

• 论 著 •

染色体微阵列技术在产科和儿科遗传病诊断中的 临床应用价值分析*

田海英¹, 罗真真¹, 汪琳琳¹, 张 红², 刘庆华^{1△}

山东第一医科大学第二附属医院: 1. 检验科; 2. 血液科, 山东泰安 271000

摘 要:目的 探讨染色体微阵列分析技术(CMA)在不同产前诊断指征的孕妇、早产儿、高危儿、先天畸形及不明原因发育迟缓患儿中的临床应用价值。方法 收集 2015 年 2 月至 2020 年 12 月泰安地区 287 例羊水穿刺和流产组织标本, 118 例早产儿、高危儿、先天畸形及不明原因发育迟缓患儿的外周血标本, 并进一步收集其中 25 例患儿父母外周血标本的 CMA 检测结果, 分析检出率。结果 在 287 例产前诊断标本中包括 270 例羊水穿刺标本和 17 例流产组织标本, 共检测出 73 例确诊病例, 异常检出率为 25.4%。其中大片段异常(≥ 10 Mb)确诊病例 59 例, 小片段异常(1~10 Mb)确诊病例 12 例, 检出率为 16.4%, CMA 可检出 2.7%(2/73)的微小片段异常确诊病例。在 118 例患儿外周血标本中, 共检测出 58 例确诊病例, 检出率为 49.15%, 并进一步检测了 25 例患儿父母的外周血标本, 其中 8 例与患儿在相同区域发现染色体异常。结论 CMA 能够提高染色体异常的检出率, 为不明原因的发育迟缓患儿提供明确的病因诊断, 对临床诊断具有重要价值。

关键词: 染色体微阵列技术; 产前诊断; 发育迟缓; 遗传咨询

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.06.014

中图法分类号: R446.1

文章编号: 1673-4130(2022)06-0701-04

文献标志码: A

Clinical application value of chromosome microarray technology analysis in diagnosis of obstetrics and pediatrics genetic disease*

TIAN Haiying¹, LUO Zhenzhen¹, WANG Linlin¹, ZHANG Hong², LIU Qinghua^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: Objective To explore the clinical application value of chromosome microarray analysis (CMA) in different prenatal diagnosis indications of pregnant women, premature infant, high-risk infant, and children with unexplained developmental delay. **Methods** A total of 287 amniocentesis and aborted tissue samples were collected from Taian area between February 2015 and December 2020, peripheral blood samples from 118 premature infants, high-risk infants, congenital malformations and unexplained developmental delay, and 25 children's parents' peripheral blood samples were recruited for the CMA testing and the positive diagnostic rate was analyzed. **Results** Among 287 prenatal specimens, 270 amniotic fluid specimens and 17 abortive tissue specimens were included, a total of 73 confirmed cases of the disease were detected, and the abnormal detection rate was 25.4%. A total of 59 cases with large segment (≥ 10 Mb) were pathogenic among them, 12 cases with small segment (1–10 Mb) were pathogenic among them, with an abnormal detection rate of 16.4%. CMA could detect 2.7% (2/73) cases of tiny fragments abnormality. In 118 cases of pediatric peripheral blood samples, a total of 58 cases were identified as pathogenic cases, the abnormal detection rate was as high as 49.15%, peripheral blood samples from the parents of 25 children were further examined, eight of them were found to have chromosomal abnormalities in the same area as the children. **Conclusion** CMA technique can improve the detection rate of chromosomal abnormalities and provide a clear etiological diagnosis for children with developmental delay of unknown cause, which has important clinical value.

Key words: chromosomal microarray analysis; prenatal diagnosis; developmental delay; genetic counseling

* 基金项目: 山东第一医科大学学术提升计划项目(2019QL017); 山东省医药卫生科技发展计划项目(202011001103)。

作者简介: 田海英, 女, 主管技师, 主要从事临床检验诊断学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: honghuahui2006@163.com。

本文引用格式: 田海英, 罗真真, 汪琳琳, 等. 染色体微阵列技术在产科和儿科遗传病诊断中的临床应用价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(6): 701-704.

染色体作为人类的遗传物质,是导致人类出生缺陷的重要原因之一,且目前尚无有效的治疗方法,只能依靠产前诊断达到预防染色体疾病的目的^[1]。染色体微阵列技术(CMA)可实现全基因组水平检测染色体不平衡的拷贝数变异(CNV),尤其是对于染色体微缺失、微重复有更高的检出率,是染色体核型分析的有效补充^[2]。已经有大量的研究证实,CNV 与许多疾病相关,包括数百种染色体的微缺失、微重复综合征,并且是先天性发育障碍的主要病因,包括自闭症^[3]、智力障碍^[4]、行为异常、肌张力减退等,严重影响患者的生活质量,给患者家庭带来沉重的精神和经济负担。CMA 在产前诊断领域应用的临床指征主要有高龄、无创 DNA 检测(NIPT)高风险、夫妻一方染色体异常、B 超异常、不良孕育史等^[5]。本研究分析 CMA 在异常临床表现患者中的检测情况,为临床医生提供参考依据,从而降低出生缺陷,提高人口素质。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 2 月至 2020 年 12 月在泰安地区部分医院产科、生殖医学中心、优生优育门诊就诊的 287 例孕妇为研究对象,年龄 18~45 岁,中位年龄 31 岁。孕妇均已签署知情同意书。因单纯高龄(≥35 岁)、高龄合并 NIPT 高风险、高龄合并超声异常以及高龄合并不良孕育史而进行羊水穿刺产前诊断的孕妇 63 例;因 NIPT 高风险而进行羊水穿刺产前诊断的孕妇 110 例;因超声发现胎儿结构异常而进行产前诊断的孕妇 47 例;因不良孕育史而进行产前诊断的孕妇 22 例;因夫妻一方染色体异常而进行羊水穿刺产前诊断的孕妇 18 例;孕期服药、促排卵助孕、接触射线等其他原因进行羊水穿刺产前诊断的孕妇 18 例;因胚胎停育、B 超确诊异常等原因导致流产进行流产组织 CMA 检测的孕妇 17 例。同时选择儿科、康复科及新生儿科就诊的早产儿、高危儿、先天畸形及不明原因发育迟缓患儿共 118 例为研究对象。患儿年龄 4 h 至 15 岁,所有患儿均抽取外周血进行 CMA 检测,由其父母或监护人签署知情同意书。并进一步收集 25 例检测到致病位点的患儿父母外周血标本,进行 CMA 检测,判断患儿的染色体异常片段是否来源于父母。

1.2 方法 排除介入性穿刺禁忌证后,在超声引导下进行羊膜腔穿刺术抽取 30 mL 左右的羊水,取适量用于 CMA 检测。采集 118 例患儿的外周血 2 mL,枸橼酸钠抗凝,应用 QIAGEN 试剂盒提取基因组 DNA。应用美国 Affymetrix 公司生产的 CytoScan-HD(195 万 CNV 探针+75 万 SNP 探针)芯片对样本进行检测。取流产组织绒毛或流产组织,检测前,流产物 DNA 均经过与母血 DNA 的连锁分析排除母体细胞污染。

3 种标本均采用 Affymetrix 公司配套检测试剂盒及优化的标准操作流程,使用 CytoScanHD/Cyto-

Scan750K 进行全基因组范围扫描。具体流程如下:(1)严格按照质控标准进行 DNA 提取、酶切、连接、PCR、PCR 产物纯化、片段化、标记,再以染色体 DNA 探针实施全面覆盖,使之与支持物固定在一起后与标记分子进行杂交;(2)对 DNA 杂交信号进行监测,通过相应的信息技术、CHAS 软件对收集样本分子的数量以及序列信息进行检测;(3)得到的数据应用软件 Affymetrix Chromosome Analysis Suite Software 进行分析结果,最终通过查阅 DECIPHER、ISCA、OMIM、NCBI PubMed 等数据库进行结果判读,评估染色体是否存在非整倍体异常、整倍体异常、微缺失、杂合性缺失异常等。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 对数据进行整理。计数资料采用百分数表示。

2 结果

2.1 CMA 检出的染色体异常类型分析 287 例不同产前诊断指征的标本包括 270 例羊水穿刺标本和 17 例流产组织标本,CMA 共检出 73 例明确致病的病例,包括 64 例羊水穿刺标本和 9 例流产组织标本;其中常染色体数目异常病例 18 例,常染色体致病性片段异常病例 14 例;性染色体数目异常病例 29 例,性染色体致病性片段异常病例 11 例;三倍体 1 例。在致病性片段异常病例中,小片段异常(1~10 Mb)病例 12 例,微小片段(<1 Mb)2 例,占比为 19.2%(14/73),见表 1。25 例染色体异常但意义不明确的病例(VOUS),所占比例为 8.71%(25/287),包括 20 例羊水穿刺标本和 5 例流产组织标本。

表 1 CMA 检出的染色体异常类型分析(n=73)			
异常分类	类型	异常数量(n)	占比(%)
常染色体数目异常	21-三体	13	17.8
	18-三体	1	1.4
	16-三体	1	1.4
	20-三体	1	1.4
	22-三体	1	1.4
	13-三体	1	1.4
性染色体数目异常	47,XXY	11	15.1
	47,XXX	10	13.7
	47,XYY	8	11.0
三倍体	69,XXY	1	1.4
致病性片段异常		25	34.2
小片段异常(1~10 Mb)		12	16.4
微小片段异常(<1 Mb)		2	2.7

2.2 CMA 在不同产前诊断指征中检出确诊病例的分析 根据羊水穿刺指征可以分为高龄、NIPT 高风险、夫妻一方染色体异常、B 超异常、不良孕育史、血清学筛查风险、高龄合并 NIPT 高风险、高龄合并不良孕史和其他(包括孕期用药、接触射线等)等。经统

计发现,CMA 检出确诊病例最多的产前指征为 NIPT 高风险,共检出异常病例 45 例,检出率为 40.91%;其次为高龄合并 NIPT 高风险,共检出确诊病例 10 例,检出率为 76.92%。见表 2。

表 2 CMA 在不同产前诊断指征中检出确诊病例的分析			
产前诊断指征	<i>n</i>	确诊病例	检出率(%)
NIPT 高风险	110	45	40.91
高龄	44	4	9.09
B 超异常	47	9	19.15
夫妻一方染色体异常	18	0	0.00
不良孕育史	22	0	0.00
高龄合并 NIPT 高风险	13	10	76.92
高龄合并不良孕史	6	1	16.67
血清学筛查高风险	9	1	11.10
其他	18	3	15.79
合计	287	73	25.40

2.3 CMA 对不同类型 CNV 患儿检测能力 对 118 例患儿进行 CMA 检测,明确致病的病例有 58 例,检出率为 49.15%;VOUS 共 8 例,检出率为 6.78%。所有阳性标本检测的 CNV 类型分为染色体缺失(≥ 50 Kb)、染色体重复(≥ 10 Kb)、单亲二倍体(包括印迹染色体:染色体末端纯合片段 >5 Mb 或染色体中间纯合片段 >15 Mb;非印迹染色体:染色体末端纯合片段 >10 Mb 或染色体中间纯合片段 >20 Mb)、染色体缺失合并重复、非整倍体和嵌合体 6 类,见表 3。在检测出染色体的片段中重复(≥ 10 Kb)的病例为 18 例,异常片段(1~10 Mb)的病例有 30 例,小片段(≤ 1 Mb)的病例有 10 例,检出率为 17.2%。

表 3 CMA 检测 58 例明确致病病例 CNV 类型		
CNV 类型	<i>n</i>	检出率(%)
染色体缺失	38	65.5
染色体重复	7	12.1
染色体缺失合并重复	2	3.4
非整倍体	8	13.8
单亲二倍体	1	1.7
嵌合体	2	3.4

2.4 118 例患儿的临床表型及 CMA 检测情况 按照临床表型分类进行阳性率的分析,结果显示,多表型患儿阳性率要高于单一表型患儿的阳性率,见表 4。

2.5 CMA 对 25 例染色体异常标本的遗传方式的检测情况 有 25 例检测到致病位点的患儿父母,通过采集患儿父母外周血标本进行 CMA 检测,其中 8 例与患儿在相同区域发现染色体异常,为其再次生育提供了遗传风险咨询,以避免再次生育类似的患儿。有 2 例因 CMA 不能检测平衡易位,故建议应用 FISH

或高分辨率染色体核型分析来确认患儿是否遗传自父母。见表 5。

表 4 118 例患儿的临床表型及 CMA 检测结果				
临床表型	<i>n</i>	VOUS (<i>n</i>)	明确致病 (<i>n</i>)	致病占比 (%)
发育迟缓	9	2	3	33.3
染色体异常	13	0	13	100
早产儿/高危儿	32	0	11	34.4
儿童孤独症	3	0	2	66.7
新生儿缺氧缺血性脑病	1	0	1	100.0
肌营养不良	1	0	0	0.0
儿童高脂血症	1	0	0	0.0
两个系统异常	10	1	5	50.0
3 个及以上的系统合并异常	35	5	20	57.1
其他	13	0	3	23.1

表 5 25 例染色体异常标本的遗传方式分类			
患儿类型	父母试验(<i>n</i>)	遗传自父母(<i>n</i>)	所占比例(%)
染色体缺失	12	4	33.3
染色体重复	10	4	40.0
其他	3	0	0.0
合计	25	8	32.0

3 讨 论

在产前诊断和产后遗传病的检测中,CMA 具有分辨率较高的优势,而且相比于传统的染色体核型分析技术,优化了检测流程,不需要费时费力培养细胞,检测出微小片段的缺失和重复的概率较高^[6]。然而,CMA 因无法检测出平衡性染色体重排,如易位等、倒位等具有一定限制^[7],从而无法完全替代传统的染色体核型分析^[8]。染色体异常不仅有数目的异常还有结构的异常,CMA 可检测出 1~10 Mb 的小片段以及小于 1 Mb 的微小片段 CNV^[9],是核型分析的有效补充,既可以提高染色体异常的检出率,避免缺陷儿的出生,又可以对再次生育进行遗传风险评估。

本研究结果显示,CMA 在羊水穿刺标本、流产组织标本以及外周血标本中,片段 ≤ 10 Mb 的检出率较高,更能检测出微小片段的缺失和重复。本研究纳入的 NIPT 高风险标本数量占比最高,达到 38.3%(110/287),且 CMA 检测出的确诊病例达到 40.91%,尤其是高龄合并 NIPT 高风险的检出率达到 76.92%;其他临床指征中 B 超异常的确诊病例检出率为 19.15%,对于发现异常胎儿或于孕期发现并明确诊断 NIPT 高风险病例具有重要的临床意义^[10]。CNV 在其他研究中又被分为致病性 CNV、可能致病性 CNV 和 VOUS^[11]。VOUS 是指不能明确该异常 CNV 的致病性^[12],本研究中羊水标本 VOUS 总占比为 8.71%,

患儿外周血标本 VOUS 总占比为 6.78%。国内相关的临床数据不足,需要更多的积累完善数据信息库调整报告阈值标准等方式来降低 VOUS 的比例^[13]。随着芯片技术的不断发展,相信会有更多 CNV 的临床意义被明确。

自然流产大多是由于染色体异常所致^[14],传统的检测手段如核型分析只能检测≥5 Mb 的染色体异常,荧光原位杂交虽然不需要培养,但仅对特定的目标染色体的数目异常进行检测,全部的染色体难以实现精准定位。本研究共收集了 17 例流产组织标本,成功检测出明确致病标本 9 例,检出率达 52.9%,其中染色体数目异常的有 7 例,包括 1 例 22-三体、1 例 18-三体、1 例 16-三体等以及 1 例三倍体(69,XXY)。通过对流产组织标本进行相关检测,有利于寻找流产的原因,进而指导下一次的妊娠^[15]。

CMA 检测适应证较为广泛,发育迟缓、智力低下,先天性畸形以及儿童孤独症等均适用于 CMA 检测^[16]。随着 CNV 的不断发展,越来越多的疾病,如癫痫、新生儿脑病、先天性心脏病等也被推荐为 CMA 检测的适应证^[17-18]。

CMA 发展较快,它为研究基因复杂性提供了强有力的手段,结合传统的染色体分析技术,在临床诊断中的作用不断增强,值得推广应用。

参考文献

[1] 刘轶,刘艳,李毅,等. 染色体微阵列分析技术在 759 例不同产前诊断指征孕妇羊水水中的临床应用分析[J]. 生殖医学杂志,2021,30(2):161-165.

[2] MITRAKOS A,KATTAMIS A,KATSIBARDI K,et al. High resolution Chromosomal Microarray Analysis (CMA) enhances the genetic profile of pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients [J]. Leuk Res, 2019,83:106177.

[3] MARSHALL C R,NOOR A,VINCENT J B,et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorders[J]. Am J Hum Genet,2008,82(2):477-488.

[4] JONES S J,FLIBOTTE S,FARNOUD N,et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation[J]. Am J Hum Genet,2006,79(3):500-513.

[5] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志,2014,49(8):570-572.

[6] WAPNER R I,MARTIN C L,LEVY B,et al. Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis[J]. N Engl J Med,2012,367(23):2175-2184.

[7] MANNING M,HUDGINS L,Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities [J]. Gene Med,2010,12(11):742-745.

[8] DUGOFF L,NORTON M E,KULLER J A. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis [J]. Am J Obstet Gynecol,2016,215(4):B2-B9.

[9] SLAVOTINEK A M. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays [J]. Human Genet, 2008,124(1):1-17.

[10] LEVY B,WAPNER R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis [J]. Fertil Steril,2018,109(2):201-212.

[11] RIGGS E R,ANDERSEN E F,CHERRY A M,et al. Correction: Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen) [J]. Genet Med,2021,23(11):2230.

[12] ONEDA B,RAUCH A. Microarrays in prenatal diagnosis [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol,2017,42:53-63.

[13] 蒋宇林,刘俊涛,戚庆炜,等. 308 例高危妊娠产前诊断 CMA 技术发现不明确拷贝数变异的结果分析[J]. 生殖医学杂志,2017,26(9):863-868.

[14] PYLYP L Y,SPYNNENKO L O,VERHOGLYAD N V, et al. Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1 000 cases [J]. J Assist Reprod Genet,2018,35(2):265-271.

[15] PARK K J,PARK H K,KIM Y J,et al. DUOX2 Mutations Are Frequently Associated With Congenital Hypothyroidism in the Korean Population [J]. Ann Lab Med, 2016,36(2):145-153.

[16] MILLER D T,ADAM M P,ARADHYA S,et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies [J]. Am J Hum Genet,2010,86(5):749-764.

[17] OLSON H,SHEN Y,AVALLONE J,et al. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy [J]. Ann Neurol,2014,75(6):943-958.

[18] 何才通,邓国生,赖玉青,等. 染色体微阵列联合核型分析在先天性心脏病胎儿产前诊断中的应用 [J]. 广西医科大学学报,2020,37(9):1686-1690.