

无创产前基因检测在产前筛查中的应用价值

黄家亮,何浩瑜,黄威祥,吴汉锋,谭超莉,甘桂春,李炎炎

(贵港市妇幼保健院遗传实验室,广西 贵港 537100)

摘要:目的 探讨无创产前基因检测技术在产前筛查中的应用价值。方法 选择 2018 年 1 月-2019 年 8 月在我院自愿选择无创产前基因检测的孕妇 5000 名,采集外周血浆应用高通量测序进行胎儿游离 DNA 检测,高风险者行胎儿羊水染色体核型分析,并对 5000 名孕妇妊娠结局进行追踪随访。结果 发现 57 名孕妇有异常情况,其中 21-三体 31 名,假阳性 2 名;18-三体 5 名,假阳性 3 名;13-三体 4 名,假阳性 3 名;性染色体异常 17 名,假阳性 7 名。随访显示 21-三体假阴性 1 名。结论 无创产前基因检测技术用于胎儿染色体非整倍体尤其是 21-三体的检测具有较高的准确性,但对于其他非整倍体检测的准确性还有待进一步提高。

关键词:无创产前基因检测;染色体;非整倍体;高通量测序技术

中图分类号:R714.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2020.07.056

文章编号:1006-1959(2020)07-0168-03

Application Value of Noninvasive Prenatal Genetic Testing in Prenatal Screening

HUANG Jia-liang, HE Hao-yu, HUANG Wei-xiang, WU Han-feng, TAN Chao-li, GAN Gui-chun, LI Yan-yan

(Genetic Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Guigang City, Guigang 537100, Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the application value of noninvasive prenatal genetic testing technology in prenatal screening. Methods Choose 5000 pregnant women who voluntarily choose noninvasive prenatal genetic testing in our hospital from January 2018 to August 2019, collect peripheral plasma and use high-throughput sequencing to detect fetal free DNA, and perform karyotype analysis of the fetal amniotic fluid chromosomes in high risk individuals, and follow-up of 5000 pregnant women's pregnancy outcomes. Results 57 pregnant women were found to have abnormalities, including 21-trisomy 31, 2 false positives; 18-trisomy 5, 3 false positives; 13-trisomy 4, 3 false positives; 17 sex chromosome abnormalities, 7 false positives. Follow-up showed 21-trisomy 1 false negative. Conclusion The noninvasive prenatal gene detection technology used in the detection of fetal chromosomal aneuploidy, especially 21-trisomy, has high accuracy, but the accuracy of other aneuploidy detection needs to be further improved.

Key words: Noninvasive prenatal genetic testing; Chromosome; Aneuploidy; High-throughput sequencing technology

无创产前基因检测技术是通过采集孕妇的外周血,利用二代测序技术对母体血浆中的游离 DNA 片段(平均长度 166 kb)测序,对测序结果进行生物信息学分析,从而获取胎儿的遗传信息,以评估胎儿患染色体非整倍体的风险。2012 年 9 月 12 日,卫生部发布的《中国出生缺陷防治报告(2012)》指出,我国出生缺陷发生率与世界中等收入国家的平均水平接近,约为 5.6%,每年新增出生缺陷数约 90 万例,染色体非整倍体疾病是胎儿畸形中较为常见的疾病,在胎儿畸形占比中高达 1/60,所以对孕妇进行染色体非整倍体产前检查具有十分重要的意义。目前,许多国内医疗机构相继采用了无创产前基因检测技术进行染色体非整倍体方面的检测,认为该技术对染色体非整倍体具有很高的准确性。基于此,本文对无创产前基因检测技术在贵港地区产前筛查的应用情况进行分析,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2018 年 1 月-2019 年 8 月在贵港市妇幼保健院遗传咨询后充分了解无创产前胎儿染色体非整倍体基因检测技术的前提下,签署知情同意书,自愿选择无创产前基因检测的 5000 名孕妇作为研究对象。孕妇年龄 18~43 岁,孕周 12~24 周,

≥35 岁高龄孕妇 1530 名(30.60%)。

1.2 无创产前基因检测技术 配套专用 K 管抽取孕妇静脉血 5 ml,冷冻离心机 4℃条件下 1600 r/min 离心 10 min,16000 r/min 离心 10 min 两步法分离血浆,提取血浆中游离 DNA,PCR 扩增,制备混合文库,制作纳米球,利用联合探针锚定聚合测序法进行测序,对测序数据进行生物信息学分析,参照正常人群数据库计算 Z 值来评估胎儿患染色体非整倍体的风险。

1.3 胎儿羊水染色体核型分析 通过绒毛膜穿刺、羊膜腔穿刺和脐带血穿刺进行染色体核型分析是判断胎儿染色体异常的“金标准”^[1]。胎儿羊水染色体核型分析按照 2010 年卫生部《胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准第 2 部分:胎儿染色体异常的细胞遗传学产前诊断技术标准》执行。孕妇术前需排空膀胱,取仰卧位,B 超仪实时引导下行羊膜腔穿刺,无菌抽取羊水,分装于 2 支 15 ml 管心管置离心机 1500 r/min 下离心 10 min,弃上清液余 2~3 ml 沉淀,沉淀与两种不同的羊水培养液混匀后分别接种于 2 个培养瓶,分别置于 2 个温度为 37℃,CO₂ 浓度 5%的培养箱中 7 d,倒置显微镜观察细胞生长情况,镜下可见多于 5 个克隆细胞时换液,使用无菌细胞刮刮下克隆,混匀继续培养,每天观察细胞生长情况,当羊水细胞贴壁生长旺盛,

作者简介:黄家亮(1980.6-),男,广西贵港人,本科,主管技师,主要从事分子、细胞遗传研究

加 20 $\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素 3 h 后收获细胞, 温度 28 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 70% 环境下制片, G 显带后使用蔡司全自动扫描系统进行染色体核型分析。

1.4 观察指标 对无创产前基因检测结果为 $-3 < Z < 3$ 的低风险孕妇的妊娠结局进行跟踪随访, $Z \geq 3$ 的高风险孕妇建议行羊水穿刺, 通过染色体核型分析和随访结果来验证无创产前基因检测的结果, 从而计算无创产前基因检测技术的检出率、阳性预测值、假阳性率。

2 结果

选择无创产前基因检测的 5000 名孕妇中 57 名筛查为高风险, 阳性率 1.14%。21-三体 31 例 (0.62%), 18-三体 5 例 (0.10%), 13-三体 4 例 (0.08%), 性染色体非整倍体异常 17 例 (0.34%)。其中 55 名选择了羊水产前诊断 (产前诊断率 96.49%), 确诊 21-三体 28 例, 18-三体 2 例, 13-三体 1 例。2 例未行产前诊断的孕妇随访均为性染色体非整倍体阴性, 随访中发现 1 例 21-三体假阴性。无创产前基因检测方法的 21-三体的检出率为 96.55% (28/29), 阳性预测值 90.32% (28/31), 假阳性率 0.06% (3/4971); 18-三体的检出率 100.00% (2/2), 阳性预测值 40.00% (2/5), 假阳性率 0.06% (3/4998); 13-三体的检出率 100.00% (1/1), 阳性预测值 25.00% (1/4), 假阳性率 0.06% (3/4999); 性染色体非整倍体的检出率 100.00% (8/8), 阳性预测值 53.33% (8/15), 假阳性率 0.18% (9/4992)。

3 讨论

染色体异常 (包括数目异常和结构异常) 是引起出生缺陷的主要原因, 临床上常见的染色体疾病有唐氏综合征 (21-三体)、爱德华综合征 (18-三体)、帕陶氏综合征 (13-三体)、特纳综合征 (45, X)、克氏综合征 (47, XXY), 大约占产前诊断疾病的 80%^[2]。这类染色体疾病主要表现为智力低下、生长发育迟缓、或合并有其他脏器多种畸形, 患有这类病症的儿童无疑给家庭和社会带来了巨大的负担。

目前染色体病并没有根治的方法, 唯一有效的措施为采取产前筛查和诊断的方式来减少患病胎儿的出生。对于染色体疾病的筛查, 目前我国普遍使用的两联、三联唐氏血清学产前筛查, 以及联合 B 超的综合筛查, 检出率只有 60%~80%, 假阳性率高达 5%。研究发现^[3], 产前筛查高风险人群染色体异常发生率仅为 2.14%, 说明大多数的孕妇可能会被过度产前诊断。不同的唐氏筛查组合仍有 5%~50% 的漏诊率, 漏诊多发生在唐氏筛查临界风险的孕妇中, 郑文吉等^[4] 研究发现, 宁波市 2012-2014 年 156498 例孕妇中唐氏综合症假阴性 14 例, 其中临

界风险占 10 例。Lewis C 等^[5] 研究发现, 20.1% 的唐氏筛查为临界风险的孕妇感到焦虑, 其希望获得安全、准确的进一步检查。临床上对胎儿染色体疾病的产前诊断主要是绒毛膜穿刺、羊水穿刺和脐带血穿刺的介入性产前诊断, 但介入性产前诊断技术具有一定的操作危险性, 可能导致胎儿宫内感染以及流产等不良后果, 其中流产率高达 1%^[6], 同时也给孕妇造成极大的心理负担。介入性诊断技术还需进行细胞培养, TAT 较长。因此, 寻求安全、快速、准确的产前诊断技术是优生优育的要求。随着 2016 年我国二胎政策的全面放开, 大量的高龄孕妇均需产前诊断, 现有的卫生资源将无法满足日益增加的产前诊断需要。

近年来, 随着居民生活水平的提高和优生优育意识的加强, 无创产前基因检测技术得以高速发展。Lo YM 等^[7] 研究证实存在有胎儿游离 DNA 片段, 为无创产前基因检测技术提供了依据。无创产前基因检测通过对母体血浆中游离胎儿 DNA 进行高通量测序, 可将唐氏综合征、爱德华综合征、帕陶氏综合征的检出率分别提升至 99%、96%、91%, 假阳性率从 5% 降至 0.35%^[8]。孕妇本人及家属顾虑有创的产前诊断方法对胎儿和孕妇的影响, 使得无创产前基因检测技术成为多数孕妇的选择。虽然无创产前基因检测被认为是一种精准的产前检测技术, 对于 21-三体、18-三体、13-三体及性染色体非整倍体具有较高的准确性, 可减少大量不必要的有创性产前诊断, 但同时无创产前基因检测技术存在着检测假阳性和假阴性的问题, 所以并不能取代介入性产前诊断。如何降低其假阳性、避免假阴性已经成为临床亟待解决的问题。本次研究发现, 57 例高风险孕妇中有 16 例胎儿羊水染色体核型分析结果正常, 也说明了无创产前基因检测技术存在假阳性问题。引起假阳性的主要原因有限制性胎盘嵌合、母体染色体嵌合、母体或胎儿基因组中拷贝数变异、双胎中一胎停育、母体存在恶性肿瘤等。因此在临床产前检查工作中, 无创产前基因检测只能作为传统血清学筛查方法的有益补充^[9], 胎儿染色体诊断还应以细胞遗传学为主。本研究结果发现, 无创产前基因检测技术检测 21-三体的准确率最高, 18-三体、13-三体和性染色体非整倍体的准确率均不高, 与夏开德等^[10] 的研究结果类似, 这必造成一部分孕妇因假阳性问题而选择介入性产前诊断。因此, 临床上应重视对假阳性问题的处理。

综上所述, 无创产前基因检测对于检测 21-三体有高精度性, 而且具有无创性的优点, 但对于 18-三体、13-三体及性染色体非整倍体异常的检测准

确性还有待提高。在临床工作中使用无创产前基因检测前要充分掌握临床应用指征与做好遗传咨询工作,有效指导优生优育、降低出生缺陷儿和提高人口素质。

参考文献:

- [1]唐新华,杨必成,朱妹,等.染色体核型分析与 Bo Bs 技术联合检测染色体异常和染色体微缺失综合征的产前诊断新模式的建立和应用[J].中华妇产科杂志,2016,51(5):325-328.
- [2]马婷婷,刘华平,侯朝晖,等.无创 DNA 检测技术对胎儿染色体非整倍体疾病的筛查效果 [J]. 空军医学杂志,2015,31(4):235-239.
- [3]柳爱华,宋奉侠,郝明革,等.母血清筛查 21-三体、18-三体高风险病例的产前诊断[J].中国产前诊断杂志(电子版),2012(4):8-10.
- [4]郑文吉,范琦慧,陈志央,等.中孕期血清三联筛查唐氏综合症假阴性病例分析[J].浙江预防医学,2015,27(11):1154-1156.
- [5]Lewis C,Hill M,Chitty LS,Women's experiences and preferences for service delivery of non-invasive prenatal testing for a-

neuploidy in a public health setting:a mixed methods study [J]. PLoS One,2016,11(4):e0153147.

[6]侯桂玉,郭跃文,蒋丽江,等.超声 NT、血清学筛查与无创产前基因检测联合筛查高危孕妇胎儿染色体非整倍体 580 例分析[J].深圳中西医结合杂志,2016,26(10):21-23.

[7]Lo YM,Corbetta N,Chamberlain PF,et al.Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J].Lancet,1997,350(9076):485-487.

[8]Gil MM,Quezada MS,Revello R,et al.Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies :updated meta-analysis [J].Ultrasound Obstet Gynecol,2015,45(3):249-266.

[9]侯巧芳,吴东,楚艳,等.孕妇外周血中游离胎儿 DNA 检测在无创产前诊断中的临床应用 [J]. 中华妇产科杂志,2012(47):813-814.

[10]夏开德,吴忠琴.无创 DNA 产前检测高风险的羊水细胞遗传学分析及临床意义[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(1):41-43.

收稿日期:2019-10-17;修回日期:2019-11-05

编辑/钱洪飞