

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 05. 022

胎儿染色体非整倍体基因检测在孕妇产前筛查中的应用研究

廖晗献, 黄卫彤, 王宗杰

(广西壮族自治区南宁市妇幼保健院检验科 530001)

摘 要:目的 探讨胎儿染色体非整倍体(21、18、13-三体)基因检测在孕妇产前筛查中的应用价值。方法 回顾性分析 2018 年 2—6 月 3 247 例孕妇在南宁市妇幼保健院检验科进行胎儿染色体非整倍体基因检测的结果及生育前后追踪随访结果,阳性者进一步行羊水穿刺、脐带血穿刺染色体核型分析。分析孕妇行胎儿染色体非整倍体基因检测的指征构成比以及评价胎儿染色体非整倍体基因检测分析性能。结果 3 247 例孕妇中检出高风险 34 例,其中 21-三体高风险 21 例,18-三体高风险 7 例,13-三体高风险 6 例。22 例经羊水、脐静脉血细胞培养核型分析验证,15 例 21-三体高风险中 11 例与核型分析相符,4 例假阳性,阳性符合率 73.33%;4 例 18-三体高风险中 4 例与核型分析相符,阳性符合率 100.00%;3 例 13-三体高风险中 2 例与核型分析相符,1 例假阳性,阳性符合率 66.67%。3 247 例标本无 21、18、13-三体假阴性,漏诊率为 0。结论 胎儿染色体非整倍体基因检测作为一种产前筛查方法,在 21-三体、18-三体、13-三体检测中具有较高的阳性符合率,具有很高的应用价值,是一种值得推广的产前筛查方法,可作为产前诊断金标准染色体核型分析的有益补充。

关键词:胎儿; 染色体非整倍体基因; 染色体核型分析; 产前筛查; 21-三体; 18-三体; 13-三体
中图法分类号:R715.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)05-0657-04

Study on application of fetal chromosomal aneuploidy gene detection in prenatal screening of pregnant women

LIAO Hanxian, HUANG Weitong, WANG Zongjie

(Department of Clinical Laboratory, Nanning Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Nanning, Guangxi 530001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application value of fetal chromosomal aneuploidy (21, 18, 13-trisomy) gene detection in prenatal screening of pregnant women. **Methods** The fetal chromosomal aneuploidy gene detection results and follow up results before and after fertility of 3 247 pregnant women in the clinical laboratory department of the Nanning Municipal Maternal and Child Health Care Hospital from February 2018 to June 2018 were retrospectively analyzed. The positive individuals further conducted the amniocentesis and umbilical puncture chromosome karyotype analysis. The indication constituent ratio of pregnant women conducting fetal chromosome aneuploidy gene detection was retrospectively analyzed and the analytical performance of fetal chromosome aneuploidy gene detection was evaluated. **Results** Among 3 247 cases, 34 cases of high risk were detected out, including 21 cases of 21 trisomy high risk, 7 cases of 18 trisomy high risk, 6 cases of 13 trisomy high risk. Twenty-two cases were confirmed by the analysis of blood cell culture karyotyping analysis of amniotic fluid and umbilical vein, among 15 cases of 21 trisomy high risk, 11 cases were consistent with the karyotype analysis, 4 cases were false positive (positive coincidence rate 73.33%); among 4 cases of 18 trisomy high risk, 4 cases were consistent with karyotype analysis (positive coincidence rate 100.00%); among 3 cases of 13 trisomy high risk, 2 cases were consistent with the karyotype analysis and 1 case was false positive (positive coincidence rate 66.67%). A total of 3 247 samples had no 21, 18 and 13-trisomy false negative with the missed diagnosis rate of 0. **Conclusion** The fetal chromosomal aneuploidy gene detection as a prenatal screening method has a high accuracy rate in 21 trisomy, 18 trisomy and 13 trisomy detection, with high application value, is a prenatal screening method worth promotion, can serve as a beneficial supplement for prenatal diagnostic gold standard chromosome karyotype analysis.

Key words: fetus; chromosomal aneuploidy gene detection; chromosome karyotype analysis; prenatal screening; 21-trisomy; 18-trisomy; 13-trisomy

目前国内女性生育年龄提高,增加了胎儿染色体非整倍体异常引起的出生缺陷风险。染色体非整倍体异常具有较高随机性,在临床与之相关的常见遗传性疾病主要有 Patau 综合征(13-三体)、爱德华综合征

(18-三体)、唐氏综合征(21-三体)、Klinefelter 综合征(47,XXY)和 Turner 综合征(45,X)^[1]。迄今为止,染色体异常尚无有效的治疗手段,故早期的产前筛查及诊断尤为重要。目前,预防出生缺陷广泛应用的检测手段之一是基于血清学筛查评估染色体拷贝数异常的风险,但该检测方法的灵敏度和准确性不高,筛查假阳性率高^[2]。而介入性产前诊断技术因其为有创性,存在对孕妇造成胎儿丢失^[3]、子宫损伤、感染等风险,这也在一定程度上制约了其在临床的广泛应用。因此,开展可靠、非侵入性的产前筛查十分必要。近年来,随着分子生物学技术在临床检测领域的发展,对孕妇外周血中游离 DNA 进行深度测序的胎儿染色体非整倍体无创产前检测(NIPT)技术开始兴起,该技术通过生物信息学方法分析获取的胎儿染色体信息,进而获得胎儿非整倍体异常风险^[4-5]。NIPT 技术目前被广泛应用,但大部分的医疗机构都是收集标本后送往具有资质的第三方基因检测机构进行检测,仅有很少一部分医疗机构运用测序平台自主检测,对于 NIPT 在实验室检测过程中可能存在的问题报道较少。本文对南宁市妇幼保健院自主检测的 3 247 例标本进行回顾性分析,总结 NIPT 检测的指征构成比及分析性能,分析 NIPT 在实验室检测过程中存在的问题,进而探讨 NIPT 在胎儿染色体非整倍体异常诊断中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 2—6 月在南宁市妇幼保健院检验科接受 NIPT 检查的孕妇 3 247 例。孕妇年龄 15~52 岁,孕周 12~32 周。NIPT 指征:高龄(预产年龄 ≥ 35 岁),血清学筛查高风险及临界风险,B 超软指标异常或结果异常,错过其他筛查时机,孕妇自愿要求,有曾经生育过先天愚型儿史、死胎、胎儿畸形、稽留流产等其他不良孕产史等。采用统一知情同意书,充分告知孕妇 NIPT 的临床适应证、检测范围、局限性及可能存在的风险^[6],由孕妇自愿选择并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 天隆 NP968-S 核酸自动提取仪、美国 ABI 公司生产的 7300 Plus Real-Time PCR System 和 Veriti 96 Well Thermal Cycler、Ion Torrent 公司生产的 Ion One Touch ES 和 Ion One Touch 2、BioelectronSeq 4000 基因测序仪。母体血浆胎儿游离 DNA 提取试剂为博奥木华基因的核酸提取或纯化试剂。文库构建,质量检测及上机测序的试剂为博奥生物贸易有限公司生产的晶芯胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及测序 所有受试者抽取静脉血 10 mL 作为血液标本,所用采血管选择美国 Streck 公司所生产的 Cell-Free DNA BCTFM 管,采血管内置化学保护剂,能够起稳定血细胞的作用。所采集的血液

标本在 4℃ 条件保存并由冷链条件送至南宁市妇幼保健院检验科,在采血后 48 h 内分离血浆并保存于 -80℃ 待检测。采用博奥木华基因的核酸提取或纯化试剂提取胎儿游离 DNA,然后用博奥生物贸易有限公司生产的晶芯胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒进行文库构建,质量检测,最后上机,采用 BioelectronSeq 4000 测序仪进行测序,获得不低于 4 M 的 Useable reads(实际检测的有用数据)。使用博奥木华基因有限公司的无创产前数据分析管理软件针对比对结果进行每条染色体序列个数统计。采用生物信息学对数据进行分析,计算 Z 值,利用 Z 值来评估胎儿患病风险(cut-off: $|Z| = 3$)。按照公式计算出每个染色体的 Z 值,将 $|Z| = 3$ 作为切割值,若 $Z \geq 3$ 时,则该染色体可能是三倍体, $Z \leq -3$ 代表该染色体可能是单倍体或者存在缺失。对 NIPT 高风险孕妇建议行介入性产前诊断及胎儿染色体核型分析。

1.3.2 结果验证及随访 对检测结果为高风险的孕妇,建议进一步行羊水穿刺、脐带血穿刺染色体核型分析。对检测结果为低风险的孕妇进行生育前后随访。

1.4 统计学处理 统计学处理采用 SPSS22.0 进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用描述性分析,以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 247 例 NIPT 检测的孕妇信息分析结果 3 247 例选择 NIPT 的孕妇,包括高龄(预产年龄 ≥ 35 岁)妊娠 1 727 例(53.19%);血清学筛查高风险或临界风险 1 004 例(30.92%);B 超结果显示异常 134 例(4.13%),包括早孕胎儿颈部透明度(NT)增厚($NT > 2.5$ mm)、单脐动脉、心室强光斑、双肾盂分离等;错过筛查时机 21 例(0.65%);孕妇自愿要求 39 例(1.20%);其他如存在不良孕产史、介入性手术禁忌证等 322 例(9.92%)。

2.2 NIPT 检测结果 3 247 例标本中检出高风险 34 例,异常率为 1.05%(34/3 247),其中 21-三体高风险 21 例(0.65%,21/3 247),18-三体高风险 7 例(0.22%,7/3 247),13-三体高风险 6 例(0.18%,6/3 247)。22 例高风险标本经羊水、脐静脉血细胞培养核型分析验证,15 例 21-三体高风险中 11 例与核型分析相符,4 例假阳性,阳性符合率 73.33%;4 例 18-三体高风险中 4 例均与核型分析相符,阳性符合率 100.00%;3 例 13-三体高风险中 2 例与核型分析相符,1 例假阳性,阳性符合率 66.67%。3 247 例标本随访无 21、18、13-三体假阴性,漏诊率为 0。拒绝做产前诊断细胞染色体核型分析 12 例,其中 3 例失访;7 例经 B 超确诊 2 例为死胎,5 例胎儿畸形,已终止妊

娠;1 例未做产前诊断引产;1 例活产先天性心脏病, 脐血核型分析及妊娠随访结果见表 1~3。
婴儿染色体未知。21、18、13-三体高风险异常者羊水/

表 1 21-三体高风险异常者羊水/脐血核型分析及妊娠随访

NIPT Z 值	NIPT 判断	羊水/脐血核型	妊娠结局
T21:16.120	21-三体高风险	47,XN,+21	未接电话,拒绝回访
T21:14.197	21-三体高风险	47,XN,+21	死胎,女
T21:19.085	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:24.321	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:25.117	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:35.060	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:20.631	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:20.867	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:23.896	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:29.019	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:8.778	21-三体高风险	47,XN,+21	终止妊娠
T21:3.894	21-三体高风险	46,XN,1qh+	活产 1 女婴,未见异常
T21:3.820	21-三体高风险	46,XN	活产 1 男婴,未见异常
T21:3.319	21-三体高风险	46,XN	活产 1 男婴,未见异常
T21:4.005	21-三体高风险	46,XN	活产 1 男婴,未见异常
T21:10.017	21-三体高风险	拒绝检查	死胎,男
T21:19.078	21-三体高风险	拒绝检查	未做产前诊断终止妊娠
T21:21.125	21-三体高风险	拒绝检查	B 超显示心脏畸形,已经引产
T21:22.541	21-三体高风险	拒绝检查	活产 1 女婴先天性心脏病
T21:9.296	21-三体高风险	拒绝检查	未接电话,拒绝回访
T21:14.868	21-三体高风险	拒绝检查	未接电话,拒绝回访

注明:表中的 N 为性染色体 X 或者 Y 的代写,因为产前诊断结果不允许填写性别

表 2 18-三体高风险异常者羊水/脐血核型分析及妊娠随访

NIPT Z 值	NIPT 判断	羊水/脐血核型	妊娠结局
T18:10.759	18-三体高风险	47,XN,+18	终止妊娠
T18:22.892	18-三体高风险	47,XN,+18	终止妊娠
T18:15.311	18-三体高风险	47,XN,+18	终止妊娠
T18:22.662	18-三体高风险	47,XN,+18	终止妊娠
T18:5.193	18-三体高风险	拒绝检查	B 超显示心脏畸形,已经引产
T18:18.023	18-三体高风险	拒绝检查	B 超显示畸形,已经引产
T18:22.227	18-三体高风险	拒绝检查	死胎已经引产

注明:表中的 N 为性染色体 X 或者 Y 的代写,因为产前诊断结果不允许填写性别

表 3 13-三体高风险异常者羊水/脐血核型分析及妊娠随访

NIPT Z 值	NIPT 判断	羊水/脐血核型	妊娠结局
T13:26.828	13-三体高风险	47,XN,+13	终止妊娠
T13:29.233	13-三体高风险	47,XN,+13	终止妊娠
T13:7.587	13-三体高风险	未见异常	未接电话,拒绝回访
T13:22.212	13-三体高风险	拒绝检查	B 超显示畸形,已经引产
T13:26.741	13-三体高风险	拒绝检查	B 超显示多发畸形,已经引产
T13:10.111	13-三体高风险	拒绝检查	未接电话,拒绝回访

注明:表中的 N 为性染色体 X 或者 Y 的代写,因为产前诊断结果不允许填写性别

3 讨 论 诊断,其中 11 例产前诊断结果与 NIPT 结果相符合, 本研究 21 例 21-三体高风险有 15 例进行产前 有 4 例假阳性,拒绝产前诊断的 6 例孕妇有 2 例 B 超

均发现不同程度的胎儿畸形,1 例死胎。7 例 18-三体高风险中有 4 例行产前诊断,结果相符合,拒绝产前诊断的 3 例孕妇有 2 例 B 超均发现不同程度的胎儿畸形,1 例死胎。虽然胎儿畸形和死胎不一定是 21、18、13-三体综合征引起,据文献报道表明 21、18、13-三体胎儿会有不同程度的胎儿畸形甚至引起宫内死胎^[7-8],因此与临床症状还是相符合的。6 例 13-三体高风险中有 3 例进行产前诊断,其中有 2 例与产前诊断结果相符合,1 例不符合,拒绝产前诊断的孕妇有 2 例 B 超发现胎儿畸形,与临床相符合。4 例 21-三体高风险及 1 例 13-三体高风险假阳性原因可能与手工柱式法提取胎儿 DNA 纯度有关,经再次重做采用全自动核酸提取仪提取胎儿 DNA,胎儿 DNA 浓度纯度提高,改进建库方法后 NIPT 的 Z 值均不大于 3,第一次建库的数据偏高可能是实验手工操作误差引起,或者是测序和数据分析存在随机误差。另外引起假阳性的原因还可能有母体基因组中拷贝数变异、限制性胎盘嵌合、母体染色体嵌合、双胎之中一胎停育、母体存在恶性肿瘤^[9]。

3 247 例标本产后随访均无 21、18、13-三体假阴性,说明该方法对阴性标本检测的阳性符合率高。在年龄 ≤ 35 岁的孕妇中,我国推行孕早期及孕中期产前筛查-产前诊断模式,本研究中有 30.92% 的孕妇因为传统血清学筛查高风险及临界风险做 NIPT 检测,通过 NIPT 及有创性产前诊断及跟踪随访发现,传统血清学筛查假阳性率高,特异度差^[2]。NIPT 筛查阳性的孕妇因羊水及脐带血产前诊断具有有创性及风险性,因此,少数孕妇不容易接受侵入性的产前诊断^[10]。可见,虽然无创产前基因检查较传统的血清学筛查及核型分析有其明显的优势,但其也有不可避免的缺陷^[11],如:不适用于孕妇本身为染色体异常的孕妇;筛查仅针对 21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征,无法准确检测缺失、易位、倒位等染色体结构异常,且对于部分嵌合体,深度测序仍存在难度;孕妇游离胎儿 DNA 水平低于检出量时,会降低检测的特异度、灵敏度和准确性。我国现行的《孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断技术规范》^[12] 也指出:根据目前技术发展水平,高通量基因测序技术在产前筛查与诊断领域适用的目标疾病为常见胎儿染色体非整倍体异常(即 21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征),而并未将性染色体及除外 21、18、13-三体以外的其他常染色体纳入目标疾病。同样,美国妇产科医师学会(ACOG)、美国医学遗传学与基因组学学

会(ACMG)等多个组织机构已发表声明,一致认为目前无创产前基因检测检测疾病种类有限,只能作为一种筛查方法,不能代替传统的诊断金标准——染色体核型分析方法,但可以作为诊断方法的有益补充。随着高通量测序技术的不断发展与更新,胎儿染色体非整倍体基因检测在临床的应用将会更加广泛。

参考文献

- [1] 马婷婷,刘华平,侯朝晖,等. 无创 DNA 检测技术对胎儿染色体非整倍体疾病的筛查效果[J]. 空军医学杂志, 2015,31(4):235-239.
- [2] 李龙,朱宝生. 对孕中期妇女血清二联指标筛查唐氏综合征的 Meta 分析[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(4):887-890.
- [3] 吴晓霞,袁晖,罗彩群,等. 产前诊断相关胎儿丢失及其危险因素分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2016,33(3):75-76.
- [4] TANEJA P A, PROSEN T L, DE FEO E, et al. Fetal aneuploidy screening with cell-free DNA in late gestation[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017,30(3):338-342.
- [5] HUDECOVA I, CHIU R W. Non-invasive prenatal diagnosis of thalassemias using maternal plasma cell free DNA [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39(2): 63-73.
- [6] SHAW S W, HSIAO C H, CHEN C Y, et al. Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies: a multicenter prospective cohort trial in Taiwan[J]. Fetal Diagn Ther, 2014,35(1):13-17.
- [7] 黄欢,黎新艳,路婧,等. 13、18 及 21-三体综合征胎儿产前超声表现对比分析[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(17): 4199-4202.
- [8] 韩璐,于华,荆春丽,等. 18-三体综合征胎儿产前超声表现分析[J]. 现代仪器与医疗, 2015,21(1):17-19.
- [9] 刘俊涛. NIPT 用于产前胎儿常见染色体非整倍体筛查的相关问题[J]. 实用妇产科杂志, 2018,34(11):814-816.
- [10] 侯亚萍,杨洁霞,郭芳芳,等. 无创 DNA 产前检测在胎儿染色体非整倍体疾病筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2018,15(11):1542-1548.
- [11] 谭虎,邬玲仟. 无创基因检测的临床应用现状及问题[J]. 临床检验杂志, 2018,36(11):801-804.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会办公室. 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[A/OL]. (2016-10-27) [2018-11-09]. <http://www.nhfpc.gov.cn/fys/s3581/201611/Oe6fe5bac1664ebda8bc28adOed68389.shtml>.

(收稿日期:2018-12-05 修回日期:2019-01-23)