

# 尿干化学法和离心沉渣镜检法检测穿刺羊水母体细胞污染的应用

林俊伟, 章 钧, 侯红瑛, 叶燕绸, 詹龙生, 刘 城

(中山大学附属第三医院妇产科, 广州 510630)

**摘要:**目的 探讨一种快速简便鉴别羊水母血污染的方案。方法 选取30例2019年6~10月羊水穿刺样本,检测羊水及母血DNA,将母血DNA污染量换算对应体积全血量建立羊水母血DNA污染梯度模型,运用尿干化学法及离心沉渣镜检法检测母血污染情况。结果 羊水母血DNA污染率为5%,10%,20%和30%,尿干化学法检出率分别为16.67%,60%,100%和100%;离心沉渣镜检法检出率分别为60%,100%,100%和100%。结论 尿干化学法及离心沉渣镜检法联合检测可更简便快捷地进行羊水母血污染鉴定,检出率与母血DNA污染率呈正比关系。

**关键词:**尿干化学法;离心沉渣镜检法;母体细胞污染

中图分类号:R446.19 文献标识码:A 文章编号:1671-7414(2020)05-090-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.05.023

## Application of Detecting Maternal Cell Contamination in Amniocentesis with Drop-Stick Test and Centrifugal Sediment Microscopy

LIN Jun-wei, ZHANG Jun, HOU Hong-ying, YE Yan-chou, ZHAN Long-sheng, LIU Cheng

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat - Sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract: Objective** To establish a quick and simple method to identify the maternal cell contamination in amniotic fluid. **Methods** 30 samples of amniotic fluid puncture samples from June to October 2019 were selected to detect the amniotic fluid and maternal blood DNA. The contamination amount of maternal blood DNA was converted into the corresponding volume and total blood volume to establish the gradient model of amniotic fluid blood DNA contamination. The Drop-stick test method and centrifugal sediment microscopy were used to detect the contamination of maternal blood. **Results** The contamination rate of maternal DNA was 5%, 10%, 20% and 30%, and the detection rate of drop-stick test was 16.67%, 60%, 100% and 100%. The detection rate of centrifuge sediment microscopy was 60%, 100%, 100% and 100%. **Conclusion** Combined detection of drop-stick test and sediment microscopy can more easily and quickly identify the maternal cell contamination in amniotic fluid. The detection rate is in direct proportion to the DNA contamination rate of mother blood.

**Keywords:** drop-stick test, centrifugal sediment microscopy, maternal cell contamination

产前诊断不断发展在提高人口素质,减少出生缺陷方面意义重大,但现有研究发现羊水母体细胞污染(maternal cell contamination, MCC)是影响产前诊断结果准确性的主要因素之一<sup>[1]</sup>。产前诊断羊膜腔穿刺有创性是导致羊水MCC主要原因,不同单位羊水穿刺MCC发生率差异较大,据相关报道羊水MCC发生可高达68%<sup>[2]</sup>,发生差异性跟穿刺者的经验、手法以及孕妇个体情况等有一定相关。大部分母血污染羊水性程度不明显,即使是离心后的非血性污染的羊水样本仍有存在MCC可能,需要进一步鉴别。目前鉴别MCC分子技术主要为荧光定量PCR(QF-PCR),基因芯片(CMA, SNP Array)等,现有技术对实验室条件要求高,操

作繁琐,设备昂贵,报告周期长,本研究通过联合使用尿干化学法和离心沉渣镜检法鉴定羊水MCC,寻找一种在报告周期、检测成本、操作过程等方面都优于分子检测技术的鉴定方法。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2019年6~10月孕16~24周在我院产检孕妇30例,具备产前诊断指征,遵照知情同意原则,采集羊水与全血样本。

1.2 仪器和试剂 仪器:移液器、1.5ml无菌离心管及无菌吸头,15ml无菌尖底离心管,台式高速离心机,旋涡振荡器,干燥仪或金属浴,尿干化学分析仪(罗氏u411),PCR扩增仪(9600美国ABI公司)。试剂:基因组DNA快速提取试剂盒,蛋白

酶 K, 0.25g/dl 胰酶, Buffer AL(德国 Qiagen 公司), 尿干化学试纸条(罗氏公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 羊水与全血 DNA 提取: 采集 10 ml 羊水标本 2 500r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 留取 200  $\mu$ l 的细胞沉淀液, 每份样品中加入 20  $\mu$ l 的蛋白酶 K, 200  $\mu$ l 的 buffer AL 震荡混匀, 金属浴 56℃ 孵育 10min, DNA 进行浓度纯度检测。取 200  $\mu$ l 全血同上操作提取 DNA 进行浓度检测。

1.3.2 收集 30 例全血(200  $\mu$ l/份)与羊水(10ml/管)样本提取 DNA: 结果按照 10% 母体 DNA 污染率换算出对应全血体积及与 10ml 羊水体积比, 换算方式:  $A=B*10\%/C$ , 其中 A 为 10ml 羊水中 10% 母体 DNA 污染的全血体积, B 为 10ml 羊水 DNA 总量, C 为每微升体积全血 DNA 浓度。根据 10% MCC 母血与羊水体积比建立分别为 5%, 10%, 20%, 30% MCC 污染梯度模型。

1.3.3 通过尿干化学法及沉渣镜检法对模型白细胞进行检测: 尿干化学法严格按照相关操作规范及说

明书进行操作, 结果判读: 结果  $\geq 1+$  为阳性, “neg”为阴性; 离心沉渣镜检: 标本离心 2 500/5min, 分离去上清液, 取沉渣 0.2ml 置于玻璃片上, 显微镜下计数白细胞数(WBC), 结果判读:  $WBC \geq 1/HP$  为阳性,  $WBC=0/HP$  为阴性。

1.4 统计学分析 计数资料采用率(%)表示, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

羊水 MCC 模型通过尿干化学法与离心沉渣镜检法联合检测, 污染率为 30%, 20% 时两种方法检出率均为 100%, 检出率一致; 污染率为 10% 和 5% 时尿干化学法检出率分别为 60%, 16.67%; 离心沉渣镜检法检出率分别为 100%, 60%, 两种方法在污染率为 10% 与 5% 的检出率差异均有统计学意义( $\chi^2=11.915\sim15.000$ , 均  $P<0.01$ )。尿干化学法对 20% 以上母体 DNA 污染检出率为 100%, 离心沉渣镜检法对 10% 以上母体 DNA 污染检出率为 100%, 两种方法检出率与污染率呈正比关系, 见表 1。

表 1 尿干化学法与沉渣镜检法检测 30 例不同比例羊水 MCC 结果分析

母体 DNA 污染比例 (%)	尿干化学法			沉渣镜检法		
	阴性	阳性	检出率 (%)	阴性	阳性	检出率 (%)
5	25	5	16.67	12	18	60.00
10	12	18	60.00	0	30	100.00
20	0	30	100.00	0	30	100.00
30	0	30	100.00	0	30	100.00

## 3 讨论

美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)制定产前诊断样本 MCC 的检测规范, 规范要求所有进行分子诊断和分子遗传学检测的产前标本都要常规进行 MCC 检测, 排除 MCC 的潜在影响, 来确保检测结果的准确性<sup>[3]</sup>。QF-PCR(荧光定量 PCR)是目前鉴定 MCC 常用技术, 但技术要求高, 周期长且无法检测低于 10% 母体 DNA 污染<sup>[4]</sup>。

羊水 MCC 是母体血细胞污染, 主要是由于羊膜腔穿刺出血导致, 通过快速检测全血中白细胞可以判断 MCC 存在。全血中性粒细胞占白细胞总数 55%~70%<sup>[5]</sup>, 尿干化学酯酶法是通过中性粒细胞破裂释放特异性中性粒酯酶水解吲哚酚酯生成吲哚酚和有机酸引起试纸条颜色发生变化来反映样本中中性粒细胞存在<sup>[6]</sup>, 由于羊水沉淀胎儿成分无白细胞, 当穿刺发生 MCC 时, 羊水沉淀中存在母体白细胞污染, 检测羊水白细胞成分可提示 MCC。本研究发现对于 MCC 大于 20% 时, 尿干化学法与沉

渣镜检法均做出阳性判断, MCC 低于 20% 时中性粒酯酶浓度降低, 尿干化学法检出率降低, MCC 污染比例为 10% 时, 尿干化学法在 30 例样本中 12 例检测结果为阴性, 检出率为 60%, 原因为随着污染比例降低, 中性粒酯酶浓度降低, 当中性粒酯酶浓度低于检测下限时检测结果为阴性。离心沉渣镜检法对 MCC 大于 10% 羊水样本检出率为 100%, 但随着污染比例降低每高倍镜视野下白细胞数量减少, 本研究在 MCC 比例为 5% 时发现 12 例样本镜下尽管能看到红细胞存在但视野下白细胞数为 0/HP, 结果划分为阴性, 增加计数在不同视野可发现个别白细胞, 但由于检出率低, 因此对低于 10% 母体 DNA 污染的羊水该方法检出率低。MCC 浓度影响两种方法的检出率, 两者呈正相关, 但对于 MCC 检出率影响还有一些羊水本身因素干扰。

羊水中糖及蛋白可导致尿干化学法检测结果偏低<sup>[7]</sup>, 而中性粒细胞酯酶释放需要中性粒细胞破裂为前提, 新鲜羊水样本中性粒酯酶浓度偏低影响尿干化学法检出率, 而沉渣镜检法在显微镜下观察白

细胞数量可更直观地反映 MCC 情况;羊水 pH 一般在 8.0~9.0,中性粒细胞在碱性环境中容易破裂<sup>[6]</sup>,当羊水样本存放时间过长时白细胞数破裂增多,沉渣镜检法结果可偏低或出现假阴性,而中性粒细胞破裂会释放出更多中性粒酯酶有助于提高尿干化学法检测率。因此尿干化学法与沉渣镜检法联合检测可以提高羊水 MCC 检出率。

一般情况下羊水 MCC 都会出现不同程度血性,高比例 MCC 根据血性外观可以判断存在污染,但并非所有高比例 MCC 羊水样本都呈血性外观。隐匿性绒毛膜羊膜炎一般无明显临床表现及监测手段,绒毛膜中性粒细胞增加形成一定梯度向羊膜腔移动<sup>[8]</sup>,羊膜腔穿刺时中性粒细胞或中性粒酯酶混入羊水导致 MCC 比例增加,由于没有红细胞混入,羊水外观无明显血性。尿干化学法可以直接检测中性粒酯酶存在,因此当发生隐匿性绒毛膜羊膜炎导致羊水 MCC 时,尿干化学法能更好地做出阳性判断。

综上所述,尿干化学法与沉渣镜检法联合检测可以作为羊水 MCC 鉴定手段,相对分子技术可节约成本,提高产前诊断效率,缩短报告等待周期,缓解患者焦虑心情,减轻患者经济负担同时对隐匿性绒毛膜羊膜炎有提示作用。

#### 参考文献:

- [1] LIN Xiaojie, LI Huafeng, LIU Ling, et al. Next generation sequencing as a new detection strategy for maternal cell contamination in clinical prenatal samples[J]. Ginekol Pol, 2018, 89(6): 326-334.
- [2] WEIDA J, PATIL AS, SCHUBERT FP, et al. Prevalence of maternal cell contamination in amniotic fluid samples[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017, 30(17):2133-2137.
- [3] American College of Medical Genetics and Genomics. Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2008[EB/OL].[2019-04-01]. [http://www.acmg.net/AM/Template.cfm?Section=Laboratory\\_Standards\\_and\\_Guidelines&Template=/CM/ContentDisplay.cfm&ContentID=5131](http://www.acmg.net/AM/Template.cfm?Section=Laboratory_Standards_and_Guidelines&Template=/CM/ContentDisplay.cfm&ContentID=5131). Accessed 6 March 2011.
- [4] 杨昕,李发涛,甄理,等.产前诊断病例母体细胞鉴定污染方法的建立及临床应用[J].中国妇幼健康研究,2015,26(4):815-817.  
YANG Xin, LI Fatao, ZHEN Li, et al. Establishing methods to detect maternal cells contamination in cases for prenatal diagnosis and clinical application[J]. Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2015, 26(4): 815-817.
- [5] 李瑞祥.血液分析仪白细胞分类计数结果与瑞氏染色镜检结果的比较[J].广西医学,2015,37(3):403-404.  
LI Ruixiang. Comparison of the results of leukocyte classification and counting by hematology analyzer and microscopic examination by Wright staining[J]. Guangxi Medical Journal, 2015, 37(3): 403-404.
- [6] 李高洪.尿干化学法与尿沉渣镜检红细胞和白细胞的结果比较分析[J].实验与检验医学,2014,32(4):442-443.  
Li Gaohong. Comparative analysis of the results of urine dry chemistry and urine sediment microscopic examination of red blood cells and white blood cells[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2014, 32(4): 442-443.
- [7] 夏琳,石茂翔,黎安玲.糖尿病患者尿糖水平与尿白细胞干化学及尿液炎症细胞因子的相关性研究[J].临床血液学杂志(输血与检验),2016,29(10):784-787.  
XIA Lin, SHI Maoxiang, LI Anling. Association between urine glucose level and urine leukocytes count and inflammatory factors in patients with diabetes mellitus[J]. Journal of Clinical Hematology, 2016, 29(10): 784-787.
- [8] 韩彤妍,杨孜,朴梅花.绒毛膜羊膜炎与胎儿及新生儿疾病[J].中国实用妇科与产科杂志,2016,32(6):529-534.  
HAN Tongyan, YANG Zi, PIAO Meihua. Chorioamnionitis and fetal and neonatal diseases[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2016, 32(6): 529-534.

收稿日期: 2020-02-01

修回日期: 2020-08-02

(上接第64页)

- [15] 张丽洁,李艳春,赵乔佳杰,等. TAP 检测对乳腺癌患者预后判断的意义[J].山西医科大学学报,2019,50(2):232-235.  
ZHANG Lijie, LI Yanchun, ZHAO Qiaojiajie, et al. Significance of tumor abnormal protein in the evaluation of prognosis of breast cancer patients[J]. Journal of Shanxi Medical University, 2019, 50(2): 232-235.
- [16] 赵云雪,李静,耿美玉.糖基化与肿瘤细胞周期[J].中国药理学通报,2006,22(8):908-912.  
ZHAO Yunxue, LI Jing, GENG Meiyu. Glycosylations

and cancer cell cycle [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(8): 908-912.

- [17] DUBE D H, BERTOZZI C R. Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4(6): 477-488.
- [18] PARTRIDGE E A, LE ROY C, DI GUGLIELMO G M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis[J]. Science (New York, NY), 2004, 306(5693): 120-124.

收稿日期: 2020-04-14

修回日期: 2020-04-29