孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序在产前非整倍体核型遗传筛查中的应用

张 燕[1], 王 亿[1], 缑灵山[1], 王 鹏[1], 方 媛[1], 王传霞[1], 王 娜[2], 索 峰[1], 顾茂胜[1]

(1. 徐州市妇幼保健院遗传医学中心，江苏徐州 221000；2. 苏州贝康医疗器械有限公司，江苏苏州 215123）

摘 要：目的 探讨孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前检测（non-invasive prenatal testing，NIPT）技术在评估胎儿染色体非整倍体风险中的临床应用价值。**方法** 选取 2018 年 4 月～2019 年 10 月于徐州市妇幼保健院进行 NIPT 检测的 8 001 例孕妇，提取其静脉血血浆中胎儿游离 DNA，利用高通量基因测序平台进行测序分析，高风险者进行羊膜腔穿刺术及染色体核型分析进行确诊诊断，低风险者常规产检。**结果** 8 001 例样本中共检出 21,18 和 13 三体高风险 34 例(0.425%)，其中包括 28 例 21 三体综合征 (21 trisomic syndrome,T21),4 例 18 三体综合征 (18 trisomic syndrome,T18),2 例 13 三体综合征 (13 trisomic syndrome,T13)。所有高风险者均行羊水染色体核型分析，确诊 19 例 T21,3 例 T18,1 例 T13，复合阳性预测值为 67.65%。所有检测者筛查指征分组中，彩超提示有与染色体异常相关的软指标异常组的阳性率最高（1.010%），其次为产筛高风险组、高龄组、产筛临界风险组，孕妇要求及其他筛查指征组阳性率最低。六组数据差异不具有统计学意义 (χ^2=5.454，P > 0.05）。**结论** NIPT 检测技术因其具有高通量性、高检出率、无创性等优点，使其在临床具有越来越广泛的应用前景，但该技术存在的假阳性率及假阴性率不可避免，所以检出高风险者需进一步确诊，低风险者仍需常规产检避免假阴性。

关键词：胎儿游离 DNA；产前筛查；非整倍体；无创产前检测；21 三体综合征

中图分类号：R714.55；R446.7 **文献标识码：**A **文章编号**:1671-7414（2020）02-006-04

doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2020.02.002

Application of High-throughput Sequencing in Fetal Free DNA in Maternal Peripheral Blood in Prenatal Aneuploidy Karyotype Genetic Screening

ZHANG Yan[1], WANG Yi[1], GOU Ling-shan[1], WANG Peng[1], FANG Yuan[1], WANG Chuan-xia[1], WANG Na[2], SUO Feng[1], GU Mao-sheng[1]

(1.*Genetic Medicine Center,Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Jiangsu Xuzhou* 221000, *China*; 2.*Suzhou Beikang Medical Device Co.Ltd, Jiangsu Suzhou* 215123, *China*)

Abstract: Objective To explore the clinical value of non-invasive prenatal testing (NIPT) of fetal free DNA of maternal peripheral blood in assessing the risk of fetal chromosome aneuploidy. **Methods** A total of 8 001 pregnant women who underwent NIPT in Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital from April 2018 to October 2019 were selected. Fetal free DNA was extracted from maternal venous blood and analyzed by sequencing using high-throughput gene sequencing platform. Those testing results with high risk needed to undergo amniocentesis and chromosome karyotype analysis for diagnosis, while those with low risk underwent routine prenatal examination.**Results** A total of 34 cases (0.425%) with high risk of trisomy 21,18 and 13, including 28 cases with trisomy 21（T21）, 4 cases with trisomy 18(T18) and 2 cases with trisomy 13(T13) were detected.All high-risk pregnant women were analyzed for amniotic fluid karyotype, and 19 cases with T21, 3 cases with T18, 1 case with T13 were confirmed, and the combined positive predictive value was 67.65%.Among the screening indicator groups of all detectors, the positive rate was the highest (1.010%) in the group with soft indicator abnormality associated with chromosomal abnormality indicated by color ultrasound. Followed by the high risk group of prenatal screening, the elderly group and the critical risk group of prenatal screening,and maternal requirements and other screening indications group had the lowest positive rate.The data differences between the six groups were not statistically significant(χ^2=5.454, P > 0.05).**Conclusion** Because of its advantages of high throughput and high detection rate and noninvasion, NIPT detection technology has more and more extensive application prospects in clinical practice. However, the false-positive rate and false-negative rate of this technology are

基金项目：江苏省妇幼健康科研课题（F201819）；徐州市科技计划项目（KC18175; KC18027）；江苏省双创博士高层次人才项目。

作者简介：张燕（1990–），女，本科，技师，从事分子遗传学筛查及诊断工作，E-mail:zhangyanxz2014@163.com。

通讯作者：索峰（1985–），男，硕士研究生，助理研究员，E-mail：suofeng163@163.com。

inevitable, so pregnant women with high detection risk should be further diagnosed, while those with low risk still need routine prenatal examination to avoid false negative.

Keywords：fetal free DNA; prenatal screening;aneuploidy;NIPT; 21 trisomic syndrome

在我国，出生缺陷是造成婴儿死亡率和儿童发病率升高的主要原因[1]，致使出生缺陷发生的最常见原因之一为染色体非整倍体异常，主要包括 21 三体综合征（21 trisomic syndrome, T21）,18 三体综合征（18 trisomic syndrome, T18）,13 三体综合征（13 trisomic syndrome, T3）等[2]，此类疾病尚缺少有效的治疗方法，故孕妇进行产前染色体非整倍体筛查及诊断是降低出生缺陷率的最有效办法。传统的早中孕期产前筛查主要依靠血清学筛查及影像学排畸，但检出率只有 50%~95%，还存在 5% 的假阳性率[3]。介入性穿刺进行核型分析准确率高，是产前诊断金标准，但其存在一定的流产及感染风险，导致孕妇依从性差。无创产前检测（non invasive prenatal testing, NIPT）因其深度测序、高通量性、无创性、高特异度、高灵敏度、高检出率等优点被广泛应用于产前胎儿染色体非整倍体筛查[4-6]。故本研究对 8 001 例孕妇 NIPT 结果行回顾性分析，探讨 NIPT 检测技术在评估胎儿染色体非整倍体风险中的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 *研究对象* 选取 2018 年 4 月 ~2019 年 10 月于徐州市妇幼保健院因各种原因行 NIPT 检测的孕妇 8 001 人，年龄 16~48（29.8 ± 5.0）岁，采血孕周 12^{+0}~31^{+0} 周（对于孕周大于 22^{+6} 周的孕妇，均已告知其可能错过介入性诊断最佳时间并签署知情同意书）。孕妇均已签署检查知情同意书。

1.2 *仪器与试剂* NIPT 检测采用中山大学达安基因股份有限公司研发的 DA8600 高通量 DNA 测序平台及其配套生产的检测试剂。

1.3 *方法*

1.3.1 NIPT 检测：EDTA 管采集孕妇静脉全血 8~10ml，分离血浆，提取血浆中游离 DNA，进行文库构建、乳液 PCR,ES 富集、上机测序等步骤。实验加入阴阳性对照，测序结果经过生物信息分析后，将各三体风险指数 Z 值处于 [–3.00 ~ 3.00] 之间的样本判断为相应 T21,T18 和 T13 低风险，各 Z 值 >3.00 的样本判断为相应 T21,T18 和 T13 高风险。

1.3.2 羊水染色体核型确诊：对 NIPT 结果高风险者进行遗传咨询，告知其进行羊膜腔穿刺及羊水染色体核型分析，避免 NIPT 结果假阳性，对在本院行此检查者签署知情同意书，对在外院行此检查者进行电话随访。低风险者进行后续常规产检。

1.4 *统计学分析* 计量资料采用均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，计数资料采用率（%）表示，组间比较采用行 × 列表资料 χ^2 检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *NIPT 结果分析* 8 001 例样本中共检出 34 例高风险 (0.425%)，其中包括 28 例 T21(0.350%)，4 例 T18(0.050%)，2 例 T13(0.025%)。

2.2 *核型分析* 所有 NIPT 高风险者均在本院或外院行羊水染色体核型分析，确诊 19 例 T21，3 例 T18，1 例 T13，阳性预测值分别为 67.86%, 75% 和 50%，复合阳性预测值为 67.65%(23/34)。

2.3 *不同筛查指征组的阳性率比较* 见表 1。六组数据比较，差异无统计学意义（χ^2=5.454, $P > 0.05$）。

表 1 不同筛查指征组的阳性率 [n（真阳性数）]

组 别	n	T21	T18	T13	合计	阳性率（%）
彩超提示异常	198	2(2)	0	0	2(2)	1.010
产筛高风险	1 254	9(7)	1(1)	0	10（8）	0.638
高龄	1 655	9(8)	2(1)	2(1)	13(10)	0.604
产筛临界风险 T21（1/1 000~1/270）	2 007	4(2)	0	0	4(2)	0.100
产筛临界风险 T21 (1/2 000~1/1 000)	1 709	3(0)	1(1)	0	4(1)	0.059
孕妇要求及其他	1 178	1(0)	0	0	1(0)	0
合计	8 001	28（19）	4(3)	2(1)	34(23)	0.287

3 讨论

本研究 8 001 例样本中共检出 34 例三体高风险，阳性率为 0.425%，所有高风险者经回访均已行羊水染色体核型分析，T21,T18 和 T13 复合阳性预测值为 67.65%，符合指南与共识要求不低于 50% 的标准[7]，但稍低于其他检测机构[2,8-9]，这主要与筛查人群有关。NIPT 技术规范[10]将产筛临界风险为 1/1 000~1/270 的孕妇纳入 NIPT 筛查范围，但本产

前诊断中心将该范围扩大为 1/2 000~1/270，在增加真阳性例数的同时假阳性例数也有所提高，因此降低了复合阳性预测值。

根据筛查指征将孕妇分为六组，其中彩超提示异常组阳性率最高，这与染色体异常者的临床表现有关，与 NIPT 检测技术无关[11]，其次为产筛高风险组、高龄组、产筛临界风险组，孕妇要求及其他筛查指征组阳性率最低。因此，NIPT 均适用于这六组人群，尤其是前五组以及有介入性产前诊断禁忌者，与传统的介入性诊断相比，大大减少了行介入性诊断的人数，同时也减轻了部分孕妇的心理压力。

本研究入选产筛临界风险（1/2 000~1/1 000）组的孕妇有 1 709 例，确诊 1 例 T18，该组的核型分析阳性率为 0.059%，NIPT 假阳性率（3/4）高于产筛临界风险（1/1 000~1/270）组的假阳性率（2/4）。因此，将 NIPT 适用产筛临界风险范围扩大为 1/2 000~1/270 可以提高染色体非整倍体的检出率，避免三体患儿的出生，但会导致 NIPT 假阳性率有一定比例的升高。

NIPT 检测技术的自身优势以及该技术的不断升级优化等优点使其在临床具有越来越广泛的应用前景，但该技术仍存在一定的假阳性率及假阴性率[12]，所以也仅局限用于染色体非整倍体的筛查，对于检出高风险者仍需进一步确诊，检出低风险者仍需进行后续常规产检。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部．中国出生缺陷防治报告(2012)[Z].（2012-09-12）.http://www.gov.cn/gzdt/att/att/site1/20120912/1c6f6506c7f811bacf9301.pdf.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Report on prevention and treatment of birth defects in China (2012) [Z].（2012-09-12）.http://www.gov.cn/gzdt/att/att/site1/20120912/1c6f6506c7f811bacf9301.pdf.

[2] 韩美艳，梁思颖，姜楠，等．青岛地区 38 862 例孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前检测结果分析 [J]. 中国优生与遗传杂志，2019,27(3):309-311,283.
HAN Meiyan, LIANG Siying, JIANG Nan, et al. Analysis of noninvasive prenatal testing results of fetal free DNA in peripheral blood of 38 862 pregnant women in Qingdao [J]. Chinese Journal of Health and Genetics,2019,27(3):309-311,283.

[3] 罗丽双，孟繁杰，张宁，等．5 756 例孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前筛查结果分析 [J]．国际生殖健康 / 计划生育杂志，2018，37（2）：103-106.
LUO Lishuang, MENG Fanjie, ZHANG Ning, et al. 5 756 cases analysis of non-invasive prenatal fetal free-DNA testing in peripheral serum of pregnant women [J]. Journal of International Reproductive Health/Family Planning, 2008,37(2):103-106.

[4] 孟凡萍，郝坡．渝东北地区胎儿染色体非整倍体疾病的 NITP 分析 [J]．现代检验医学杂志，2019，34(2):48-51.
MENG Fanping, HAO Po. NITP analysis of fetal chromosomal aneuploidy disease in northeast of Chongqing [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2019,34(2):48-51.

[5] 许艳，明坚，李娜，等．无创性产前基因检测技术筛查策略的卫生经济学分析 [J]．中华妇产科杂志，2017，52（1）：53-56.
XU Yan, MING Jian, LI Na, et al. Health economics analysis of screening strategies for noninvasive prenatal genetic testing technology [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology ,2017,52(1):53-56.

[6] 燕凤，燕飞，姚念玲，等．孕妇外周血无创 DNA 检测技术在产前诊断中的应用 [J]．现代检验医学杂志，2019, 34（01）: 17-21.
YAN Feng, YAN Fei, YAO Nianlin, et al. Application of non-invasive DNA detection technique in maternal peripheral blood for prenatal diagnosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2019,34(1):17-21.

[7] 国家卫生健康委员会临床检验中心产前筛查与诊断专家委员会．孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查实验室技术专家共识 [J]．中华检验医学杂志，2019，42（5）：341-346.
Expert Committee on Prenatal Screening and Diagnosis of Clinical Examination Center, National Health Commission. Expert consensus on laboratory technology on prenatal screening of fetal free DNA in maternal peripheral blood[J].Chinese Journal of Laboratory Medicine,2019,42(5):341-346.

[8] 廖晗献，黄卫彤，王宗杰．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 [J]．检验医学与临床，2019, 16（5）: 657-660.
LIAO Hanxian, HUANG Weitong, WANG Zongjie. Study on application of fetal chromosomal aneuploidy gene detection in prenatal screening of pregnant women [J]. Laboratory Medicine & Clinic,2019,16(5):657-660.

[9] 史淑琼，宋春林，陈淑芬，等．无创基因检测技术在胎儿非整倍体及性染色体产前筛查的临床研究 [J]. 中国优生与遗传杂志，2019, 27（5）: 542-544.
SHI Shuqiong, SONG Chunlin, CHEN Shufen, et al. Clinical study of noninvasive gene testing in prenatal screening of fetal aneuploidy and sex chromosomes [J]. Chinese Journal of Health and Genetics,2019,27(5):542-544.

[10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公报．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 [B]．国卫办妇幼函 [2016]45 号，2016.10.27.
Bulletin of the National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Notice of the General Office of the National Health and Family Planning Commission on Standardized and Orderly Prenatal Screening and Diagnosis of Fetal Free DNA in Maternal Peripheral Blood [B]. National Health Office Maternal and Child Letter [2016] No. 45, 2016.10.27.

（下转 45 页）