

无创产前筛查阳性病例回顾性研究*

宋春林, 陈淑芬, 周 成, 何云英, 伍秋艳
(佛山市妇幼保健院, 广东佛山 528000)

摘要:目的 探讨基于胎儿游离 DNA 高通量测序的无创产前检测技术在染色体非整倍体检测中的应用价值。方法 选取 2015 年 4 月至 2018 年 6 月佛山市妇幼保健院行无创产前检测 20 811 例, 对无创检测结果异常的孕妇建议介入性产前诊断和核型分析或基因芯片检测。结果 检出 21/18/13 三大染色体高风险 130 例(0.62%), 性染色体异常 111 例(0.53%), 其他常染色体异常 73 例(0.35%), 总检出率 1.51%(314/20 811)。231 人在知情同意下行介入产前诊断, 21/18/13 三体阳性预测值分别为 81.43%、76.92%、41.67%, 性染色体和其他常染色体阳性预测值为 60.26%、17.78%。结论 无创产前检测技术对于 21/18/13 和性染色体有较高的检出率和阳性预测值, 被高龄和辅助生殖技术孕妇广泛接受, 具有良好的临床应用前景。

关键词:胎儿游离 DNA; 高通量测序; 限制性胎盘嵌合; 辅助生殖技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.011

中图法分类号:R714.5

文章编号:1673-4130(2019)07-0810-04

文献标识码:A

Retrospective study of non-invasive prenatal screening positive cases*

SONG Chunlin, CHEN Shufen, ZHOU Cheng, HE Yunying, WU Qiuyan

(Foshan Maternal and Child Health Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: **Objective** To explore the application value of non-invasive prenatal testing technology based on high-throughput sequencing of cell-free fetal DNA (cffDNA) in aneuploidy detection. **Methods** From April 2015 to June 2018, 20 811 non-invasive prenatal tests were performed in the Foshan Maternal and Child Health Hospital. Interventional prenatal diagnosis, karyotype analysis or gene chip detection was recommended for pregnant women with abnormal non-invasive results. **Results** The high risk of 21/18/13 chromosomes was detected in 130 cases (0.62%), 111 cases of sex chromosome abnormality (0.53%), and 73 cases of other autosomal abnormalities (0.35%). The total detection rate was 1.51% (314/20 811). 231 people were involved in prenatal diagnosis. The 21/18/13 trisomy positive predictive values were 81.43%, 76.92%, and 41.67%, respectively, and the sex chromosome and other autosomal positive predictive values were 60.26% and 17.78%. **Conclusion** Non-invasive prenatal testing technology has a high detection rate and positive predictive value for 21/18/13 and sex chromosomes. It is widely accepted by pregnant women with advanced age and assisted reproductive technology, and has good clinical application prospects.

Key words: cell-free fetal DNA; high-throughput sequencing; confined placental mosaicism; assisted reproductive technology

染色体非整倍体疾病是胎儿畸形中较为常见的疾病, 在美国发生率为 1/160^[1], 在中国的发生比例更是高达 1/60^[2]。常见的如 21/18/13 和性染色体三倍体或单倍体, 特别是 21 三体综合征(唐氏综合征)发生比例大概为 1/750, 在高龄孕妇中发生概率更高。罹患胎儿会给家庭和社会带来较重的经济和精神负担。临床尚无有效治疗措施, 只能依靠产前早期检查来避免。其中, 介入性产前诊断准确度高, 但有 1% 左右的流产或感染风险。传统的血清学筛查假阳性和

漏诊率较高^[3]。基于孕妇血浆中胎儿游离 DNA 高通量测序的无创产前检测技术已广泛应用于三大染色体(21/18/13)的三体检测^[4]。但根据介入产前诊断的核型结果, 有文献报道其假阳性较高, 尤其是性染色体的阳性预测值偏低^[5]。本研究回顾分析佛山地区 20 811 例无创产前检测与介入性产前诊断的随访结果, 探讨该技术的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾分析 2015 年 4 月至 2018 年 6

* 基金项目: 佛山市医学类科技攻关项目(2016AB002301)。

作者简介: 宋春林, 男, 副主任技师, 主要从事产前基因诊断研究。

本文引用格式: 宋春林, 陈淑芬, 周成, 等. 无创产前筛查阳性病例回顾性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(7): 810-813.

月期间在佛山市妇幼保健院产科门诊就诊经过遗传咨询和知情同意,自愿选择无创产前检测的孕妇。本研究经过伦理委员会批准。

1.2 血浆分离 采用 Cell free DNA BCT 管(Streck 抗凝管)收集孕妇外周抗凝全血 10 mL,4 ℃ 1 600×g 离心 10 min 分离血浆。要求无明显溶血、凝血。

1.3 胎儿游离 DNA 提取 采用磁珠法分离胎儿游离 DNA,使用 Qubit 核酸定量分析仪检测 DNA 浓度。浓度应在 0.05~0.70 ng/mL 内。否则通知孕妇重新采血。

1.4 建库与测序 采用 EZ-PALO 快速建库法,并在 ABI Step one plus 扩增仪上进行 QC 检测建库浓度和质量,若 QC 不合格应重做。根据建库浓度 Pooling,混合在 CN500 测序平台进行单端 36+8(index) bp 测序。

1.5 数据分析 参照人类基因组 hg19 和各条染色体的比例均值与标准差,经 GC 校正,计算各条染色体的 Z 值。21/18/13 三大染色体 Z 值超过 3 为异常。性染色体通过 XY 的 Z 值散点图判断结果。其他染色体以 Z 值超过 5 为异常。计算胎儿 DNA 含量,要求在 4% 以上。

1.6 介入性产前诊断 无创产前基因检测异常的,给予遗传咨询,建议羊水穿刺后行 G 带染色核型分析或荧光原位杂交(FISH)或基因芯片确诊。其他常染色体异常的采用高通量测序染色体畸变检测 100 kb 的微重复微缺失。

1.7 胎盘嵌合体分析 胎盘娩出后立即分别在脐带中段、脐带根部、胎盘中心、母亲面胎盘中心、母亲面胎盘边缘五个地方各取两个黄豆大的组织共 10 个样本行高通量测序拷贝数变异(CNV)检测。

1.8 随访 对于无创产前基因检测提示低风险的,定期电话随访至分娩后 12 周。对于高风险的,追踪是否进行介入性产前诊断及结果。

2 结 果

2.1 临床资料分析 总共有 20 811 位孕妇在知情选择下行无创产前基因检测,年龄 17~50 周岁,平均 31.40 周岁,孕周 12~27 周,平均 16.53 周,高龄孕妇占 39.2%(8 158/20 811)。辅助生殖技术孕妇占 9.3%(1 935/20 811)。

2.2 无创产前检测结果 在这 20 811 例无创产前检测结果中,提示异常的总共有 314 例(1.51%)。其中 21/18/13 三大染色体结果提示异常的有 130 例,性染色体结果提示异常的有 111 例(0.53%),其他染色体结果提示异常的有 73 例(0.35%)。结果见表 1。

2.3 随访情况 在这 314 例无创产前检测结果提示异常中,研究者做到了 100%随访并提供遗传咨询,但有 12 例拒绝随访,有 10 例在随访时回答已胎死宫内或直接在外院引产但未做尸检。另有 61 例拒绝进一步的介入产前诊断并继续妊娠,大多数为性染色体异

常和其他常染色体异常。

表 1 20 811 例无创产前检测结果(n)

项目	13 三体	18 三体	21 三体	常染色体	性染色体
高风险	15	29	86	73	111
真阳性	5	20	57	8	47
假阳性	7	6	13	37	31
未核实	3	3	16	28	33
假阴性	0	2	0	0	0

2.4 进一步验证 231 例在知情同意下行羊水穿刺或脐血穿刺后进行染色体核型分析或高通量测序染色体畸变检测拷贝数变异,部分加做了 FISH 检测,极少数在外院以染色体微阵列芯片(CMA)分析或快速荧光扩增(Qf-PCR)验证。其中 136 例的无创产前检测结果与介入性产前诊断结果一致并选择了引产,有 1 例行介入性产前诊断核型分析确诊为 21 三体综合征但孕妇选择继续妊娠并顺产分娩,见图 1。而无创产前检测与介入性产前诊断结果不一致的有 94 例,主要为性染色体和除三大染色体以外的常染色体异常。



图 1 无创 21 三体高风险行羊水穿刺培养染色体核型为 47XY+21

2.5 检出率和阳性预测值分析 231 人在知情同意下行介入性产前诊断,21/18/13 三体阳性预测值分别为 81.43%、76.92%、41.67%,性染色体阳性预测值为 60.26%、其他常染色体阳性预测值为 17.78%。其中 21/18 三体和性染色体异常的阳性预测值和检出率较高。见表 2。

表 2 三体检出率和阳性预测值(%)

项目	13 三体	18 三体	21 三体	常染色体	性染色体
阳性检出率	100.00	90.91	100.00	100.00	100.00
阳性预测值	41.67	76.92	81.43	17.78	60.26

2.6 不一致的情况 26 例 21/18/13 三大染色体结果不一致中,有 10 例在无创产前检测结果直接提示了可能是嵌合体。经过胎盘取材用高通量测序的方

法做拷贝数变异检测鉴定为限制性胎盘嵌合体 (CPM)。出现了 2 例 18 三体假阴性,核型分析结果该胎儿为 18 三体嵌合体,见图 2。性染色体结果不一致主要表现为 ChrX+(Mat)和 ChrX-,见图 3。

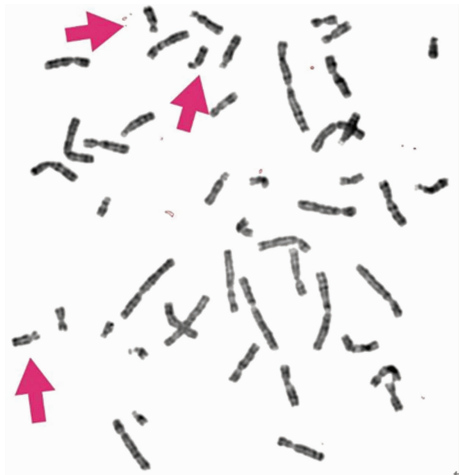


图 2 无创低风险行羊水穿刺培养染色体核型为 47XY+18 嵌合体

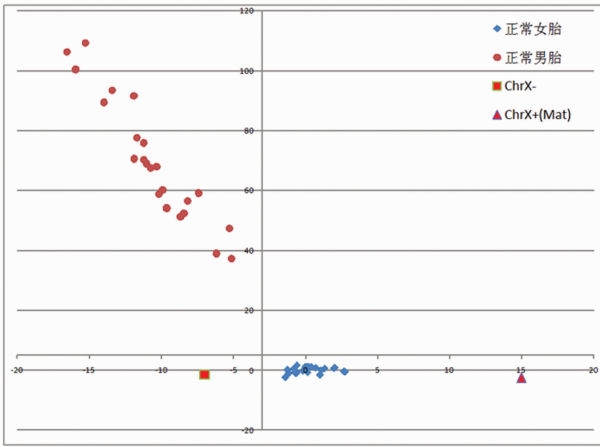


图 3 无创提示性染色体 ChrX+(Mat)和 ChrX-

3 讨 论

先天性胎儿畸形最常见的是染色体非整倍体,患儿多生长发育迟缓、智力障碍、伴多发性结构畸形等^[6]。临床尚无有效治疗措施,产前诊断是避免罹患胎儿出生的最有效措施。介入性产前诊断取得良好成果,近几年畸形胎儿出生率有明显降低,但文献表明有 1%左右的流产或感染风险^[7]。介入性产前诊断需要较长的培养周期,且容易发生优势生长,不利于嵌合体的检测。而传统的血清学筛查技术影响因素多,假阳性较高,大约为 5%,且漏诊率较高^[8],尽管刘春燕等^[9]的研究认为血清学三联筛查可在高龄孕妇中较有效地检出胎儿唐氏综合征,其综合准确率只能达到 70%左右。而且血清学筛查技术只能得出 21 三体和 18 三体的风险值,不能检测 13 三体和性染色体等其他染色体异常。

无创产前检测已广泛应用于三大染色体(21/18/13)的三体检测^[10]。有文献报道其准确率可以达到

99%^[11]。但其假阳性较高,尤其是性染色体的阳性预测值偏低^[12],其他常染色体则鲜见报道。随着无创产前检测技术大规模地应用于临床,以核型分析为金标准,无创产前检测结果的综合阳性预测值较低,由此给临床带来的假阴性和假阳性问题不容忽视^[5]。尽管很多检测机构在进行无创产前检测时已经为孕妇提供了一份保险。但如何降低假阳性、避免假阴性已经成为临床亟待解决的问题。研究者将测序深度加大,采用基于贝瑞和康公司的无创产前检测 plus 技术,可以检测出三大染色体和性染色体共 100 种常见染色体异常。

本研究回顾分析了佛山地区 20 811 例无创产前检测与介入性产前诊断的随访结果,检出 314 例染色体核型异常(占 1.51%),我国的胎儿染色体异常的确远远高于美国的发生率。特别是二胎政策放开后,更多高龄孕妇,包括很多通过辅助生殖技术助孕的,也可能提高了胎儿染色体异常的比例。有 231 例在知情同意下行介入性产前诊断。结果表明 21/18/13 三大染色体和性染色体的检出率和阳性预测值均较高。高龄组占总检测人数的 39.2%,数据表明高龄孕妇倾向于选择无创产前检测技术。辅助生殖技术孕妇占 9.3%,达到 1 935 人次,说明辅助生殖技术的孕妇偏向于选择无创产前检测技术。

对假阳性和假阴性分析。有 10 例在无创结果显示可能为限制性胎盘嵌合体。一例羊水穿刺 Fish 检测发现 10%的 21 三体,核型为 46XN,分娩后胎盘嵌合体分析,发现胎盘母体面为 21 三体,胎盘胎儿面则为 46XY。限制性胎盘嵌合体除了可能导致假阳性,还可能导致假阴性。两例无创结果低风险,但核型分析结果证实胎儿和胎盘均为 18 三体嵌合体。LEBO 等^[13]也发现了嵌合体导致的假阴性。研究者对部分病例做了胎盘嵌合体分析,发现经过细胞培养的染色体核型分析存在某个核型优势生长的现象,与 GRATI 等^[14]的发现一致,一例无创结果为 Chr16+,高通量测序结果为 CNV:47XN+16[35%]/46XN[65%],核型在 110 个细胞发现一个细胞 47XN+16。一例无创结果为 ChrX-,介入性产前诊断高通量测序 CNV 结果为 47XY,但核型分析数了 100 个细胞才发现一个细胞是 47XY,而未经培养 FISH 检测却与 CNV 检测结果一致。1 例无创产前检测提示性染色体异常 ChrX-,CNV 显示为 47XY, FISH 羊水分析提示胎儿为 47XY[55%]46XY[45%]的嵌合体,然而核型结果为正常。1 例无创结果为 ChrX+(Y), FISH 结果为 [99%]47XXY,核型为 47XXY[54%]/46XY[46%],CNV 为 47XXY[50%]/46XY[50%]。说明随着各种检测技术的出现,特别是在嵌合体分析上,核型分析结果不应作为唯一的参考。

传统的核型分析只能检测出大于 10 Mb 的异常。而微重复微缺失检测可以检测到 100 kb 的畸变^[15]。

1 例无创产前检测结果提示 Chr6+, 但核型分析结果正常, 而 CNV 结果 6p12.1q13 区域小片段的重复。研究者发现 2 例孕妇分别在 21q22.3 和 21q22.2 有 3Mb 的微重复导致胎儿无创产前检测结果为 21 三体高风险的假阳性结果。1 例无创结果为 18 三体但脐血穿刺核型结果为 46XN, der(9)t(9;18)(p22;q11.2), 母亲平衡易位 46,t(9;18)(p22;q11.2)。1 例无创产前检测结果为 ChrX+Y(Mat), 羊水 FISH 和核型结果正常, 孕妇核型为 47XXX。说明孕妇染色体异常是无创和介入结果不一致的主要因素。无创产前检测在双胎应用的局限性以往也有报道^[16]。如何消除这些因素的影响, 提高无创产前检测的准确率和阳性预测值是下一步要考虑的。如整合母体血浆测序和母体白细胞测序来提高其准确度^[17]。此外, 由于 X 染色体含有较多的 GC 碱基和失活现象以及与 Y 染色体标记序列的相似性影响了性染色体的检测准确性也是值得注意的^[18]。

4 结 论

本研究表明无创基因产前检测在 21/18/13 染色体检测中有较高的阳性预测值, 且可以发现其他常染色体的异常, 该技术已被广大孕妇特别是通过辅助生殖技术助孕的孕妇接受。部分以核型分析为标准判断无创产前检测结果为假阳性的病例, 通过其他如 FISH、CMA、CNV 新技术检测可能发现胎儿为嵌合体或染色体微重复微缺失, 应予以高度重视。但无创产前检测也存在一定的局限性, 在低比例嵌合体的检测可能受到影响, 也受孕妇染色体异常或孕妇肿瘤等因素的影响。

参考文献

- [1] DRISCOLL DA, GROSS S. Clinical practice, prenatal screening for aneuploidy[J]. N Engl J Med, 2009, 360(24):2556-2562.
- [2] 张月萍, 伍俊萍, 李笑天, 等. 孕中期羊水细胞染色体核型分析及其异常核型发生率的比较[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(9):644-648.
- [3] DEY M, SHARMA S, AGGARWAL S. Prenatal screening methods for aneuploidies[J]. NA mJ Med Sci, 2013, 5(1):182-190.
- [4] KOTSOPOULOU I, PANAGIOTA T P, MAVROMMATIS K, et al. Non-invasive pre-natal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis[J]. Diagnosis, 2015, 2(1):141-158.
- [5] ZHANG B, LU B Y, YU B, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood[J]. J Inter Med Res, 2017, 45(2):621.

- [6] IWARSSON E, KVIST U, HULTÉN M A. Disomy 21 in spermatozoa and the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome[J]. Molecular Cytogenetics, 2015, 8(1):67.
- [7] 罗颖, 鲁婷, 陶靖, 等. 母血游离胎儿 DNA 检测在染色体非整倍体无创产前诊断的应用[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(7):1481-1483.
- [8] WALD N J, RODECK C, HACKSHAW A K. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS)[J]. J Med Screen, 2003, 10(2):56-104.
- [9] 刘春燕, 何斌, 韩代文, 刘之英, 赖怡, 秦利, 袁粒星, 刘珊玲, 王和. 中孕期唐氏综合征血清学筛查在高龄孕妇中的应用价值探讨[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2016, 12(2):159-163.
- [10] ZHANG B, LU B Y, YU B, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood[J]. J Int Med Res, 2017, 45(2):621-630.
- [11] GEKAS J, LANGLOIS S, RAVITSKY V, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosome abnormalities: review of clinical and ethical issues[J]. Appl Clin Genet, 2016, 9(1):15-26.
- [12] PORRECO R P, GARITE T J, MAUREL K, et al. Non-invasive 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):1-12.
- [13] LEBOR V, NOVAK R W, WOLFE K, et al. Discordant circulating fetal DNA and subsequent cytogenetics reveal false negative, placental mosaic, and fetal mosaic cfDNA genotypes[J]. J Trans Med, 2015, 13(1):260.
- [14] GRATI F R. Chromosomal mosaicism in human feto-placental development: implications for prenatal diagnosis[J]. J Clin Med, 2014, 3(3):809-837.
- [15] SNYDER M W, SIMMONS L E, KITZMAN J O, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. [J]. New Engl J Med, 2015, 372(17):1639-1645.
- [16] 王佳燕, 陈敏, 吴莉, 等. 无创产前基因检测双胎 21、18 和 13-三体综合征的应用研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 20(5):497-501.
- [17] DONDORP W, WERT G D, BOMBARD Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening[J]. Europ J Hum Gene, 2015, 23(11):1438-1450.
- [18] CLERC P, AVNER P. Reprogramming X Inactivation [J]. Science, 2000, 290(5496):1518-1519.