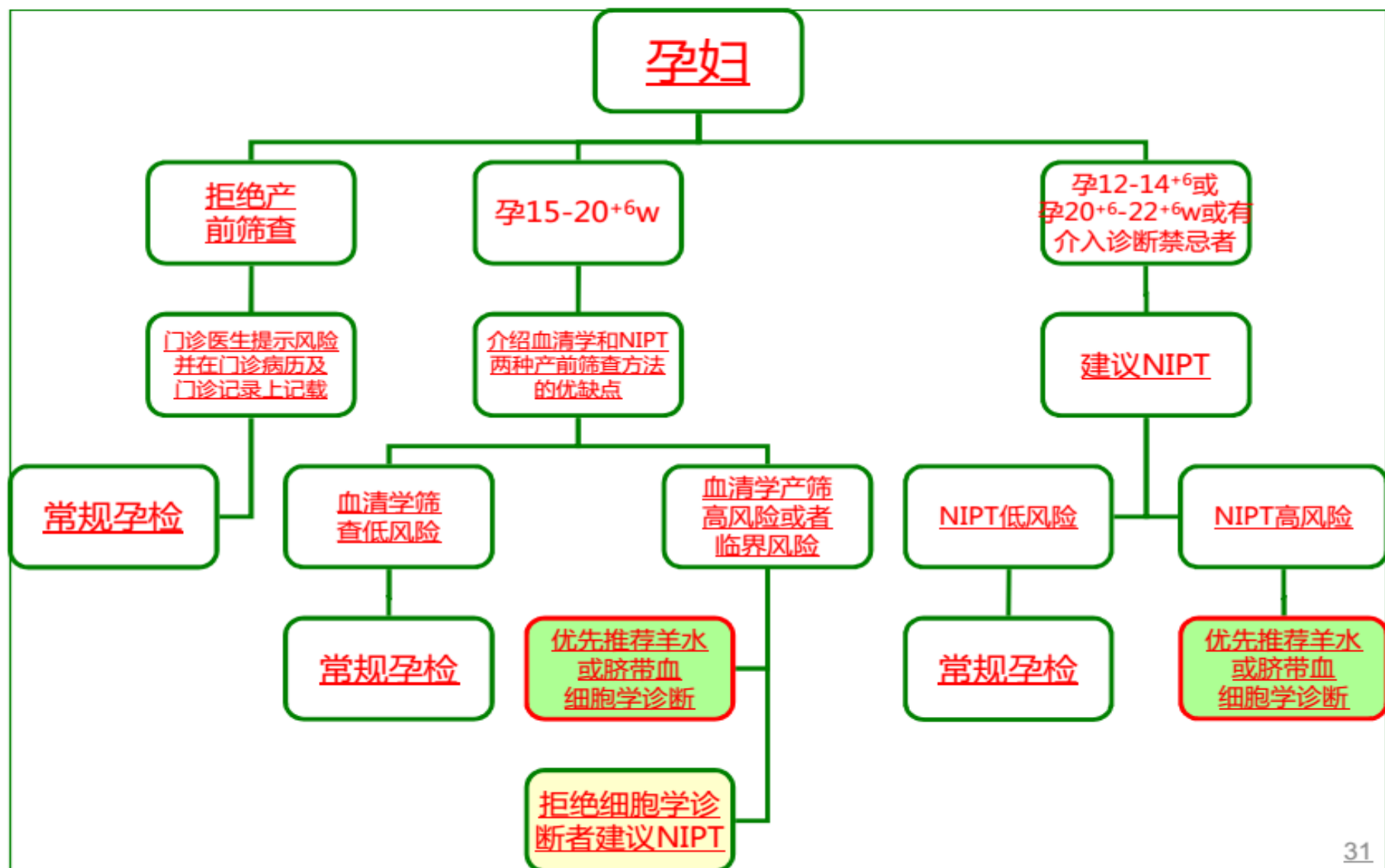
- 一个22个月大的小女孩出现严重的发育迟缓，先天性脑发育不良、先天性心脏病与T-9型综合征相关表型一致。
- 产检历史回顾显示染色体NIPT结果为T-9阳性。然而，后续验证性检测染色体核型和FISH显示胎儿细胞为正常核型。



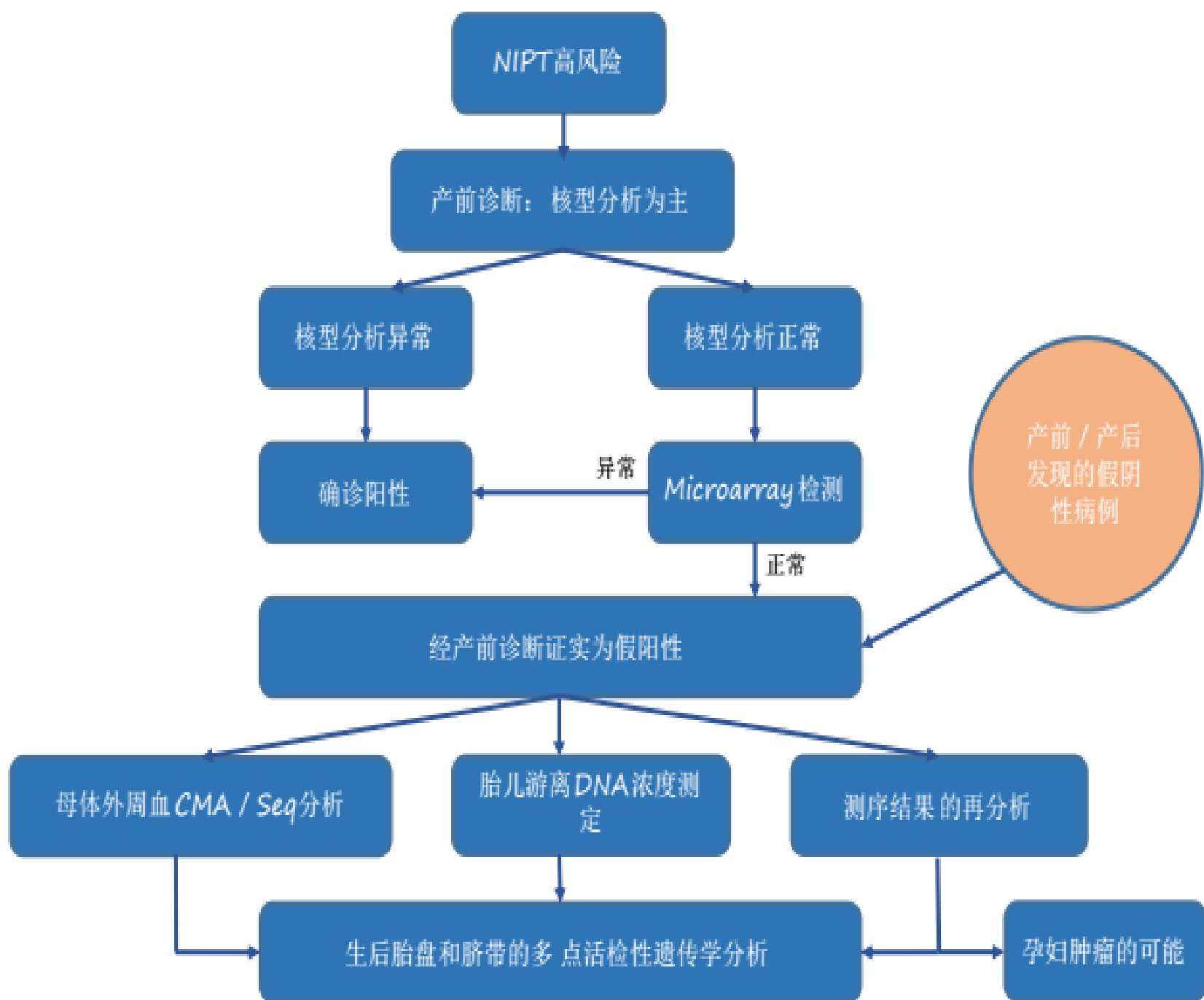
facial features of the proband with trisomy 9 mosaicism syndrome

产后研究发现体细胞T-9嵌合比例为20%。家系样本Q-PCR STR研究显示T-9嵌合起源于合子细胞对父系第二次减数分裂9号染色体不分离的错误的一个三体挽救，导致形成两种体细胞，一个为含9号染色体的单亲二倍型，一个为T-9。

产前筛查与诊断临床服务流程图



假阳性／假阴性病例诊断流程





几个问题



◆ **NT增厚的孕妇适合做NIPT吗？**

不适合。建议做产前诊断和**CMA**检查

◆ **胎儿超声结构异常的孕妇适合做NIPT吗？**

不适合。建议做产前诊断和**CMA**检查



NIPT的相关问题

- ◆ 做好**NIPT**的遗传咨询（检测前、检测后）
- ◆ 签知情同意书
 - ◆ 目标疾病种类、局限性、失败风险、影响因素等
- ◆ 买保险
- ◆ 有条件的先做**NT**检测，再做**NIPT**。若**NIPT**阴性，后续做好孕中期超声结构筛查
- ◆ 若**NIPT**阴性，出现胎儿流产、死亡后或出生后染色体异常，应进行胎儿、新生儿或胎盘染色体检查



染色体微缺失微重复的检测

技术类型	分辨率	是否穿刺	是否细胞培养	是否全基因组覆盖	是否检出10%嵌合
核型分析	5M	是	是	是	是
FISH	1M	是	否	否	否
CMA	100k	是	否	是	否
NGS	100k	是	否	是	是
NIPT-plus	1M	否	否	是	否

beatific
幸福

**检出患病患儿，
提前干预生产**

减少家庭负担

减少社会负担

**为国家和个人
节约大量资金**



基因多态性检测与个体化治疗

FDA在100多种药物说明书中给予基因信



1	Drug		Therapeutic Area	Biomarker
98	Tamoxifen	他莫西芬	肿瘤	ER receptor
99	Telaprevir	特拉匹韦	抗病毒	IL28B
100	Terbinafine	特比萘芬	抗真菌感染	CYP2D6
101	Tetrabenazine	丁苯那嗪	神经科	CYP2D6
102	Thioguanine	硫代鸟嘌呤	肿瘤	TPMT
103	Thioridazine	硫利达嗪	精神科	CYP2D6
104	Ticagrelor	替卡格雷	心血管	CYP2C19
105	Tolterodine	托特罗定	生殖泌尿	CYP2D6
106	Tositumomab	托西莫单抗	肿瘤	CD20 antigen
107	Tramadol and Acetaminophen	曲马多和对乙酰氨基酚	镇痛	CYP2D6
108	Trastuzumab	曲妥单抗	肿瘤	Her2/neu
109	Tretinoin	维甲酸	皮肤病牙科	PML/RAR α
110	Trimipramine	曲米帕明	精神科	CYP2D6
111	Valproic Acid	丙戊酸	精神科	UCD (NAGS; CPS
112	Vemurafenib	维罗非尼	肿瘤	BRAF
113	Venlafaxine	文拉法辛	精神科	CYP2D6
114	Voriconazole	伏立康唑	抗真菌感染	CYP2C19
115	Warfarin (1)	华法林	血液学	CYP2C9
116	Warfarin (2)	华法林	血液学	VKORC1

表 1. 国家卫生部已公布的与基因有关的个体化用药检测项目

项目名称	备注
用于病毒、细菌用药指导的基因检测	1、拉米夫定用药指导的基因检测 2、结核病用药指导的基因检测 3、肠球菌耐万古霉素用药指导的基因检测
用于化学药物用药指导的基因检测	1、硝酸甘油用药指导的基因检测 2、5-氟尿嘧啶用药指导的基因检测
P450 家族代谢酶基因的基因突变检测	包括 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 基因的突变检测等
K-Ras 基因的基因突变检查	用于抗肿瘤靶向药物的敏感性检测

2007年国家卫生部发布



国家卫生计生委印发《医疗机构临床检验项目目录（2013年版）》

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 2013-08-07

根据《医疗机构临床实验室管理办法》，原卫生部于2007年印发了《医疗机构临床检验项目目录》（卫医发〔2007〕180号），并要求各级各类医疗机构不得开展目录规定以外的检验项目。该目录的公布执行，对规范医疗机构开展临床检验项目，提高临床检验水平，保证医疗质量和医疗安全发挥了重要作用。

近年来，随着大量新技术、新方法引入医学领域，患者需求，原卫生部自2012年10月启动研究论证、广泛征求相关专业专家意见，

2013年版《目录》共360项，临床化学、临床免疫学、临床微生物学及细胞学等

■ 用药指导的分子生物学检验

化学药物用药指导的基因检测

• CYP2C19基因多态性检测

• CYP2C9和VKORC1基因多态性检测

• MTHFR（C677T）基因检测

大量新技术、新方法患者需求，原卫生部研究论证、广泛征求相关专业专家意见，2013年版《目录》共360项，临床化学、临床免疫学、临床微生物学及细胞学等

非遗传因素使个体化治疗复杂化

药物反应个体差异的机制



年龄、身高、体重、性别、烟酒、饮食、疾病、肝肾功能

主要因素：遗传变异

所有药物的效应都有个体差异，决定个体差异的决定因素是遗传



01

MTHFR基因检测与个体化治疗

02

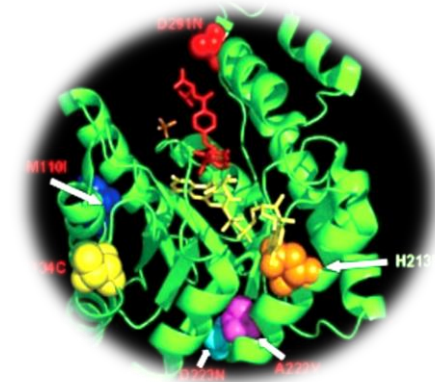
CYP2C19基因检测与个体化治疗

03

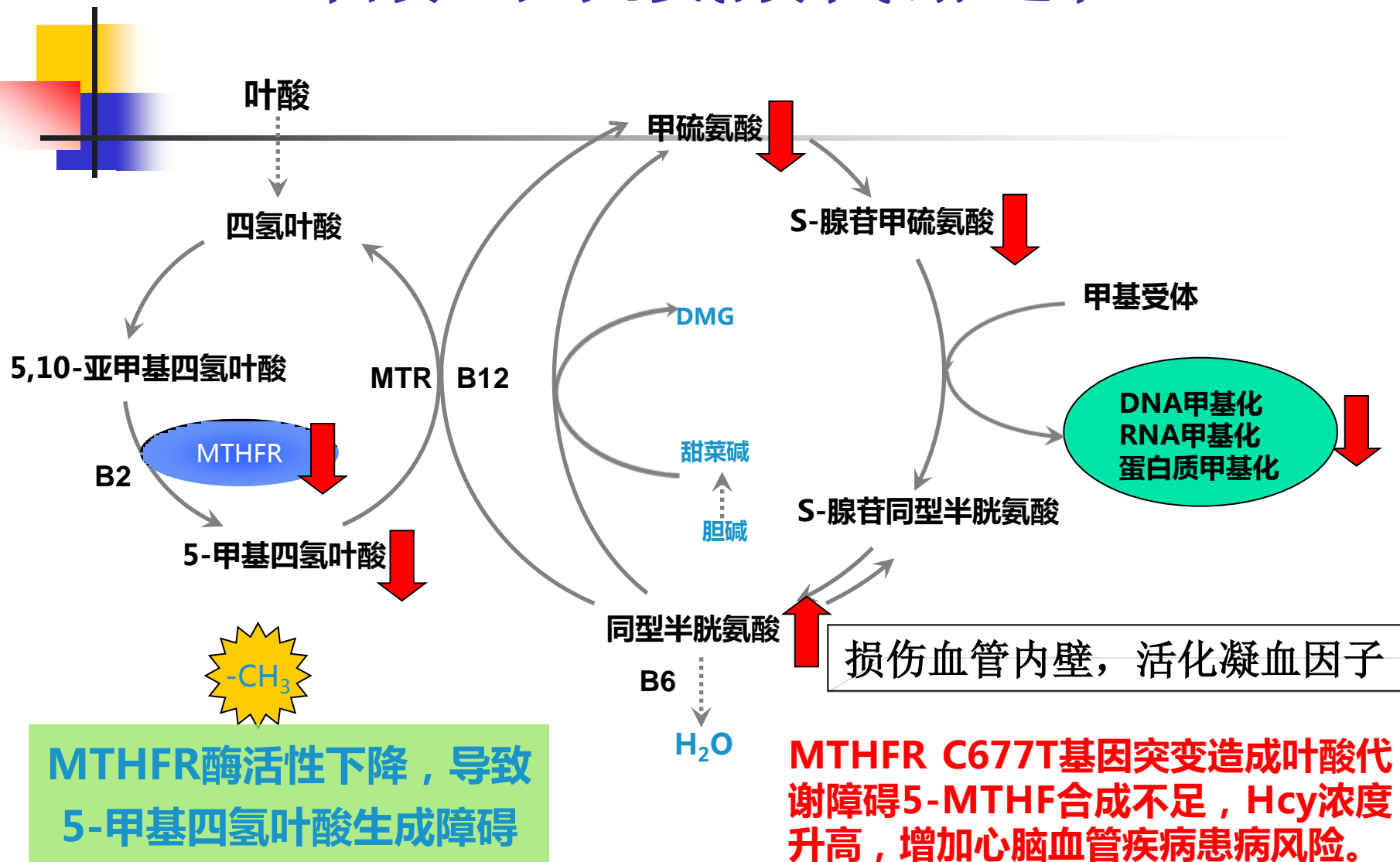
CYP2C9基因检测与个体化治疗

MTHFR基因

- ◆ MTHFR: 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (5, 10-methylenetetra hydrofolate reductase), 是叶酸-甲硫氨酸代谢途径中的关键酶。
- ◆ MTHFR可以使5, 10-亚甲基四氢叶酸 (5, 10-MTHF) 还原为5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF), 参与机体生理生化过程, 为体内嘌呤、嘧啶的合成及DNA、RNA、蛋白质的甲基化提供甲基, 同时维持体内正常的同型半胱氨酸 (Hcy) 水平。



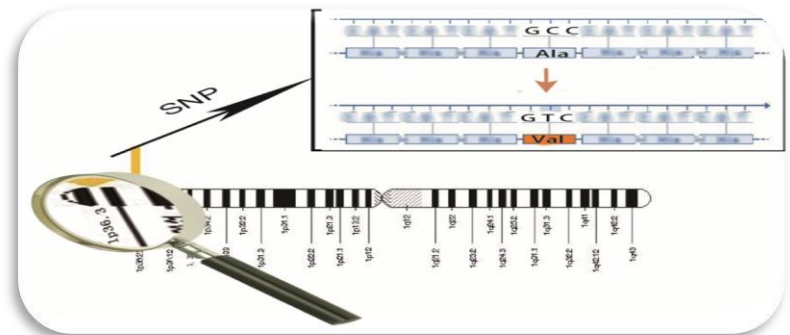
叶酸-甲硫氨酸代谢途径



MTR: 甲硫氨酸合成酶

MTHFR基因多态性

- ◆ MTHFR基因位于1号染色体短臂1p36.3位置，具有多个基因多态性位点
- ◆ 最有临床意义的是**MTHFR C677T突变位点**，使丙氨酸（Ala）被缬氨酸(Val)替代，具有3种基因型：
 - ◆ CC型（野生型）
 - ◆ CT型(杂合突变型)
 - ◆ TT型(纯合突变型)



MTHFR
突变

突变杂合型相对于野生型酶活性

纯合突变型相对于野生型酶活性

C677T

降低**30%**

降低**50-60%**

MTHFR C677T突变频率

MTHFR基因C677T在亚洲人群突变率较高

- MTHFR 677CT型：亚洲人群44.4%，中国人43.9%
- MTHFR 677TT型：亚洲人群28.9%，中国人23.2%

		CC	CT	TT
<u>CEU_GENO_PANEL</u>	European	0.576	0.356	0.068
<u>AAM_GENO_PANEL</u>	African American	0.803	0.197	
<u>CHB_GENO_PANEL</u>	Asian	0.267	0.444	0.289
<u>YRI_GENO_PANEL</u>	Sub-Saharan African	0.783	0.217	

MTHFR C677T基因突变造成叶酸代谢障碍

叶酸代谢障碍导致的危害

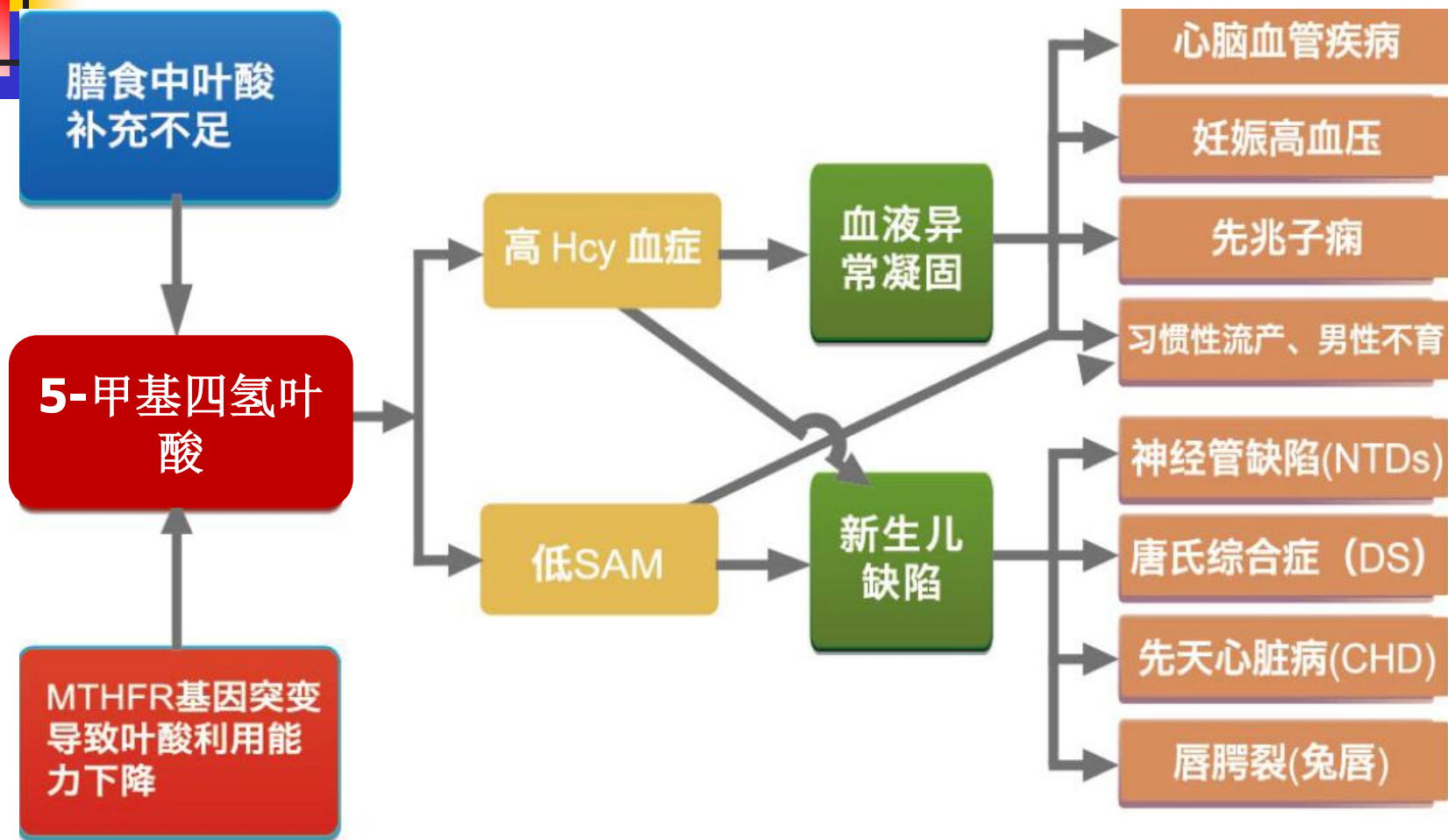
❖ 甲基供给不足，影响DNA、RNA、蛋白质的合成，发生妊娠相关疾病、胎儿出生缺陷等疾病

甲基化供体不足

❖ 内皮毒性损伤血管内皮细胞，血管弹性和胶原纤维扩张血管作用下降，引发动脉粥样硬化；
❖ 促进平滑肌细胞增生，引发高血压；
❖ 过氧化物和超氧化物损伤DNA、RNA及蛋白质；
❖ HCY活化凝血因子，使血液处于高凝状态，发生血栓性事件。

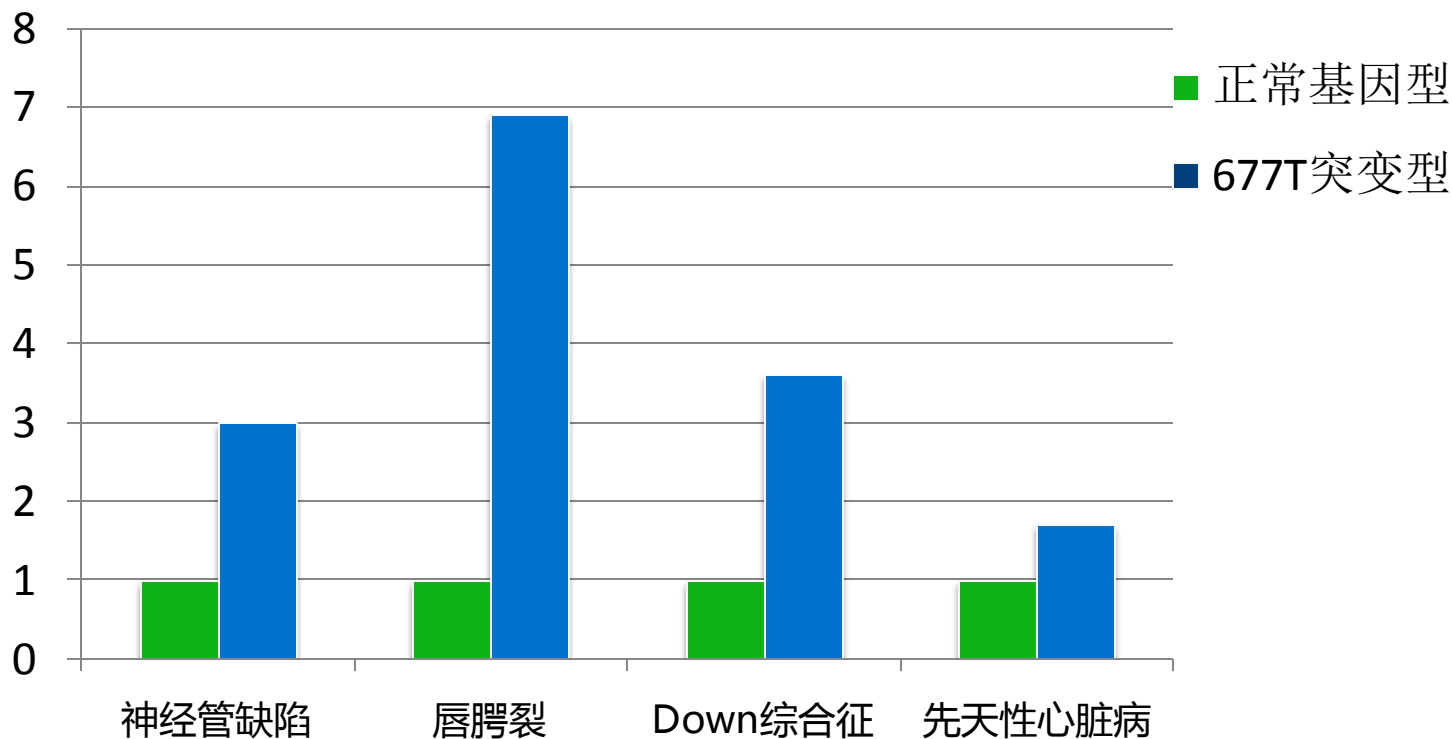
同型半胱氨酸浓度升高

MTHFR基因多态性引发的相关疾病



MTHFR基因多态性及叶酸补充不足时，对个体造成的危害相当大。

MTHFR突变导致新生儿缺陷性疾病风险增加



MTHFR C677T突变和非突变妇女孕育缺陷儿风险对比

1. Am J Epidemiol, 2000, 151(9): 862—877.
2. Am J Epidemiol. 2003. 157(7): 583-591.
3. Am J Clin Nutr. 1999, 70(4):495-501.
4. Cardiol Young. 2013 Feb;23(1):89-98.



MTHFR基因检测的临床意义

- MTHFR基因C677T多态性为高同型半胱氨酸血症主要遗传因素
- 检测结果TT型的患者，常规药物治疗（叶酸5mg、维生素B6、维生素B12）降低Hcy至正常范围后，仍需不间断补充叶酸（400~800μg），作为脑血管疾病的一级预防，以降低脑卒中发生风险。
- MTHFR基因C677T多态性影响孕龄期妇女对叶酸的吸收，检测为CT和TT型的孕妇，应进行个体化的叶酸补充剂量调整，预防出生缺陷。

孕妇个性化补充叶酸

叶酸利用能力	孕前3个月	孕早期 (0~12周以前)	孕中/后期 (13~40周)
CC型	400微克 / 天	400微克 / 天	注意食物补充, 可不需额外补充
CT型	400微克 / 天	800微克 / 天	400微克 / 天
TT型	800微克 / 天	800微克 / 天	400微克 / 天

提示：

- 1、以上补充剂量指合成叶酸补充剂或强化剂的摄入量，不包括食物。
- 2、对所有成年人包括孕妇和乳母，合成叶酸制剂的可耐受的最高摄入量设定为1000微克/天，因此800微克 / 天的叶酸制剂是安全的。
- 3、具体请遵医嘱。

中国疾病预防控制中心妇幼保健中心组织的孕期叶酸利用能力检测所提供的增补参考量



CYP2C19基因检测



CYP2C19的生物学性质

- ◆ S-美芬妥英羟化酶，细胞色素P450家族主要成员之一。
- ◆ 药物代谢的第一相酶，很大程度上决定着药物的代谢速率与药物的清除率。
- ◆ 广泛分布在肝、肾、脑、皮肤、肺、胃肠道、胎盘等组织器官，主要在肝脏
- ◆ 参与多种外源性物质的代谢：药物、抗氧化剂、有机溶剂、染料等
- ◆ 基因位于10q24.2，由9个外显子构成

CYP2C19参与约20多种药物的代谢

质子泵抑制剂	抗抑郁药		抗癫痫类	其他
Omeprazole	Fluoxetine	Imipramine	Valproic acid	Voriconazole
奥美拉唑	氟西汀（百忧解）	丙咪嗪	丙戊酸	伏立康唑（抗真菌药）
Lansoprazole	Citalopram	Moclobemide	Phenytoin	Progesterone
兰索拉唑	西酞普兰	吗氯贝胺	苯妥英	黄体酮（孕激素）
Pantoprazole	Escitalopram	Trimipramine	Phenobarbituone	Rifampicin
泮托拉唑	艾司西酞普兰	曲米帕明	苯巴比妥	利福平（抗菌药物）
Rabeprazole	Amitriptyline	Etizolam	Diazepam	Clopidogrel
雷贝拉唑	阿米替林	依替唑仑	安定	氯吡格雷 （抗血小板聚集抑制剂）
	Clomipramine			Nelfinavir
	氯米帕明			那非那韦（抗HIV病毒）
	Clobazam			Proguanil
	氯巴占			氯胍（抗疟疾药）
				Cyclophosphamide
				环磷酰胺（抗肿瘤药）




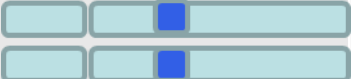




CYP2C19基因存在多态性

- **CYP2C19**基因存在众多多态性（突变频率**>1%**），根据发现的先后顺序，依次命名为***2**、***3**、***4**、***17 ...*28...**，无突变则命名为***1**；
- 检测***2**、***3**两个位点可覆盖**99%**以上中国人群。

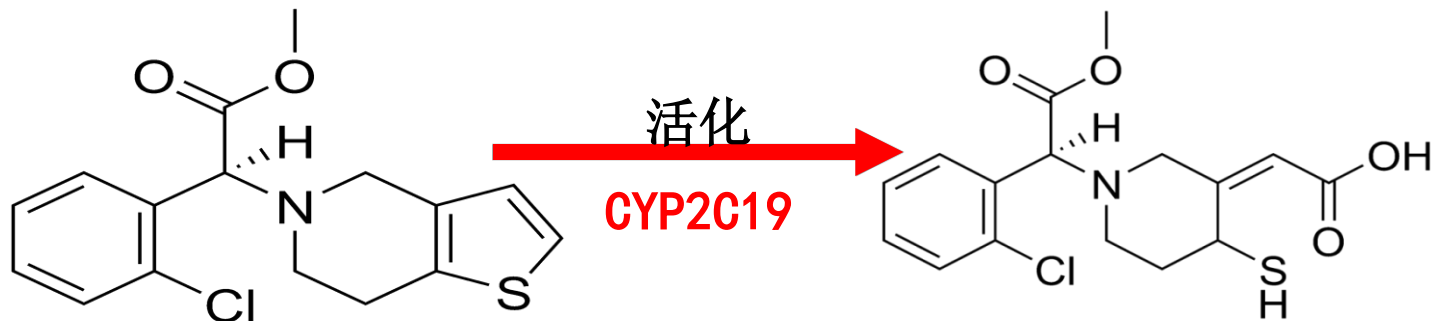
等位基因	碱基突变	酶活性
CYP2C19 *1	无	正常
CYP2C19 *2	681 G>A	无活性
CYP2C19 *3	636 G>A	无活性

不同基因型的患者对药物代谢速度不同

基因型	图示	备注	代谢速度	中国人频率 (n=283)	本院数据 (n=481)
*1/*1		快代谢型 EM	快	42.4%	43.4%
*1/*2		中间代谢型 IM	中	43.4%	44.8%
*1/*3					
*2/*2		慢代谢型 PM	慢	14.2%	11.8%
*3/*3					
*2/*3					

氯吡格雷

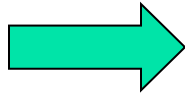
临床常用的血小板抑制剂，是一种前体药物，只有通过机体的代谢才会产生抗凝血的生物活性，在被肝酶**CYP2C19**代谢转化为其活性形式之前，该药不具有抗血小板凝集的作用！



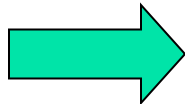
应用：急性冠状动脉综合症（ACS）、PCI手术后抗血小板治疗

氯吡格雷在人体中的代谢过程

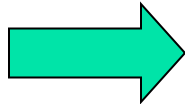
ABCB1调控
药物吸收分布



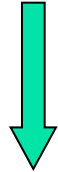
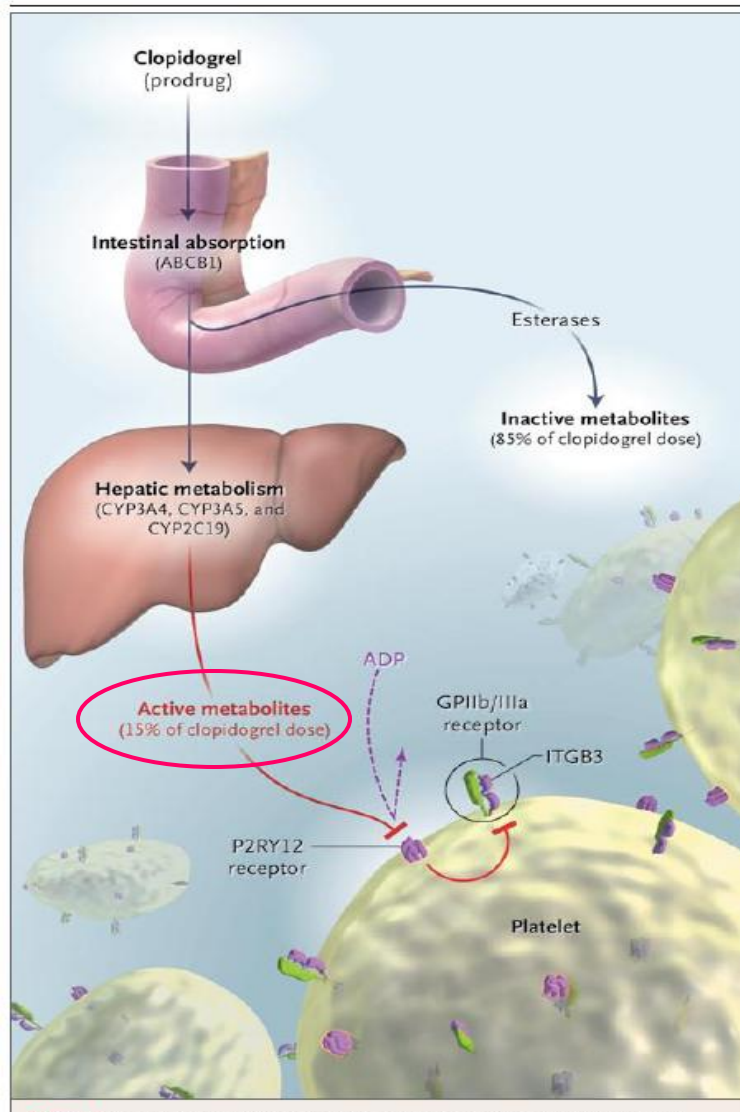
肝脏细胞色素P450代
谢酶 (**CYP3A4**,
CYP3A5,
CYP2C19)



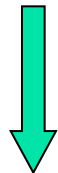
ADP受体
(**P2Y12**)



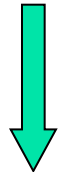
CYP2C19的活性代谢
产物选择性抑制**ADP**与
其受体结合发挥阻断血
小板聚集的作用。



氯吡格雷活性代谢产
物生成减少

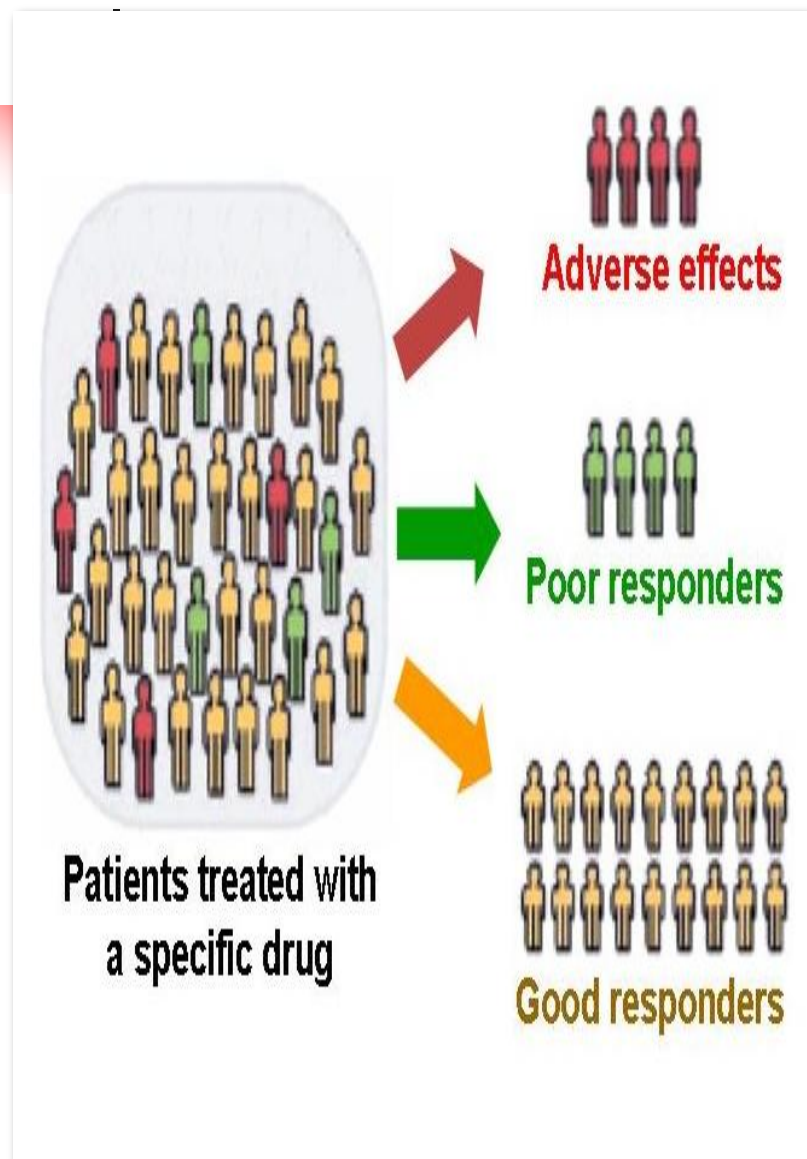


血小板聚集率 ↑



心血管事件率 ↑

氯吡格雷血小板反应多态性



血小板反应多样性（Variability Of Response, VPR）：通常指的是同一种抗血小板药物所产生的不同抗血小板效应：

1. 低反应者：血小板聚集抑制率下降, 可能会发生较高的不良心血管事件（心源性死亡、缺血性脑卒中、心肌梗死）以及血栓
2. 高反应者：血小板聚集抑制率升高, 可能引发高出血风险

Angiolillo DJ et al. J Am Coll Cardiol. 2007;49:1505–16

Angiolillo DJ et al. Am J Cardiol. 2009;103(suppl):27A–34A



氯吡格雷低反应的发生率较高

2002至2005年间的临床研究报告，氯吡格雷低反应发生比例高

试验	n	病人	剂量	发生率
Jaremo ¹	18	PCI	300/75	28%
Gurble ²	92	PCI	300/75	31-35%
Mueller ³	105	PCI	600/75	5-11%
Kesmarkey ⁴	226	CVD	75	31%
Matezky ⁵	60	AMI/PCI	300/75	25%
总计	501			5%~35%

1. J Intern Med, 2002, 252 (3):233-238

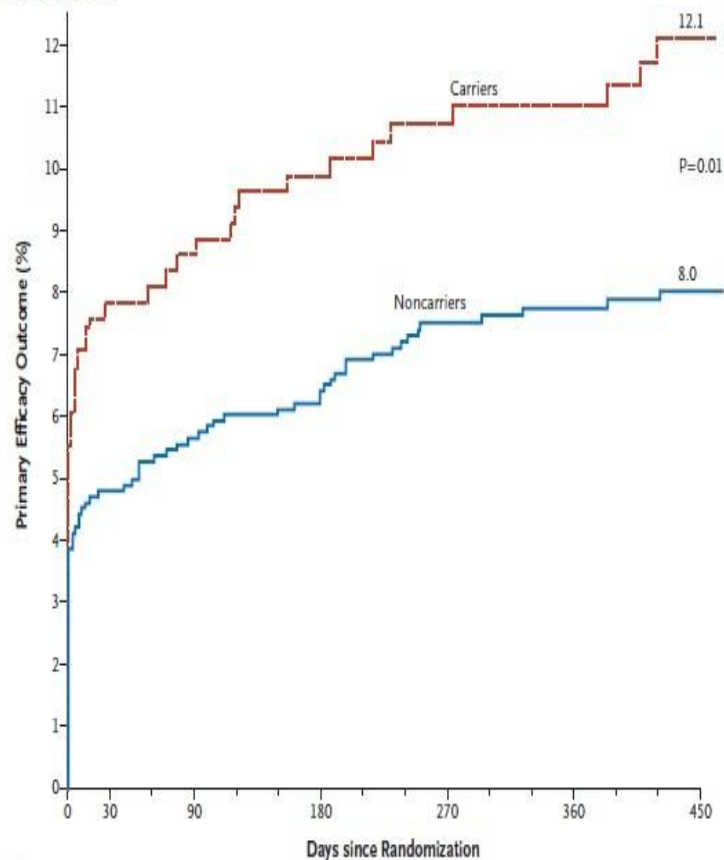
2. Circulation, 2003, 107 (23):2908-13

3. Thromb Haemost, 2003, 89 (5):783-7

4. Eur Heart J, 2003, 24:193

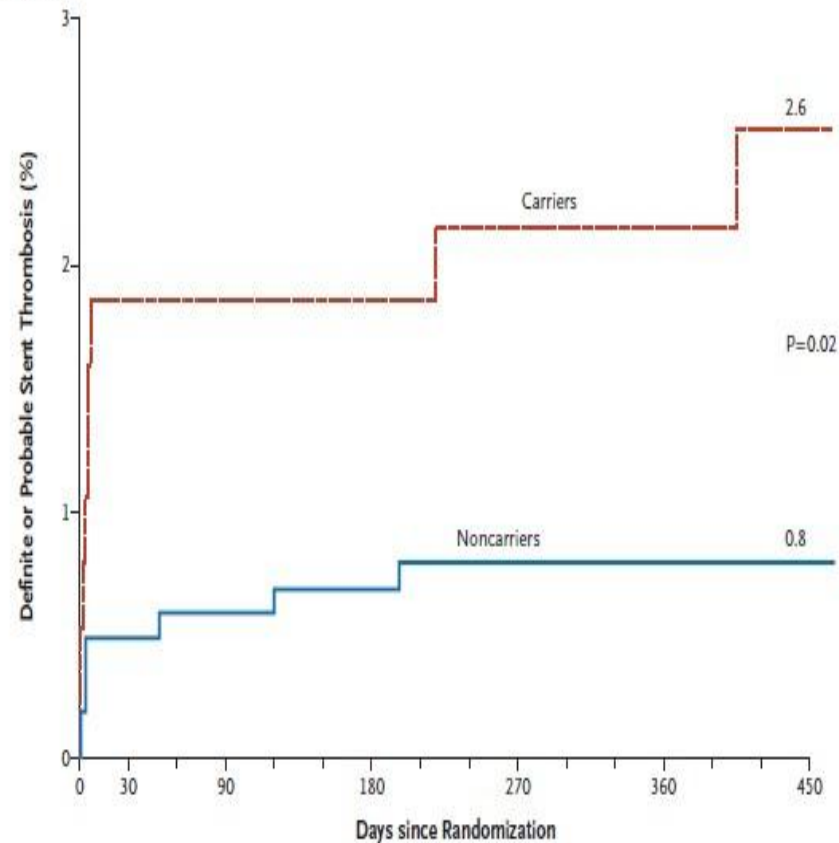
5. Circulation, 2004, 109:3171

A Primary Efficacy Outcome



No. at Risk							
Carriers	395	364	360	348	306	270	181
Noncarriers	1064	1009	999	980	870	755	542

B Stent Thrombosis



No. at Risk							
Carriers	375	368	366	359	316	279	186
Noncarriers	1014	1004	1001	989	885	765	547

研究数据表明：在接受氯吡格雷治疗的人群中，CYP2C19基因突变者支架血栓形成和死亡风险均显著高于非突变患者。

◆氯吡格雷抵抗的主要原因：**CYP2C19**基因变异

◆其次：药物相互作用，如氯吡格雷与奥美拉唑共用



2010年3月，美国FDA在氯吡格雷说明书中增加了一级黑框警告，建议患者服用氯吡格雷前需检测CYP2C19基因型

HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION

These highlights do not include all the information needed to use PLAVIX safely and effectively. See full prescribing information for PLAVIX.

PLAVIX (clopidogrel bisulfate) tablets

Initial U.S. Approval: 1997

WARNING: DIMINISHED EFFECTIVENESS IN POOR METABOLIZERS

See full prescribing information for complete boxed warning.

- Effectiveness of Plavix depends on activation to an active metabolite by the cytochrome P450 (CYP) system, principally CYP2C19. (5.1)
- Poor metabolizers treated with Plavix at recommended doses exhibit higher cardiovascular event rates following acute coronary syndrome (ACS) or percutaneous coronary intervention (PCI) than patients with normal CYP2C19 function. (12.5)
- Tests are available to identify a patient's CYP2C19 genotype and can be used as an aid in determining therapeutic strategy. (12.5)
- Consider alternative treatment or treatment strategies in patients identified as CYP2C19 poor metabolizers. (2.3, 5.1)

- Non-ST-segment elevation ACS (UA/NSTEMI): 300 mg loading dose followed by 75 mg once daily, in combination with aspirin (75-325 mg once daily)
- STEMI: 75 mg once daily, in combination with aspirin (75-325 mg once daily), with or without a loading dose and with or without thrombolytics
- Recent MI, recent stroke, or established peripheral arterial disease: 75 mg once daily (2.2)

-----DOSAGE FORMS AND STRENGTHS-----
Tablets: 75 mg, 300 mg (3)

-----CONTRAINDICATIONS-----
• Active pathological bleeding, such as peptic ulcer or intracranial hemorrhage (4.1)
• Hypersensitivity to clopidogrel or any component of the product (4.2)

-----WARNINGS AND PRECAUTIONS-----
• Reduced effectiveness in impaired CYP2C19 function: Avoid concomitant use with drugs that inhibit CYP2C19 (e.g., omeprazole). (5.1)
• Bleeding: Plavix increases risk of bleeding. Discontinue 5 days prior to elective surgery. (5.2)
• Discontinuation of Plavix: Premature discontinuation increases risk of

- 氯吡格雷依赖于P450酶系主要CYP2C19代谢生成活性代谢产物来发挥抗血小板疗效。
- 弱代谢型的ACS或接受PCI治疗的患者，在接受推荐剂量波立维治疗时，心血管事件发生率较CYP2C19基因正常的患者上升
- 检测CYP2C19基因型对使用氯吡格雷是有意义的，检测结果有助于医生调整治疗策略。
- 对于CYP2C19弱代谢型患者，建议考虑调整治疗方法或治疗策略

- Inform healthcare professionals that tests are available to identify genetic differences in CYP2C19 function.
- Advise healthcare professionals to consider use of other anti-platelet medications or alternative dosing strategies for Plavix in patients identified as poor metabolizers.

2011年ESC、ACC 更新应用指南

2011版ESC指南，第20页

Clopidogrel 300-mg loading dose is recommended for patients who cannot receive ticagrelor or prasugrel.	I	A	110, 146, 147
A 600-mg loading dose of clopidogrel (or a supplementary 300-mg dose at PCI following an initial 300-mg loading dose) is recommended for patients scheduled for an invasive strategy when ticagrelor or prasugrel is not an option.	I	B	108, 114, 115
A higher maintenance dose of clopidogrel 150 mg daily should be considered for the first 7 days in patients managed with PCI and without increased risk of bleeding.	IIa	B	108
Increasing the maintenance dose of clopidogrel based on platelet function testing is not advised as routine, but may be considered in selected cases.	IIb	B	124
Genotyping and/or platelet function testing may be considered in selected cases when clopidogrel is used.	IIb	B	119, 121

In patients pre-treated with P2Y₁₂ inhibitors who need to undergo non-emergent major surgery postponing surgery at least for 5 days after cessation of ticagrelor or clopidogrel, and 7 days for feasible and unless the patient is at high risk of ischaemic events should be considered.

Ticagrelor or clopidogrel should be considered to be (re-) started after CABG surgery as soon

The combination of aspirin with an NSAID (selective COX-2 inhibitors and non-selective NSAID) is recommended.

2011版ACC指南，第11页

1. Platelet function testing to determine platelet inhibitory response in patients with UA/NSTEMI (or, after ACS and PCI) on thienopyridine therapy may be considered if results of testing may alter management (73–77). (Level of Evidence: B)

New recommendation

2. Genotyping for a CYP2C19 loss of function variant in patients with UA/NSTEMI (or, after ACS and with PCI) on clopidogrel therapy might be considered if results of testing may alter management (78–84). (Level of Evidence: C)

New recommendation

两大顶级心脏病学会时隔4年再次更新临床应用指南。与07版指南相比，在抗血小板治疗方面，欧洲心脏病学会（ESC）和美国心脏病学会（ACC）都加入了基因检测项目，**建议患者服用氯吡格雷前进行CYP2C19基因检测**，且把这个更新都归为II b类指导建议（即为可考虑使用的建议类型）。可以看出，两大学会对于基因分型检测在抗血小板治疗中起到的作用持肯定态度且都给予了重视。

I 类：获益远远大于风险；

II a/b类：获益远大于风险；



开展CYP2C19基因检测的必要性

风险增加

携带一个或两个**CYP2C19**风险等位基因的患者，其心血管死亡、心梗、脑卒中或支架内血栓形成风险均显著增加

临床指南改变

基于以上研究结果，部分国家已开始制定针对CYP2C19风险等位基因携带者的临床实践指南

对国人尤其重要

14%国人携带2个CYP2C19风险等位基因，远高于白人(2%)和黑人(4%)

适宜的检测人群

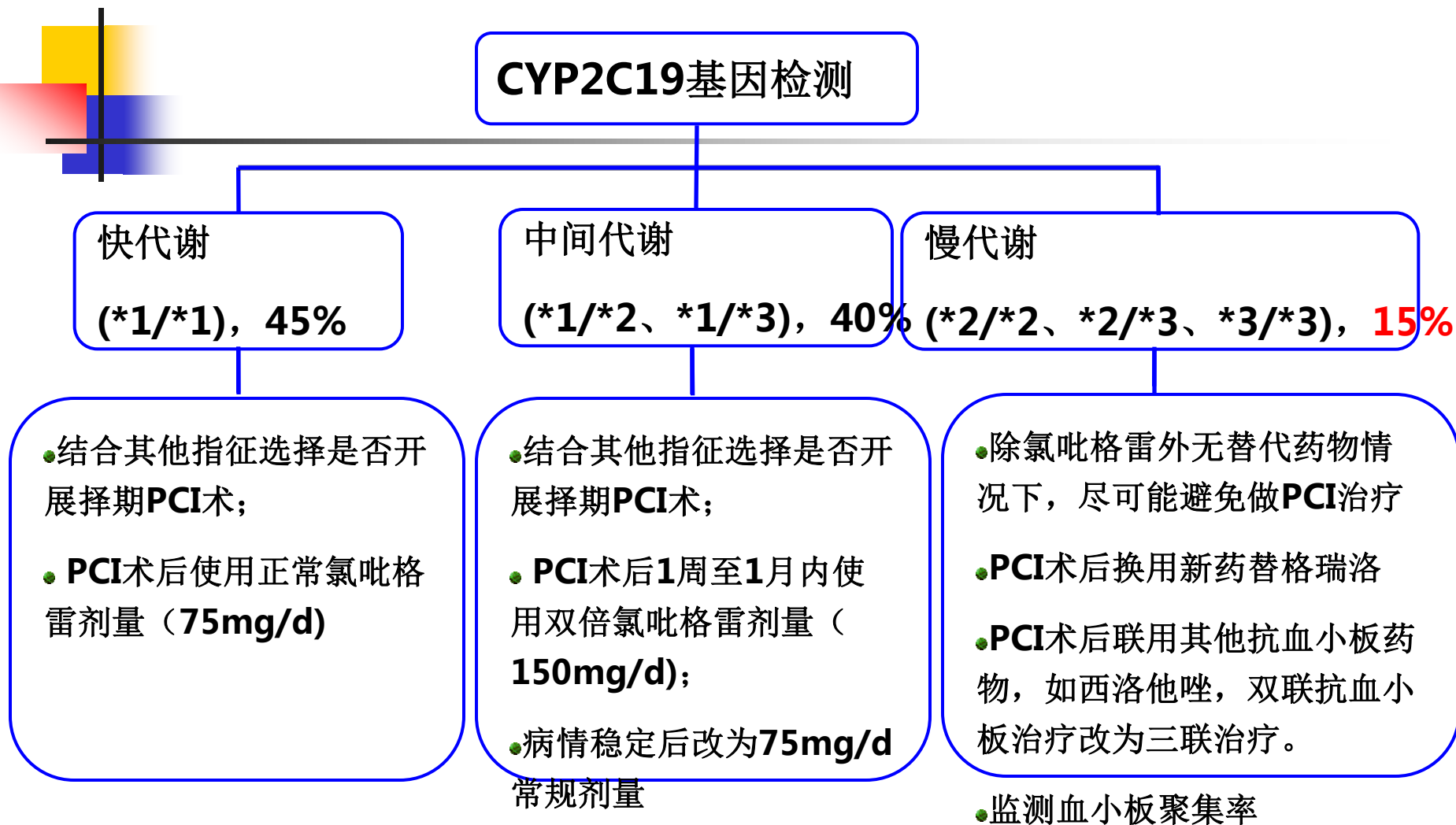
1. 服用氯吡格雷抗血小板治疗的中血栓风险较高的患者
2. 拟行PCI手术的患者
3. 多血管病变的PCI、已有支架内血栓史者、临床高风险因素者（ACS、糖尿病、慢性肾病）等



检测CYP2C19基因型的临床意义

- 根据不同个体的基因型选择药物并制定给药方案，可最大限度地增加治疗作用，减少不良反应。
- 指导氯吡格雷用药。
- 患者服用质子泵抑制剂时，
 - 若其携带中等代谢型基因，使用常规剂量。
 - 若患者携带快代谢型基因，常规剂量可能不足，需适当加量。
 - 以奥美拉唑为例，应由40mg/d剂量增加至80mg/d及以上剂量。若患者携带慢代谢型基因，可酌情减少质子泵抑制剂的剂量，如奥美拉唑使用20mg/d的剂量。
- 若患者携带慢代谢型基因，服用常规剂量伏立康唑可能产生较高的血药浓度导致肝毒性，需适当减量。
- 尽可能避免同时服用同属于CYP2C19酶代谢的药物。

CYP2C19指导氯吡格雷使用—参考方案



SA Scott, K Sangkuhl, EE Gardner, et al. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2011;4 accept Chen Hui, et al. Heart 2011;97:A107 doi:10.1136/heartjnl-2011-300867.316

Holmes DR, Dehmer GJ, Kaul S, et al. J Am Coll Cardiol 2010;56:321-41

病例报告

Case 1

- 一位患者，在接受了支架手术后开始服用氯吡格雷。在支架术后4年间，多次发生血管狭窄和血栓等不良事件，共植入支架五次。
- 后来经检测发现，该患者**CYP2C19** 基因型为*2*2，为慢代谢型。
- 停用氯吡格雷，改用**普拉格雷**进行治疗后，再未发生不良事件。

Case 2

- 一位患急性心肌梗死病人，在接受了支架手术后开始服用氯吡格雷。术后两年间发生缺血性胸痛和心肌梗死各一次。
- 经检测发现，该患者**CYP2C19** 基因型为*2*2，为慢代谢型。
- **冠状动脉搭桥手术**，手术成功，术后一直服用阿司匹林。



CYP2C9和VKORC1基因检测



CYP2C9基因

——华法林药效相关基因

- ◆ 细胞色素P450家族主要成员之一，药物代谢的第一相酶，在很大程度上决定着药物的代谢速率与药物的清除率。
- ◆ 华法林由CYP2C9酶代谢。
- ◆ 与野生型CYP2C9代谢酶相比，该酶的基因多态性与小剂量华法林引起较高的出血并发症的发生率相关^[1]。
- ◆ CYP2C9基因变异会引起华法林代谢减慢及半衰期延长，从而导致其体内华法林血药浓度增高，抗凝作用增强。

1. Caldwell MD , Berg RL , *et al* . Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction [J]. *Clin Med Res* , 2007 , 5(1):8-16.
2. D'Andrea G , D'Ambrosio RL , Perna PD *et al* . A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin [J] . *Blood* , 2005 , 105:645-9.
3. Rost S , Fregin A , Ivaskvicius V , *et al* . Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2 [J]. *Nature* , 2004, 427(6974):537-41.

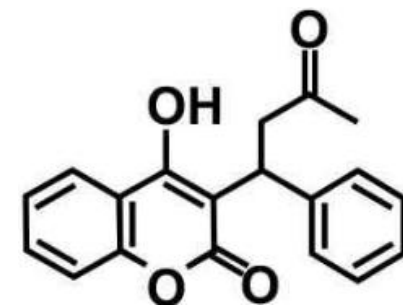
VKORC1基因

——华法林药效相关基因

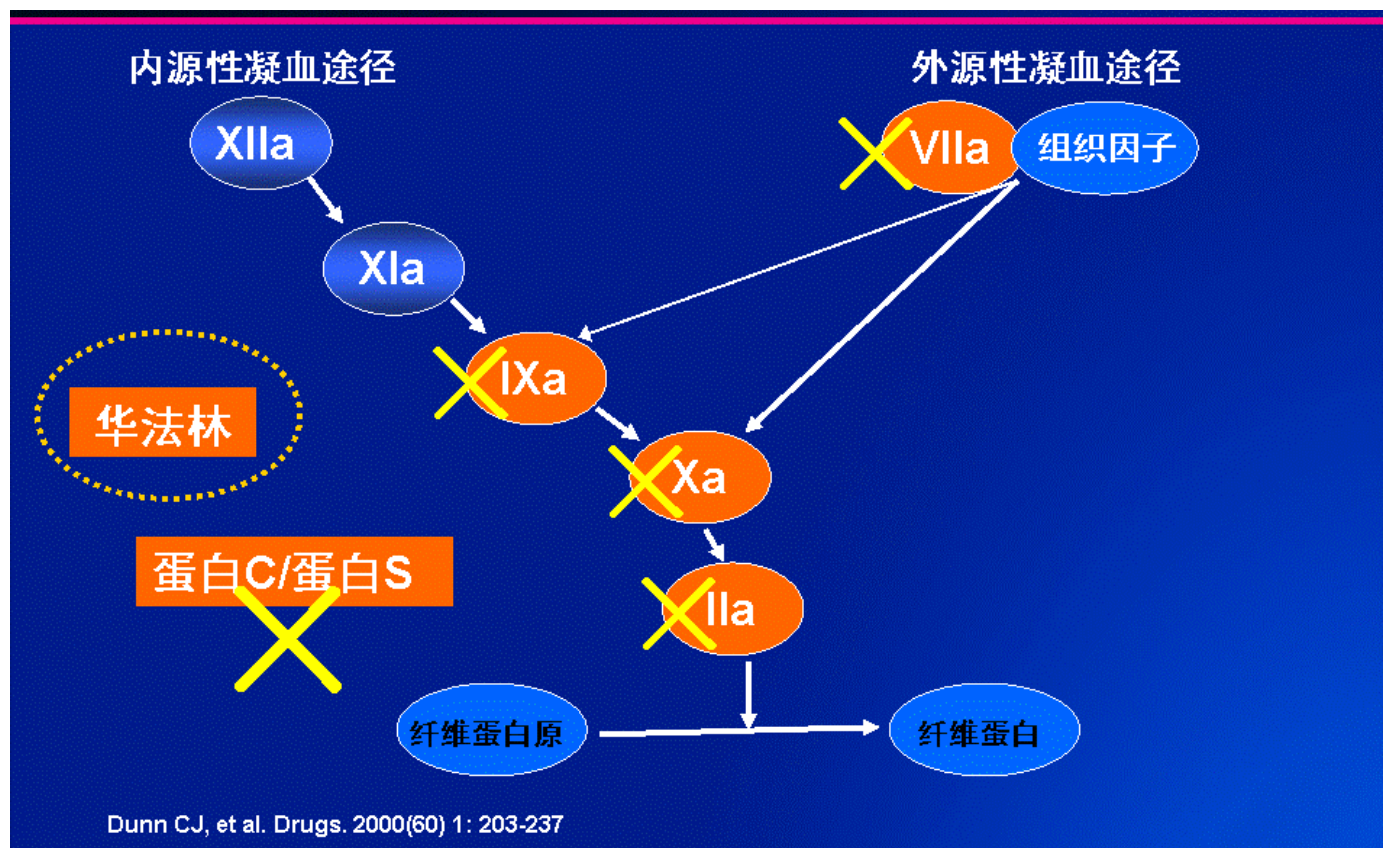
- ◆维生素K环氧化物还原酶复合物1基因(**VKORC1**), 编码维生素K环氧化物还原酶 (**VKOR**)
- ◆维生素K环氧化物还原酶是华法林的作用靶点
- ◆**VKORC1**的基因多态性对华法林的治疗效果有很大影响 [2,3]
- ◆**VKORC1**基因变异会导致**VKORC1**酶活性降低, 使维生素K依赖性凝血因子的功能降低, 机体对华法林的敏感性增加。

1. Caldwell MD , Berg RL , *et al* . Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction [J]. *Clin Med Res* , 2007 , 5(1):8-16.
2. D'Andrea G , D'Ambrosio RL , Perna PD *et al* . A polymorphism in the **VKORC1** gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin [J] . *Blood* , 2005 , 105:645-9.
3. Rost S , Fregin A , Ivaskivicius V , *et al* . Mutations in **VKORC1** cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2 [J]. *Nature* , 2004, 427(6974):537-41.

华法林: Warfarin



- ◆ 维生素K拮抗剂，双香豆素类抗凝药，口服，长期服用
- ◆ 竞争性抑制维生素K依赖性凝血因子的活化起到抗凝作用



临床华法林用药面临的问题

- 治疗窗窄，有效治疗浓度 $2.2 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$
- 个体化差异大
- 药物起效和失效缓慢
- 需要频繁调整药物剂量 凝血酶原时间（PT）
和国际标准化比值（INR）
- 国际标准化比值（INR）
 - $\text{INR} = (\text{patient PT} / \text{mean normal PT})^{\text{ISI}}$
 - INR 1.8 ~ 2.5
 - 需要频繁检测INR并调整剂量，阻碍了华法林临床使用的易用性。

确定华法林剂量需要数周时间，
而不良事件高发期在30-60天！



FDA建议检测CYP2C9和VKORC1

2007年8月16日，美国FDA批准更新抗凝药物华法林（Coumadin）的产品说明书，要求在警示信息中标明**CYP2C9**和**VKORC1**遗传差异可能影响其对该药物的反应。

并建议在使用华法林治疗前进行**CYP2C9**和**VKORC1**基因检测

 U.S. Department of Health & Human Services www.hhs.gov

 **U.S. Food and Drug Administration** A-Z Index Search go

[Home](#) | [Food](#) | [Drugs](#) | [Medical Devices](#) | [Vaccines, Blood & Biologics](#) | [Animal & Veterinary](#) | [Cosmetics](#) | [Radiation-Emitting Products](#) | [Tobacco Products](#)

News & Events  Share  Email this Page  Print this page  Change Font Size

[Home](#) > [News & Events](#) > [Newsroom](#) > [Press Announcements](#)

FDA NEWS RELEASE

FOR IMMEDIATE RELEASE
August 16, 2007

Media Inquiries:
Karen Riley, 301-827-6242
Consumer Inquiries:
888-INFO-FDA

FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information
New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients

The U.S. Food and Drug Administration announced today the approval of updated labeling for the widely used blood-thinning drug, Coumadin, to explain that people's genetic makeup may influence how they respond to the drug.

Manufacturers of warfarin, the generic version of Coumadin, are to add similar information to their products' labeling, FDA said.

The labeling change highlights the opportunity for healthcare providers to use genetic tests to improve their initial estimate of what is a reasonable warfarin dose for individual patients. Testing may help optimize the use of warfarin and lower the risk of bleeding complications from the drug.



检测结果的报告形式

基因名称	基因型	表现型	检测结果
VKORC1基因	GG (-1639GG)	酶活性高	阴性或阳性
	GA (-1639GA)	酶活性中	阴性或阳性
	AA (-1639AA)	酶活性低	阴性或阳性
CYP2C9基因	*1/*1 (*2CC/*3AA)	酶活性高，快代谢	阴性或阳性
	*1/*2 (*2CT/*3AA)	酶活性中，中等代谢	阴性或阳性
	*1/*3 (*2CC/*3AC)	酶活性中，中等代谢	阴性或阳性
	*2/*2 (*2TT/*3AA)	酶活性低，慢代谢	阴性或阳性
	*2/*3 (*2CT/*3AC)	酶活性低，慢代谢	阴性或阳性
	*3/*3 (*2CC/*3CC)	酶活性低，慢代谢	阴性或阳性

FDA 2010年在华法林说明书中增加起始剂量选择表 (mg/d)

<i>VKORC1</i>	<i>CYP2C9</i>					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2
GA	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2
AA	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2	0.5-2	0.5-2

综合数学模型预测起始剂量

- **国际华法林药物基因组学联合会（The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium）**通过大量数据，制订了华法林的剂量运算法，它明显优于传统的固定剂量方案。
- 联合会由**4**大洲**9**个国家的**21**个研究组组成
- 共搜集**5700**例使用华法林治疗的病人（**包括华人在内的亚洲人1634例**），其中**5052**例**INR**值在**2**到**3**之间的用于数据分析

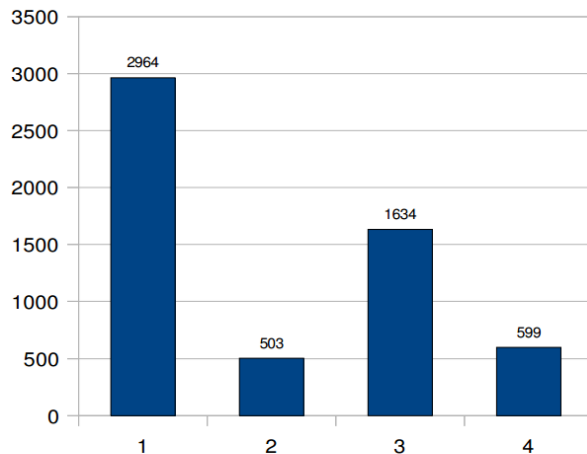


Figure 3: Histogram of Race attribute

1, White

(White+Caucasian+Hispanic)

2, Black or African American

3, Asian

(Japanese, Han Chinese, Chinese, Korean, Malay, Indian)

4, Others

(Other Mixed Race+Intermediate)

UKPMC Funders Group, *N Engl J*

华法林剂量估算网站

根据基因检测结果和已有的华法林用药指导方法，可以指导医生正确给出华法林用药剂量

WARFARINDOSING

www.WarfarinDosing.org

> [Warfarin Dosing](#)

> [Outcomes](#)

> [Hemorrhage Risk](#)

> [Patient Education](#)

> [Contact Us](#)

> [References](#)

> [Glossary](#)

> [About Us](#)

User:
Patient:
Version 17.4
Build : June 29, 2009

Required Patient Information

Age: Sex: Ethnicity:

Race:

Weight: lbs or kgs

Height: (feet and inches) or (cms)

Smokes: Liver Disease:

Indication:

Baseline INR: Target INR: ☐ Randomize & Blind

Amiodarone/Cordarone® Dose: mg/day

Statin/HMG CoA Reductase Inhibitor:

Any azole (eg. Fluconazole):

Sulfamethoxazole/Septtra/Bactrim/Cotrim/Sulfatrim:

Genetic Information

VKORC1-1639/3673:

CYP4F2 V433M:

GGCX rs11676382:

CYP2C9*2:

CYP2C9*3:

CYP2C9*5:

CYP2C9*6:

www.warfarindosing.org

Warfarin pharmacogenetic dosing algorithm			
		5.6044	
-		0.2614 x	Age in decades
+		0.0087 x	Height in cm
+		0.0128 x	Weight in kg
-		0.8677 x	<i>VKORC1</i> A/G
-		1.6974 x	<i>VKORC1</i> A/A
-		0.4854 x	<i>VKORC1</i> genotype unknown
-		0.5211 x	<i>CYP2C9</i> *1/*2
-		0.9357 x	<i>CYP2C9</i> *1/*3
-		1.0616 x	<i>CYP2C9</i> *2/*2
-		1.9206 x	<i>CYP2C9</i> *2/*3
-		2.3312 x	<i>CYP2C9</i> *3/*3
-		0.2188 x	<i>CYP2C9</i> genotype unknown
-		0.1092 x	Asian race
-		0.2760 x	Black or African American
-		0.1032 x	Missing or Mixed race
+		1.1816 x	Enzyme inducer status
-		0.5503 x	Amiodarone status
=	Square root of weekly warfarin dose**		

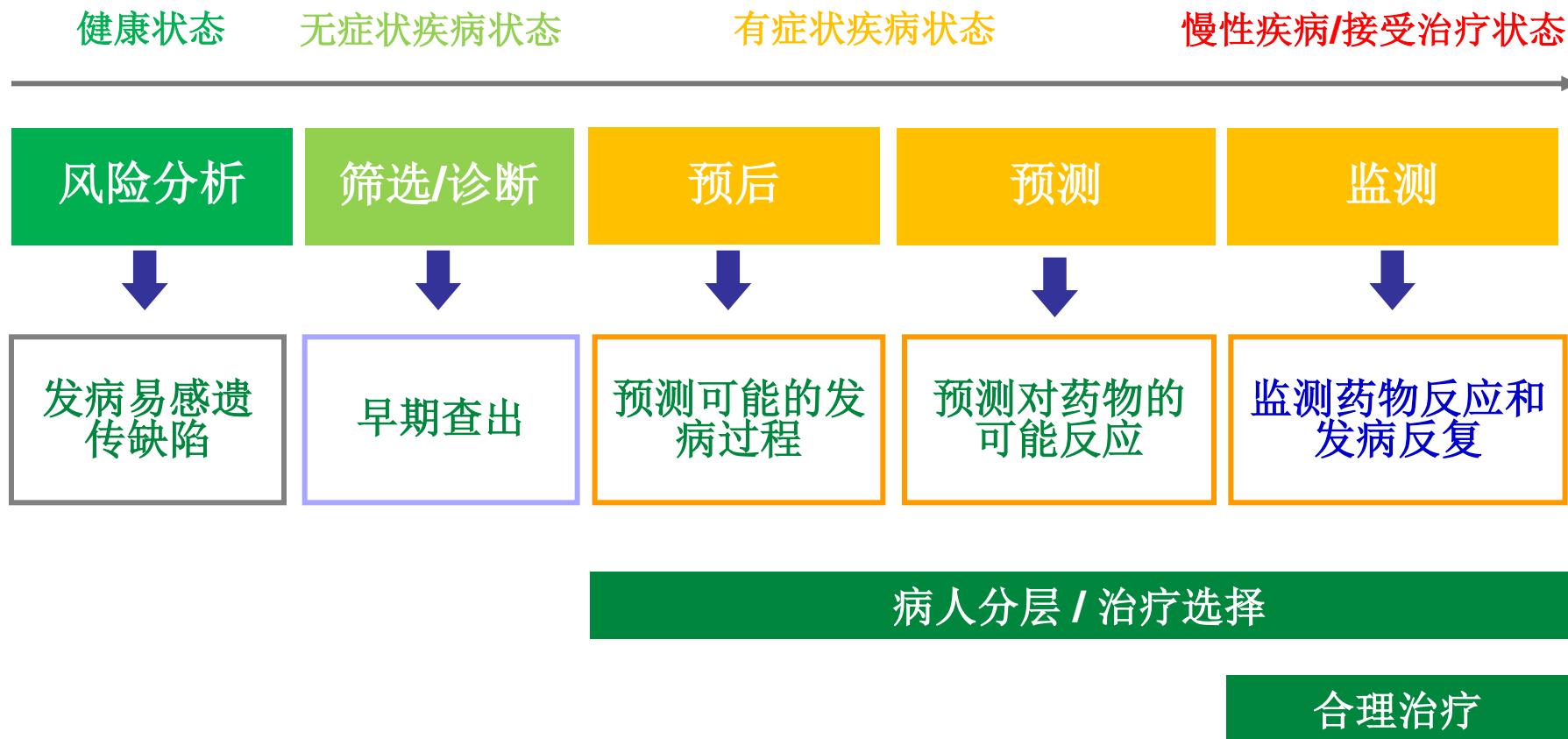
Legend for use of algorithms:

- Age in decades = 1 for 10-19, 2 for 20-29, etc...
- *VKORC1* G/A = 1 if heterozygous for rs9923231, otherwise zero
- *VKORC1* A/A = 1 if homozygous for A at rs9923231, otherwise zero
- *VKORC1* genotype unknown = 1 if rs9923231 genotype missing or unknown, otherwise zero
- *CYP2C9* *1/*2 = 1 if *CYP2C9* genotype is *1/*2, otherwise zero
- *CYP2C9* *1/*3 = 1 if *CYP2C9* genotype is *1/*3, otherwise zero
- *CYP2C9* *2/*2 = 1 if homozygous for *CYP2C9* *2 allele, otherwise zero
- *CYP2C9* *2/*3 = 1 if *CYP2C9* genotype is *2/*3, otherwise zero
- *CYP2C9* *3/*3 = 1 if homozygous for *CYP2C9* *3 allele, otherwise zero
- *CYP2C9* genotype unknown = 1 if *CYP2C9* genotype unknown, otherwise zero
- Asian Race = 1 if self-reported race is Asian, otherwise zero
- Black/African American = 1 if self-reported race is Black or African American, otherwise zero
- Missing or Mixed race = 1 if self-reported race is unspecified or mixed, otherwise zero
- Enzyme inducer status = 1 if patient taking carbamazepine, phenytoin, rifampin, or rifampicin, otherwise zero
- Amiodarone status = 1 if patient taking amiodarone, otherwise zero

**The output of this algorithm must be squared to compute weekly dose in mg.

精准医疗与分子诊断

根据每个个体的基因谱，进行个体化健康管理，贯穿于疾病预防、诊断、治疗和治疗监测的整个过程





谢谢！