

渝东北地区胎儿染色体非整倍体疾病的 NITP 分析*

孟凡萍¹, 郝 坡² (1. 重庆三峡中心医院检验科基因检测中心, 重庆 404000;
2. 重庆三峡医药高等专科学校医学技术学院, 重庆 404020)

摘要:目的 应用无创产前基因检测(noninvasive prenatal genetic testing, NIPT)技术研究渝东北地区胎儿染色体非整倍体疾病的发病率和年龄分布。方法 利用美国 life 公司二代测序平台及生物信息分析技术,分析 2016 年 7 月~2018 年 5 月在重庆三峡中心医院基因检测中心行 NIPT 检测的 2 784 例 12~24 周孕妇的外周血,从中获取胎儿染色体相关信息。对 NIPT 结果为高风险的孕妇实施羊膜腔穿刺及胎儿染色体核型分析,对 NIPT 结果为低风险的孕妇进行电话随访至出生后。结果 渝东北地区孕妇染色体非整倍体疾病高风险阳性检出率为 0.72%(20/2 784)。其中 ≥ 40 岁阳性率为 2.97%,30~39 岁阳性率为 0.75%, < 30 岁阳性率为 0.54%。羊膜腔穿刺分析显示,21-三体、18-三体高风险诊断符合率为 100%(11/11,2/2),13-三体高风险诊断符合率为 80.00%(4/5)。NIPT 诊断胎儿染色体非整倍体疾病的敏感度为 100.00%(2 784/2 784),总特异度为 94.44%(17/18),总假阳性率为 0.03%(1/2 784),假阴性率为 0.00%(0/0)。结论 渝东北地区 NIPT 检测胎儿染色体非整倍体疾病的阳性检出率为 0.72%,检出主要以 21-三体为主,占 61%, ≥ 40 岁高龄孕妇 NIPT 阳性率较其他年龄组明显升高,达 2.97%。

关键词:胎儿游离 DNA;无创产前基因检测;二代测序;染色体非整倍体

中图分类号:R714.55 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)02-048-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.013

NITP Analysis of Fetal Chromosomal Aneuploidy Disease in Northeast of Chongqing

MENG Fan-ping¹, HAO-Po² (1. Gene Detection Center of Laboratory Department, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2. College of Medical Technology, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404020, China)

Abstract: Objective To study the incidence and age distribution of fetal chromosome non-aneuploid disease in Northeastern Chongqing by using noninvasive prenatal genetic testing(NIPT). **Methods** Using the second generation sequencing platform and bioinformation analysis technology of the US life company, the peripheral blood of 2 784 cases 12~24 weeks pregnant women tested by NIPT at the Genetic Testing Center of Chongqing Three Gorges Center Hospital from July 2016 to May 2018 was analyzed to obtain fetal chromosome information, analyzed amniocentesis and fetal karyotype of pregnant women with high risk of NIPT results, and the pregnant women with low risk of NIPT results were followed up by telephone until after birth. **Results** The high risk positive detection rate of chromosome non-aneuploid disease in pregnant women in Northeastern Chongqing was 0.72%(20/2 784). Among them, the positive rate of 40 years and above was 2.97%, the positive rate of 30~39 years old was 0.75%, and the positive rate of under 30 years old was 0.54%. Amniotic fluid puncture analysis showed that the high-risk diagnosis compliance rate of 21-trisomes and 18-trisomes was 100%(11/11,2/2), and the high-risk diagnosis compliance rate of 13-trisomes was 80.00%(4/5). The sensitivity of NIPT to diagnosis of fetal chromosome non-aneuploid disease was 100.00%(2 784/2 784), the total specificity was 94.44%(17/18), and the total false positive rate was 0.03%(1/2 784), the false negative rate was 0.00%(0/0). **Conclusion** The positive detection rate of NIPT fetal chromosome non-aneuploid disease in northeast chongqing was 0.72%, mainly 21-triploid detection, accounting for 61%. The positive rate of NIPT in 40-year-old pregnant women was significantly higher than other age groups, reaching 2.97%. **Keywords:** cell-free fetal DNA; noninvasive prenatal genetic testing; the second generation sequencing; chromosome non-aneuploid

研究发现孕妇外周血中存在着胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA), 主要源自胎盘滋养层细胞, 无创产前基因检测(noninvasive prenatal genetic testing, NIPT)是一种新兴的无创产前检测方法, 该法就是基于检测母体血浆, cffDNA,

通过高通量测序技术对母体外周血中的 cffDNA 进行“非侵入性”产前检测, 较血清学检查、超声筛查以及现有创伤等产前诊断方法, 更具简便、快速、无创、可靠、易接受等特点, 开辟了产前检查的新篇章, 对现有的产前筛查、产前诊断体系进行了很好

* 基金项目:重庆市万州区科研项目(20B02002), 重庆三峡医药高等专科学校课题(2014mpxz18)。

作者简介:孟凡萍(1980—), 女, 医学博士, 副主任检验师, 主要从事脂代谢和胰岛素抵抗方面研究, E-mail:524974613@qq.com。

通讯作者:郝 坡, 男, 副教授, 主要从事基因检测方面的工作, E-mail:hpo1979@126.com。

的补充^[1~3],可根据 NIPT 的检测结果对胎儿染色体非整倍体异常风险情况进行综合评估^[4]。孕妇血中的 cfDNA 的检测与诊断中出现的染色体异常疾病有三种:21 三体综合征、18 三体综合征和 13 三体综合征^[5]。

本课题通过对渝东北地区 2 784 例 12~24 周孕妇采用高通量全基因测序,研究渝东北地区胎儿染色体 21 三体综合征、18 三体综合征、13 三体综合征的发病率和年龄分布。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 7 月~2018 年 5 月在重庆三峡中心医院基因检测中心行 NIPT 检测的 2 784 例 12~24 周孕妇外周血 10 ml。

1.2 试剂和仪器 胎儿染色体非整倍体 21 三体、18 三体、13 三体检测试剂盒(半导体测序法全套试剂(文库构建试剂盒 Ion Plus Fragment Library Kit,模板制备试剂盒 Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit,测序试剂盒 Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit,芯片 Ion PITM Chip)由中山大学达安基因股份有限公司分装提供,乳液 PCR 仪(ion one touch2)、ion one touch ES, DNA 荧光定量仪(Qbit3.0 fluorometer)由美国 LIFE 公司提供,基因测序仪 DA8600 由达安基因股份有限公司提供,PCR 扩增仪购自杭州安杰思生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胎儿游离 DNA 的提取:将 2 784 例 12~24 周孕妇静脉血 10 ml 分别于 4℃ 3 000 r/min, 15 min 及 13 000 r/min, 10 min 两次离心并分离血浆后,磁珠法提取游离 DNA,存于-80℃。

1.3.2 文库构建扩增:将 DNA 片段末端补平后,再与特异性接头和 P1 接头连接,PCR 扩增 DNA 片段。PCR 扩增条件:72℃ 20 min, 98℃ 2 min, (98℃ 15 s, 62℃ 15 s, 70℃ 1 min) 10 个 cycle, 70℃ 5 min, 4℃ hold。纯化后将产物存于-80℃。

1.3.3 模板制备及上机测序:将文库用 Qbit3.0 fluorometer 定量,每 15 份样本为一批次,稀释终浓度为 100 pmol/L 混样后取适量与模板载体一同进行乳液 PCR。在 ion one touch ES 上将乳液 PCR 产物富集,与测序质控模板、测序引物一同退火,加入到预处理后的测序芯片中上机测序。测序操作按照 DA8600 基因测序仪操作规程进行。

1.3.4 胎儿染色体信息分析:利用美国 life 公司二代测序平台及生物信息分析技术,对 2016 年 7 月~2018 年 5 月在重庆三峡中心医院基因检测中心行 NIPT 检测的 2 784 例 12~24 周的孕妇进行分析,对 NIPT 结果显示为高风险的孕妇实施羊膜腔穿刺及胎儿染色体核型分析,对 NIPT 结果显示为低风险的孕妇进行电话随访至出生后。

1.4 统计学分析 采用卡方检验对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 孕妇患染色体非整倍体疾病高风险阳性率 见表 1。行 NIPT 检测的 2 784 例孕妇,高风险 20 例,其中 21-三体高风险 12 例,18-三体高风险 3 例,13-三体高风险 5 例,阳性检出率为 0.72%(20/2 784)。≥40 岁孕妇患染色体非整倍体疾病高风险的阳性率为 2.97%,30~39 岁为 0.75%,<30 岁为 0.54%。

表 1 渝东北地区孕妇 NIPT 高风险年龄分布

年 龄	21-三体高风险	18-三体高风险	13-三体高风险	高风险例数	参检例数	高风险比例(%)
≥40 岁	1	1	1	3	101	2.97
30~39 岁	5	1	3	9	1 197	0.75
<30 岁	6	1	1	8	1 486	0.54
合 计	12	3	5	20	2 784	0.72

2.2 孕妇羊膜腔穿刺液细胞染色体核型分析 经检测,染色体非整倍体疾病为高风险的孕妇有 20 例,其中有 2 例孕妇未做羊膜腔穿刺分析,而直接进行引产终止妊娠,其余 18 例孕妇行羊膜腔穿刺液细胞染色体核型分析,发现 21-三体高风险有 11 例,18-三体高风险有 2 例,13-三体高风险有 4 例。把 NIPT 检测后的结果与金标准方法—羊膜腔穿刺液细胞染色体核型分析技术检测后的结果进行比较,发现 21-三体和 18-三体细胞染色体非整倍体异常高风险结果符合率为 100%(11/11, 2/2),

而 13-三体细胞染色体非整倍体异常高风险结果符合率为 80.00%(4/5),其中 1 例为假阳性结果,假阳性率为 20.00%(1/5)。故 NIPT 诊断胎儿染色体非整倍体疾病的诊断敏感度为 100.00%(2 784/2 784),诊断特异度为 94.44%(17/18),假阳性率为 0.03%(1/2 784),假阴性率为 0.00%(0/0)。

3 讨论 1997 年,香港中文大学卢煜明教授在怀有男性胎儿的孕妇外周血中扩增到了 Y 染色体的基因片段,因正常女性体内不含有 Y 染色体,从而说明孕妇外周血中存在胎儿游离 DNA,经进一步

检测发现, c-fDNA 主要来源于胎盘滋养层细胞, 从此开启了孕妇产前检测的新思路, 这就是 NIPT 技术的发现过程^[6]。NIPT 技术主要有两类: 一类是采用高通量全基因测序, 一类是采用靶向区域测序。NIPT 技术主要适用于如下疾病的检测, 如唐氏综合征(21-三体综合征)、爱德华氏综合征(18-三体综合征)和帕陶氏综合征(13-三体综合征)。目前, 这些染色体疾病尚无有效的治疗方法, 唯有通过早期的产前诊断来早发现, 而传统的血清学方法因假阳性率高、侵入性检查有一定风险、孕妇难以接受等缺点不能很好开展相关检测, 而 NIPT 技术针对这三大染色体非整倍体疾病的检测准确率高达 99% 以上, 远高于血清学筛查, 且假阳性率和假阴性率更低^[7-10], 故可作为当前产前检测胎儿染色体异常的最佳手段。

NIPT 技术是基于母体外周血中的 c-fDNA 的检测, 其含量与孕周密切相关, 据了解, c-fDNA 最早 4 周便可检出, 7 周建立胎盘循环后 c-fDNA 含量则以一定的比例稳步增加。NIPT 的检测精度与 c-fDNA 含量的多少有关, 当 c-fDNA 含量低于 4% 时, NIPT 可能检不出或出现假阴性结果^[11-12], 所以 NIPT 技术适用时间范围为($12^{+0} \sim 26^{+6}$)周, 最佳检测时间范围为($12^{+0} \sim 22^{+6}$)周, 如果从技术层面上讲, NIPT 检测孕周并无上限, 26^{+6} 孕周限制的原因是考虑到如果 NIPT 检测出现阳性结果, 那么后续会留出合适的时间来进一步确诊。

本研究显示, 渝东北地区胎儿染色体非整倍体疾病的阳性率为 0.72% (20/2 784), 年龄分布为 ≥ 40 岁孕妇为 2.97%, 30~39 岁为 0.75%, < 30 岁为 0.54%。NIPT 诊断胎儿染色体非整倍体疾病的敏感度为 100.00% (2 784/2 784), 总特异度为 94.44% (17/18), 总假阳性率为 0.03% (1/2 784), 假阴性率为 0.00% (0/0)。渝东北地区 NIPT 胎儿染色体非整倍体疾病的阳性检出率为 0.72%, 以 21-三体检出为主, 占 61%, 40 岁高龄孕妇 NIPT 阳性率较其他年龄组明显升高, 达 2.97%。

高通量基因组测序平台及生物信息分析技术具有很高的敏感度和特异度, NIPT 可提高产前诊断效率, 其敏感度、准确度与羊膜腔穿刺分析技术具有高度的一致性, 在快捷、安全、方便、患者易于接受的前提下, 能减少患儿的出生, 达到优生优育, 具有较高的临床和社会价值。

参考文献:

[1] 杨灿锋, 王峻峰, 朱云霞, 等. 15 230 例孕中期唐氏筛查产前诊断的临床应用价值[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(2): 142-145.

YANG Canfeng, WANG Junfeng, ZHU Yunxia, et al. Clinical application value of Down's syndrome screening in prenatal diagnosis: 15 230 pregnancies in the second trimester[J]. Journal of Obstetrics and Gynecology, 2011, 27(2): 142-145.

[2] HARTWIG T S, AMBYE L, SORENSEN, et al. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) - a systematic review[J]. Prenat Diagn, 2017, 37(6): 527-539.

[3] DRURY S, HILL M, CHITTY L S. Cell-free fetal DNA testing for prenatal diagnosis[J]. Adv Clin Chem, 2016, 76: 1-35.

[4] 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.

LUO Ying, LU Ting, TAO Jing, et al. Application of free fetal DNA detection in prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidy[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(7): 1481-1483.

[5] 翁慧男, 梁嘉颖, 曾伟宏, 等. 无创产前基因测序在胎儿染色体非整倍体基因检测中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(16): 2386-2388.

WENG Huiman, LIANG Jiaying, ZENG Weihong, et al. The application of non-invasive prenatal genetic sequencing for fetal chromosomal aneuploidy[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(16): 2386-2388.

[6] LO Y M, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. The Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.

[7] MACKIE F L, HEMMING K, ALLEN S, et al. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis[J]. BJOG, 2017, 124(1): 32-46.

[8] TAYLOR-PHILLIPS S, FREEMAN K, GEPPERT J. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Open, 2016, 6(1): 1-12.

[9] NSHIMYUMUKIZA L, MENON S, HINA H, et al. Cell-free DNA noninvasive prenatal screening for aneuploidy versus conventional screening: A systematic review of economic evaluations[J]. Clin Genet, 2018, 94(1): 3-21.

[10] 左娟, 刘洁, 朱瑾, 等. 无创基因检测(NIPT)对胎儿染色体异常筛查的临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5): 15-18.

ZUO Juan, LIU Jie, ZHU Jin, et al. Application of noninvasive prenatal testing in the screening of chromosome abnormality[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 15-18.

[11] IWARSSON E, JACOBSSON B, DAGERHAMN J, et al. Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population -a systematic review and meta-analysis[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017, 96(1): 7-18.

[12] ZHANG Bin, LU Beiyi, YU Bin, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood[J]. J Int Med Res, 2017, 45(2): 621-630.

收稿日期: 2019-01-25

修回日期: 2019-02-12
