

• 论 著 •

血浆胎儿游离 DNA 在高龄孕妇唐氏综合征筛查中的价值*

左 晶

(南大港医院检验科,河北沧州 061103)

摘要:目的 探讨血浆胎儿游离 DNA(cffDNA)在高龄孕中期唐氏综合征(DS)产前筛查(唐筛)中的应用价值。方法 收集 2012 年 2 月至 2014 年 5 月在该院建卡产检并进行血清学筛查和胎儿游离 DNA 高通量基因测序技术产前诊断的高龄孕妇 398 例作为研究对象,以羊水/脐血穿刺细胞核型分析为准,比较传统血清学筛查与高通量无创 DNA 检测方法应用于高龄孕中期唐筛效率,评价其检测灵敏度和特异度。结果 血清学筛查出高风险孕妇 26 例(阳性率 8.7%),其中 DS 高风险(21-三体)孕妇 20 例(唐筛阳性率 6.7%),18-三体 5 例(1.7%),13-三体 2 例(0.7%)。无创 DNA 检测出高风险孕妇 9 例(阳性率 3%),均在血清学筛查出的高风险孕妇范围之内,其中 21-三体 6 例(2%),18-三体 3 例(1%)。高风险孕妇羊水/脐血穿刺细胞核型分析 21-三体 5 例(1.7%),18-三体阳性 2 例(0.7%),正常 2 例(0.7%)。血清学筛查灵敏度、特异度和准确度分别为 100.0%、93.3%和 94.9%,无创 DNA 检测灵敏度、特异度和准确度分别为 100.0%、97.9%和 99.6%。两种检查方法的总阳性率、唐筛阳性率、唐筛假阳性率、特异度、准确度及阳性预测值比较,差异均有统计学差异($P < 0.05$)。结论 运用无创 DNA 检测技术分析 cffDNA 对高龄孕妇 DS 筛查具有较高的灵敏度、特异度和准确度,值得临床推广。

关键词:胎儿游离 DNA; 唐氏综合征; 产前筛查; 高龄孕妇; 血清学筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)23-3259-03

The value of plasma fetal free DNA in the screening of Down syndrome in pregnant women of advanced maternal age*

ZUO Jing

(Department of Laboratory Medicine, Nandagang Hospital, Cangzhou, Hebei 061103, China)

Abstract: Objective To investigate the value of plasma fetal free DNA in the screening of Down syndrome in pregnant women of advanced maternal age. **Methods** 298 cases of pregnant women of advanced maternal age in our hospital from February 2012 to May 2014 were chosen as the research object, who experienced prenatal serological screening and fetal free DNA detection by high-throughput gene sequencing technology. According to the karyotype analysis of amniotic fluid/umbilical cord blood puncture, we compared the detection efficiency of traditional serological screening and high-throughput noninvasive DNA detection for prenatal Down's syndrome screening in pregnant women of advanced maternal age, and evaluated their sensitivity and specificity. **Results** 26 cases of high risk pregnant women were screened by using serological methods (positive rate was 8.7%). Among them, we found 20 cases of high risk pregnant women with Down syndrome (21-trisomy) (Tang screening positive rate was 6.7%), and 5 cases of 18-trisomy syndrome (1.7%) and 2 cases of 13-trisomy syndrome (0.7%). 9 cases of high risk pregnant women (positive rate was 8.7%) was detected with noninvasive DNA technology, all within the range of serological screening results (positive rate was 3%). Among them, there were 6 cases of high risk 21-trisomy (positive rate was 2%), and 3 cases of high risk 18-trisomy (1%). High risk pregnant women were further verified by amniotic fluid/umbilical cord blood cell karyotype analysis. The results showed that there were 5 cases of 21-trisomy positive (1.7%), 2 cases of 18-trisomy positive (0.7%), and 2 cases were normal (0.7%). The sensitivity, specificity and accuracy of serological screening were 100%, 93.3% and 94.9% respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of noninvasive DNA detection were 100%, 97.9% and 99.6% respectively. There were statistically significant differences on the total positive rate, Tang screen positive rate, Tang screening false positive rate, specificity and positive predictive value between the two methods ($P < 0.05$). **Conclusion** Analysis of cffDNA using noninvasive DNA detection technique has a high sensitivity, specificity and accuracy for DS screening in elderly patients, and deserves clinical promotion.

Key words: Fetal free DNA; down syndrome; prenatal screening; serological screening; advanced maternal age

近年来,随着孕妇年龄的增加,胎儿出现染色体病的概率也随之增加,如 21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征、Turner 综合征等,其中 21-三体综合征,即唐氏综合征(DS)的发病率最高^[1]。因此在产前对高龄孕妇进行 DS 筛查(又称唐氏筛查或唐筛),对于控制我国 DS 患儿的数量具有重要意义。以往,我国医院主要通过侵入性羊水/脐血穿刺核型等测

定来进行 DS 的诊断,但是侵入性穿刺容易引起出血或感染,从而出现一定的流产或畸形风险^[2]。所以,寻找一种新的无创性产前遗传学诊断方法尤为重要。孕妇血浆胎儿游离 DNA(cffDNA)的发现及二代测序技术的成熟为无创性产前诊断的研究和应用开辟了一条新的道路。近期有研究证实,采用第二代测序技术对 cffDNA 进行无创染色体非整倍体检测,对 21、

* 基金项目:沧州市科技计划项目(162302027)。

作者简介:左晶,女,主管检验师,主要从事血液学检测方向研究。

13、18 三体综合征检测有高度的灵敏度和特异度^[3],在产前唐筛方面具有非常好的应用前景,但是在我国尚未广泛应用。本课题组收集 2012 年 2 月至 2014 年 5 月在本院建卡产检,并同时进行血清学筛查和胎儿游离 DNA 高通量基因测序技术产前诊断的高龄孕妇 298 例作为研究对象,比较传统血清学筛查与高通量无创 DNA 检测方法应用于高龄孕妇孕中期唐筛的检测效率,评价其检测灵敏度和特异度,并探讨血浆 cfDNA 在高龄孕中期唐筛中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 2 月至 2014 年 5 月在本院建卡产检,并同时进行血清学筛查和胎儿游离 DNA 高通量基因测序技术产前诊断的高龄孕妇 298 例。孕妇年龄 35~48 岁,平均年龄(39.7±4.1)岁,孕周 12~24 周,平均孕周(17.2±2.4)周。纳入标准:(1)孕周≥12 周;(2)单胎妊娠;(3)孕妇知情同意,并签署知情同意书。排除标准:(1)孕妇本人存在染色体异常;(2)多胎妊娠;(3)接受过移植手术、异体输血、干细胞治疗等治疗。

1.2 仪器与试剂 Hiseq2000 测序仪(美国 illumina 公司);全自动型时间分辨荧光免疫检测分析仪(auto DELFIA1235,美国 Perkin Elmer 公司);全自动染色体核型分析系统(法国 IM-STAR 公司)仪器配套试剂均在有效期内,仪器和试剂质控均合格。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 按标准外周血采集流程采集孕妇静脉血 8 mL,并分装两管,每管 4 mL。其中一管常规分离血清,冻存于-20℃待测。另一管添加有 EDTA 抗凝剂,常规分离血浆后,-80℃冻存待测。

1.3.2 血清学筛查 取出冻存样本,按标准操作程序(SOP 文件),采用全自动型时间分辨荧光免疫检测分析仪对血清甲

胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)进行检测,同时将孕妇的年龄、体质量、孕周、甲亢、血清学数据(AFP、β-HCG)以及妊娠并发症等数据输入到产前唐筛专用分析软件中进行分析计算,预估胎儿罹患 DS 的风险系数。

1.3.3 无创 DNA 检测 血样于 1 周内送往北京贝瑞和康生物技术有限公司按 SOP 文件,采用 12-plex 高通量 Hiseq2000 平台(ILLumina 公司的二代高通量测序技术)进行检测^[4]。

1.3.4 染色体核型分析 按 SOP 文件,采用全自动染色体核型分析系统对高风险的孕妇进行羊水细胞或脐静脉血染色体核形分析,胎儿染色体核型分析阳性作为金标准。

1.4 统计学处理 所有实验数据采用 Excel2010 和 SPSS 17.0 进行统计分析。计数资料用百分率(%)表示,采用 χ² 检验进行比较,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清学筛查 高风险孕妇 26 例,筛查阳性率 8.7%(26/298)。其中 DS 高风险孕妇 20 例,唐筛阳性率 6.7%(20/298),18-三体 5 例(1.7%),13-三体 2 例(0.7%)。

2.2 无创 DNA 检测 高风险孕妇 9 例,筛查阳性率 3%(9/298)。其中 DS 高风险者 6 例,唐筛阳性率 2%(6/298),18-三体高风险者 3 例(1%)。

2.3 羊水/脐血穿刺细胞核型分析 核型分析结果证实 DS 阳性 5 例(1.7%),18-三体阳性 2 例(0.7%),2 例结果正常。血清学筛查其灵敏度、特异度和准确度分别为 100.0%、93.3%(278/298)和 94.9%(283/298),无创 DNA 检测灵敏度、特异度和准确度分别为 100.0%、97.9%(292/298)和 99.6%(297/298)。两种检查方法的总阳性率、唐筛阳性率、唐筛假阳性率、特异度、准确度以及阳性预测值均有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两种方法筛查 DS 效果比较(%)

方法	总阳性率	唐筛阳性率	唐筛假阳性率	灵敏度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值
血清学筛查	8.7	6.7	5.00	100.0	93.3	94.9	25.0	100.0
无创 DNA 检测	3.0	2.0	0.01	100.0	97.9	99.6	83.0	100.0
P	<0.05	<0.05	<0.01	—	<0.05	<0.05	<0.01	—

注:“—”表示该项无数据。

3 讨论

DS 是最常见的染色体非整倍体疾病^[5],是当今世界范围发病率较高的新生儿严重缺陷病之一,主要特征是严重的先天智力障碍、特殊面容及各种先天畸形^[6],给患者家庭和社会带来了巨大的经济负担。高龄孕妇是指预产期年龄大于或等于 35 周岁的孕妇。一般女性 35 岁后,机体功能开始呈现下降趋势,发生胎儿畸形的概率明显增加,DS 的发病率也会随之不断增加^[7]。因此,做好高龄孕妇产前检测,特别是唐筛,具有十分重要的意义。目前临床上常用绒毛活检、羊膜腔穿刺获得标本进行产前筛查诊断,但是这些侵入性操作,往往会增加孕妇流产或感染的风险,因此,寻找一种能够在产前精确筛查 DS 的手段十分必要。

自 1997 年,Lo 等^[8]首先报道孕妇血中存在 cfDNA 以来,关于 cfDNA 应用于非侵入性产前诊断(NIPD)的报道就越来越多。特别是进入 21 世纪以后,与二代测序技术结合更是为 NIPD 的发展开启了新的篇章。许多研究表明,基于二代测序

技术的无创 DNA 检测,在筛查胎儿非整倍体疾病方面,尤其是在 DS 筛查方面具有极高的灵敏度和特异度^[9-12],但是关于其在高龄产妇的产前筛查中研究较少,而且在国内应用也尚不广泛,仍需大量临床数据来支持其临床筛查手段的可靠性。

Dan 等^[14]在 2012 年通过对 11 105 例孕妇进行 cfDNA 高通量测序分析发现其灵敏度为 100.00%,特异度为 99.96%,验证了高通量基因测序技术对于检测 DS 和 18-三体具有高灵敏度和特异度。侯朝晖等^[15]通过对比血清学筛查(DS 高危孕妇 22 例、阳性率为 4.4%,假阳性率 4.2%)和无创 DNA 检测结果(DS 阳性孕妇 3 例,阳性率为 0.6%,DS 检出率为 100%),进一步验证了无创 DNA 检测的可靠性。本课题组将研究对象范围缩小到高龄孕妇,通过对比传统血清学筛查和无创 DNA 检测结果,验证两种检测方法在高龄孕妇唐氏筛查中的检测效率和准确性。结果发现,血清学筛查 DS 高风险孕妇 20 例,唐筛阳性率为 6.7%(20/298),假阳性率为 5%(15/298)。而无创 DNA 检测出 21-三体高风险者 6 例,唐筛

阳性率为 2% (6/298), 假阳性率为 0.01% (1/298)。从结果可以看到血清学筛查假阳性率明显高于无创 DNA 检测, 说明其特异度和准确度低于无创 DNA 检测, 容易造成误诊, 而较高的假阳性结果不仅会造成较多的孕妇接受不必要的侵入性产前诊断, 还会造成部分胎儿流产^[13]。相比于传统的血清学筛查手段来说, 无创 DNA 检测特异度及准确度几乎均达到 100.0%, 证明其是高龄孕妇 DS 筛查的一个新型手段, 具有极高的可靠性和可行性。当然, 也有学者运用高通量基因测序技术在检测胎儿性染色体非整倍体时发现, 5 540 例孕妇中有 10 例异常, G 带核型分析有 6 例异常, 发生率为 0.11%, 二者的符合率为 60.0% (6/10), 因此对于性染色体非整倍体胎儿行高通量测序也存在一定假阳性和局限^[16]。

综上所述, 相对于常用的血清学筛查方法, 运用高通量测序技术检测孕妇血浆中 cfDNA, 在特异度和准确度方面均具有明显优势, 能够使更多孕妇避免侵入性有创产前诊断, 也减少了孕妇感染或早产的风险。相信随着高通量测序的普及和推广, 无创 DNA 检测将会成为包括高龄产妇在内的所有孕妇产前胎儿筛查的主流检测手段。

参考文献

[1] Li SW, Barrett AN, Gole L, et al. The assessment of combined first trimester screening in women of advanced maternal age in an Asian cohort[J]. Singapore Med J, 2015, 56(1):47-52.

[2] Miao ZY, Liu X, Shi TK, et al. First trimester and second-trimester integrated screening for Down's syndrome[J]. Zhonghua YiXue Za Zhi, 2011, 91(3):185-188.

[3] Drury S, Hill M, Chitty LS. Cell-free fetal DNA testing for prenatal diagnosis[J]. Adv Clin Chem, 2016, 76(12):1-35.

[4] 张姣. 高龄孕妇唐氏综合征筛查新策略的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.

[5] Crostelli M, Mariani M, Mazza O, et al. Cervical fixation in the pediatric patient; our experience[J]. Eur Spine J, 2009, 18(2):20-28.

[6] Mendioroz M, Do C, Jiang X, et al. Trans effects of chromosome aneuploidies on DNA methylation patterns in human Down syndrome and mouse models[J]. Genome Biol, 2015, 16(9):263-267.

[7] 黄金林. 妊娠中期唐氏筛查结果及产前诊断与妊娠结局分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(12):2982-2983.

[8] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum; implications for noninvasive prenatal diagnosis [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4):768-775.

[9] Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA [J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 211(4):365.

[10] Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation [J]. Clin Chim Acta, 2014, 428(2):44-50.

[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.

[12] Huang X, Zheng J, Chen M, et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies [J]. Prenat Diagn, 2014, 34(4):335-340.

[13] 杨小凤, 王雅莉, 徐括琴, 等. 胎儿游离 DNA 高通量基因测序技术在产前诊断中的临床价值[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(4):577-580.

[14] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11, 105 pregnancies with mixed risk factors [J]. Prenat Diagn, 2012, 32(13):1225-1232.

[15] 侯朝晖, 刘华平, 陈冰, 等. 无创 DNA 检测在唐氏综合征产前筛查中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(8):1508-1510.

[16] 林颖, 蒋馥蔓, 秦岭, 等. 孕妇血浆游离 DNA 高通量测序用于胎儿性染色体非整倍体检测的初步探讨[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(6):406-408.

(收稿日期:2017-06-21 修回日期:2017-09-19)

(上接第 3258 页)

[14] 张岱, 王念跃, 赵伟, 等. 血清 HBV 外膜大蛋白评估乙型肝炎感染的价值[J]. 江苏医药, 2011, 37(11):1282-1284.

[15] 刘键, 蒋英, 吴正林, 等. 乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒外膜大蛋白 LHBs 的检测分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(5):607-609.

[16] Zhang ZM, Ji BY, Li L. Effect of entecavir combined with a-2b interferon on treatment of chronic hepatitis B [J]. J Bengbu Med Coll, 2014, 39(5):621-623.

[17] Deng YC, Li MX, Bao W, et al. The relationship of course and re-currence after norms antiviral treatment for patients with chronic hepatitis B [J]. China Modern Doctors, 2014, 52(25):117-118, 121.

[18] Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):426-439.

[19] Lamblber C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins [J]. J Gen Virol, 2010, 85(5):1221-1225.

[20] Chai N, Gudima S, Chang J, et al. Immunodhesins containing pre S domains of hepatitis B virus large envelope protein are secreted and inhibit virus infection [J]. J Virol, 2007, 81(10):4912-4915.

(收稿日期:2017-06-18 修回日期:2017-08-02)