

无创基因检测(NIPT) 对胎儿染色体异常筛查的临床应用*

左娟, 刘洁, 朱瑾, 江玲玲, 黄建成, 李朝晖

(福建医科大学附属闽东医院检验科, 福建宁德 355000)

摘要:目的 探讨无创产前基因检测(NIPT)在预测胎儿染色体异常中的临床应用价值。方法 选取2016年4月~2018年4月在福建省宁德市闽东医院行NIPT的单活胎孕妇6357例,按孕周分为早、中、晚孕期组,按孕龄分为高、低龄组,低龄组又按申请理由分唐氏筛查高风险组、临界风险组、单项指标或中位数倍数(MOM值)异常组,B超软指标异常组和直接选择NIPT组,对于结果异常者签署知情同意书行羊膜腔穿刺术。结果 ①6357例孕妇共检出染色体异常76例,早、中、晚孕期组阳性率分别为2.17%,1.23%和0.70%,三者之间差异无统计学意义($\chi^2=2.265\sim 6.052$,均 $P>0.05$);②6357例孕妇按孕龄和申请理由分组,各组阳性率分别为1.45%,0.97%,0.60%,1.29%和1.15%,各组之间差异无统计学意义($\chi^2=0.017\sim 1.809$,均 $P>0.05$);③76例NIPT结果异常孕妇有64例接受了羊膜腔穿刺羊水细胞染色体检查,其中21,18和13-三体的诊断率分别为90%,100%和100%,符合率分别为88.9%,88.9%和50%;性染色体的诊断率为83.9%,符合率61.5%;其它染色体异常诊断率为58.3%,符合率为0。结论 ①不同孕期NIPT的阳性率之间无差异,孕妇可以尽早行NIPT,为后续介入性诊断争取时间;②不同申请理由NIPT的阳性率之间无差异,高龄和错过唐筛时间的孕妇可将NIPT作为筛查胎儿染色体异常的首选,而唐筛高风险、临界风险、单项指标或MOM值异常的孕妇可将NIPT作为二线筛查,从而避免不必要的羊膜腔穿刺;③NIPT不仅对21和18-三体具有较高的特异度和敏感度,对13-三体、性染色体也有一定的预示作用,可作为产前检测胎儿染色体异常的辅助手段。

关键词:无创产前基因检测;羊水;染色体;唐氏筛查

中图分类号:R394-33 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)05-015-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.005

Application of Noninvasive Prenatal Testing in the Screening of Chromosome Abnormality

ZUO Juan, LIU Jie, ZHU Jin, JIANG Ling-ling, HUANG Jian-cheng, LI Zhao-hui

(Department of Laboratory Medicine, Mindong Hospital Affiliated
to Fujian Medical University, Fujian Ningde 355000, China)

Abstract: Objective To explore the clinical application value of noninvasive prenatal testing(NIPT) in the screening of chromosome abnormality. **Methods** From April 2016 to April 2018, a total of 6357 cases of single pregnant women undergoing NIPT in Mindong Hospital were selected. They were divided into early-pregnancy group, mid-pregnancy group and later-pregnancy group by gestational age. They also were divided into advanced maternal age group and non-advanced maternal age group. The non-advanced maternal age group was secondly divided into high risk group, critical risk group, single index or MOM anomaly group about Down's syndrome screening, soft indexes anomaly group about ultrasonic diagnosis and preferred alternative group by reasons for application of NIPT. The pregnant women with high-risk NIPT results were suggested amniotic fluid puncture for karyotype analysis. **Results** ①76 pregnant women were found with high-risk NIPT results. The positive rate was 2.17% in early-pregnancy group, 1.23% in mid-pregnancy group and 0.70% in later-pregnancy group. They didn't have statistic significance ($\chi^2=2.265\sim 6.052$, $P>0.05$). ②A total of 6357 cases were divided by age and reason for application of NIPT. The positive rate were 1.45%, 0.97%, 0.60%, 1.29% and 1.15% respectively. They didn't have statistic significance ($\chi^2=0.017\sim 1.809$, $P>0.05$). ③Among 76 pregnant women with high-risk NIPT results, 64 cases underwent amniotic fluid puncture for karyotype analysis. The diagnosis rate of T21, T18 and T13 were 90%, 100% and 100% respectively. The positive predictive values of T21, T18 and T13 were 88.9%, 88.9% and 50%, respectively. The diagnosis rate of sex chromosome abnormality was 83.9%, the coincidence rate was 61.5%, the diagnosis rate of other chromosome abnormality was 58.3%, the coincidence rate was 0. **Conclusion** ①The positive rates didn't have significant difference among different pregnancy duration, so pregnant woman after 12 weeks can do NIPT as early as possible

* 基金项目:福建省青年科研课题(2014-1-97)。

作者简介:左娟(1981-),女,硕士研究生,主管技师,主要从事细胞遗传学研究,E-mail:zhiqing923@126.com。

通讯作者:李朝晖(1970-),男,主任技师,E-mail:li6336@163.com。

for striving more time for subsequent interventional diagnosis. ②The positive rates didn't have significant difference among different groups divided by reasons for application of NIPT, so pregnant women with advanced age or missing Down's syndrome screening can do NIPT as the first choice for screening fetal chromosomal abnormality. The pregnant women with high risk, critical risk and single in dex or MOM anomaly in Down's syndrome screening select NIPT as second-line screening to avoiding unnecessary puncture. ③NIPT not only have high specificity and sensitivity in screening of T21 and T18, but also have certain indicative for T13 and sex chromosome abnormality. NIPT can be a powerful and reliable supplementary means in screening fetal chromosomal abnormality.

Keywords: noninvasive prenatal testing; amniotic fluid; chromosome; down's syndrome screening

染色体是人类基因的载体,包括常染色体和性染色体。染色体数目和结构的异常不仅是导致胎儿流产、死胎、发育畸形的常见原因,也是引起新生儿出生缺陷的重要原因之一。常见的染色体异常有21-三体综合征、13-三体综合征和18-三体综合征等。传统的唐氏筛查主要是用来评估孕妇怀有21-三体、18-三体综合征胎儿的风险。随着孕妇外周血中胎儿游离DNA片段的发现^[1]和高通量测序技术的发展,无创产前基因检测(NIPT)已逐步成为广大孕妇筛查21-三体、18-三体综合征胎儿的首选。同时NIPT对胎儿其它染色体异常,如13-三体,性染色体也有一定的提示作用。本研究就是通过分析6357例孕妇NIPT结果来评价其在筛查胎儿染色体异常方面的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2016年4月~2018年4月自愿在我院行NIPT的单活胎孕妇6357例。孕妇年龄分布范围为14~48岁,孕周均在12~33⁺⁶周。所有孕妇按孕周分为早孕期组(12~14⁺⁶周)、中孕期组(15~20⁺⁶周)和晚孕期组(≥ 21 周),按孕龄分为高龄组(≥ 35 岁)和低龄组,低龄组又按申请NIPT理由分为唐氏筛查高风险组、临界风险组、单项指标或MOM值异常组、B超软指标异常组和直接选择NIPT组。

1.2 试剂与仪器 华大基因BGIDL-50全自动样品加载系统, BGISP-300全自动NIPT样品制备系统, BGISEQ-500测序仪, 美国Genetix公司GSL-120全自动高通量染色体扫描平台, 华大基因核酸提取试剂, 测序反应通用试剂盒(联合探针锚定聚合测序), 胎儿非整倍体(T21, T18, T13)检测试剂

表1

早、中、晚孕期组NIPT阳性情况

孕期分组	n	阳性例数					合计	阳性率(%)
		21-三体	18-三体	13-三体	性染色体	其他		
早孕期组(12~14 ⁺⁶ 周)	414	4	3	1	1	0	9	2.17
中孕期组(15~20 ⁺⁶ 周)	4806	15	5	2	27	10	59	1.23
晚孕期组(≥ 21 周)	1137	1	1	1	3	2	8	0.70
合计	6357	20	9	4	31	12	76	1.20

2.2 按孕龄和申请NIPT理由分组, 各组NIPT结果分析 见表1。将6357例孕妇按孕龄分为高龄组(≥ 35 岁)和低龄组, 低龄组又按申请NIPT

盒(联合探针锚定聚合测序), 杭州宝莱羊水/绒毛细胞培养基。

1.3 方法

1.3.1 NIPT标本采集: 在知情同意原则下, 抽取孕妇5ml静脉血至gene seek公司的血浆游离DNA真空保存管中, 上下颠倒混匀10次, 当天立即送至华大基因临床检验中心, 由其完成后续的检测。

1.3.2 羊膜腔穿刺术: 腹部常规消毒铺巾, 在B超引导下医生按照无菌操作规范, 抽取羊水20ml, 分至两个无菌离心管中, 各10ml。将两管羊水2000 r/min离心10 min, 弃上清, 各加4ml羊水细胞培养基, 混匀, 接种于两个T25培养瓶中, 分别放入两个37℃, 5 ml/dl CO₂培养箱中培养, 第7天观察细胞生长情况, 对贴壁比较好的细胞换液, 换液后第二天观察细胞克隆生长情况, 如果大的细胞克隆 ≥ 12 个就可以加入秋水仙素10 μ l (100 mg/ml), 作用30 min后, 常规收获、制片、G显带, 经GSL-120全自动扫描分析系统扫描后计数分析羊水细胞的染色体核型。

1.4 统计学分析 用spss11.0软件对不同孕期和不同申请理由各组NIPT结果采用计数资料多个样本率多重比较的 χ^2 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同孕期组NIPT结果分析 见表1。6357例孕妇按孕周分为早、中、晚孕期组, 各组NIPT阳性情况, 经多个样本率多重比较的 χ^2 检验发现, 各孕期组NIPT的阳性率之间差异无统计学意义($\chi^2 = 2.26 \sim 6.052$, 均 $P > 0.05$)。

理由分为唐氏筛查高风险组、临界风险组(21-三体风险值界与1/270和1/1000之间, 18-三体风险值界与1/350和1/1000之间)、单项指标或MOM

值异常组, B超软指标异常组和直接选择 NIPT 检验发现, 不同申请理由 NIPT 阳性率之间差异无组, 各组 NIPT 阳性经多个样本率多重比较的 χ^2 统计学意义($\chi^2=0.017\sim 1.809, P$ 值均 >0.05)。

表 2 按孕龄和申请理由分组, 各组 NIPT 阳性情况

申请理由	n	阳性例数					合计	阳性率(%)
		21-三体	18-三体	13-三体	性染色体	其他		
高龄	2 560	11	7	1	14	4	37	1.45
低龄 高风险组	653	3	0	0	4	0	7	1.07
临界风险组	1 647	3	0	1	5	7	16	0.97
单指标或 MOM 异常组	334	0	0	0	2	0	2	0.60
B超软指标异常组	465	2	0	1	2	1	6	1.29
直接选择 NIPT 组	698	1	2	1	4	0	8	1.15
合计	6 357	20	9	4	31	12	76	1.20

注: 申请理由有合并两项及以上的在分组时优先入组顺序为高龄、唐氏筛查异常、B超异常。

2.3 羊膜腔穿刺羊水细胞染色体检查对 NIPT 结果的验证 本研究 6 357 例孕妇共检出疑似染色体异常 76 例, 其中 21-三体 20 例, 确诊 16 例, 2 例自然流产, 诊断率为 90%, 阳性预测值为 88.89%; 18-三体 9 例, 8 例确诊, 1 例误诊, 诊断率为 100%, 阳性预测值为 88.89%; 13-三体 4 例, 确诊 2 例, 误诊 2 例, 诊断率为 100%, 阳性预测值为 50%; 性染色体 31 例, 确诊 16 例, 误诊 10 例, 5 例拒绝行羊水细胞染色体检查, 诊断率为 83.9%, 阳性预测值为 61.54%。其它染色体异常 12 例, 只有 7 例行羊膜腔穿刺羊水细胞染色体检查, 且 7 例均误诊。

3 讨论 出生缺陷是我国新生儿常见疾病之一, 染色体异常又是导致出生缺陷的重要原因之一。其中常染色体异常可表现为不同程度的智力低下, 生长发育迟缓及外观、器官畸形, 性染色体异常可表现为性腺发育不全、两性畸形等。目前, 针对这些染色体异常尚无有效的治疗方法, 只能通过二级预防尽量避免此类患儿的出生, 尤其是 21-三体综合征患儿。

NIPT 是基于母体外周血中含有胎儿游离 DNA 片段 (cell-free fetal DNA, cfDNA) 的基础上发展起来的一种检测技术。母体外周血中的 cfDNA 几乎全部来源于胎盘滋养层细胞, 其在怀孕 4 周就可检出, 孕 8 周后含量逐渐上升并稳定存在, 直至胎盘娩出 2 h 后不再被检出。NIPT 要求孕妇外周血中 cfDNA 的含量大于 5% 才可进行, 故 2016 年国家卫计委妇幼司将 NIPT 的最小检测孕周定为 ≥ 12 周。本研究所选取的研究对象孕周均 ≥ 12 周, 所有孕妇按孕周分组, 各组阳性率之间无统计学差异。分析各组 NIPT 阳性结果构成发现早孕期组的染色体异常主要是 21-三体、18-三体和 13-三体, 中孕期组的染色体异常主要是性染色体、21-三体和 18-三体, 晚孕期组主要是性染色体和其它染色体异常 (微缺失和微重复等)。鉴于 NIPT 对其它染色体微缺失微重复的敏感度和特异度没

有确切数据^[2], 故针对胎儿 21, 18, 13-三体和性染色体异常的诊断, 孕妇可以在孕 12 周后尽早行 NIPT, 为后续的介入性产前诊断争取更多的时间。

本研究将所有孕妇按孕龄分高龄组和低龄组, 高龄组共检出疑似染色体异常 37 例, 阳性率为 1.45% (37/2 560), 而低龄组阳性率 1.03% (39/3 797), 两组之间差异无统计学意义 ($\chi^2=2.264, P>0.05$), 由此证实高龄孕妇可以将 NIPT 作为诊断染色体异常的首选, 不必要按传统直接行羊膜腔穿刺, 这与殷一旋等^[3]报道不同。本研究又将低龄组按申请理由分组, 各组阳性率之间亦无统计学差异, B超软指标异常孕妇或错过唐氏筛查时间的孕妇可以直接选择 NIPT 检测胎儿染色体异常、唐氏筛查高风险、临界风险、单项指标或 MOM 值异常的孕妇可以将 NIPT 作为二线筛查, 仍为异常时再行羊膜腔穿刺, 从而避免不必要的羊水穿刺。由于本研究的 B超软指标异常大多为左心室强回声点、肾盂增宽、双侧脉络丛囊肿、NT 增厚等单一异常, 对复杂 B超异常缺乏数据, 故笔者建议复杂 B超异常者直接行羊膜腔穿刺羊水细胞染色体检查, 毕竟 NIPT 诊断胎儿染色体异常的种类有限。另外, 从进行 NIPT 孕妇的构成比来看, 唐氏筛查临界风险组的孕妇更愿意行 NIPT, 占有孕妇的 43.38% (1 647/3 797), 这与瑞士一项研究相符^[4], 与我国卫计委明确规定将传统唐氏筛查临界风险的孕妇列为 NIPT 的适应症之一相符。

本研究通过羊膜腔穿刺羊水细胞染色体检查对 NIPT 阳性结果进行验证发现, 孕妇对 21, 18, 13-三体和性染色体异常具有较高的重视, 其诊断率相对较高, 且诊断结果提示 NIPT 对 21, 18-三体具有较高特异度, 但对于 13-三体、性染色体仍具较高的假阳性率, 这与国内外的报道相似^[5,6], NIPT 对于其它染色体异常基于孕妇的诊断率不高及羊水细胞染色体核型分析的局限性, 本研究无法探讨。

综上所述,NIPT对21,18-三体具有较高的特异度和敏感度,孕妇尤其是高龄孕妇可以在孕12周后尽早行NIPT,及早发现染色体异常胎儿,而对于唐氏筛查高风险、临界风险和单项指标或MOM值异常的孕妇可以将NIPT作为二线筛查,避免不必要的羊膜腔穿刺。B超异常的孕妇可以根据异常情况选择NIPT或羊膜腔穿刺。虽然NIPT以其无创性被广大孕妇所接受,但基于技术的局限性,目前只能用于21,18,13-三体 and 性染色体非整倍体的检测,对与其它染色体异常,尤其是微缺失微重复等结构异常有待进一步的开发和研究,这也是NIPT将来发展的趋势。

参考文献:

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487.
- [2] Wilson RD. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy[C]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(3): e31-e37.
- [3] 殷一旋,梅瑾,王昊. 无创产前基因检测及羊水产前诊断在高龄孕妇中的对照研究分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(3): 23-24, 6.
Yin YX, Mei J, Wang H. The contrast study for amniotic fluid prenatal diagnosis and non-invasive gene detection in advanced maternal age[J]. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 2017, 25(3): 23-24, 6.
- [4] Gil MM, Revello R, Poon LC, et al. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS; cell-free DNA test contingent on result from first-trimester combined test[C]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47(1): 45-52.
- [5] 李玉芝,任景慧,林琳华,等. 大规模并行基因组测序技术应用于无创产前诊断染色体非整倍体的研究[J]. *华中科技大学报(医学版)*, 2012, 41(4): 475-480.
Li YZ, Ren JH, Lin LH, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy by massively parallel genomic sequencing technology[J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong (Medical Sciences)*, 2012, 41(4): 475-480.
- [6] 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): e1-12.

收稿日期:2018-05-31

修回日期:2018-07-23