

NIPT 在产前诊断中的临床应用

陈晓琴

(淮安市第一人民医院 遗传室,江苏 淮安 223300)

【摘要】 目的 探讨无创胎儿染色体非整倍体基因检测在产前诊断中的临床应用及价值。**方法** 2014年1月至2016年6月淮安市第一人民医院建卡产检的11 000例孕妇中选取血清学产前筛查高风险、血清学筛查临界风险及高龄孕妇1246例,进行无创胎儿染色体非整倍体基因检测,对于无创阳性孕妇抽取羊水细胞进行染色体核型分析,作为研究组;2008年1月至2011年1月淮安市第一人民医院建卡产检的15 000例孕妇中选取1650例血清学筛查高风险、血清学筛查临界风险及高龄孕妇进行羊水穿刺核型分析作为对照组。**结果** 研究组1246例孕妇中无创DNA检测与羊水染色体核型分析结果相比,21-三体检出率为100%,无创DNA假阳性率为0。18-三体检出率为100%,假阳性率为0。研究人群染色体患儿检出率90%、产前诊断参加率98.7%;对照组1650例孕妇中,21-三体检出率为78%。18-三体检出率为100%,研究人群染色体患儿检出率78%、产前诊断参加率53.3%。**结论** 胎儿染色体非整倍体无创基因检测在产前诊断中因其具有敏感度及特异度高及无创等优点,运用于临床可明显降低先天性缺陷儿出生率。

【关键词】 基因检测;产前诊断;胎儿染色体非整倍体

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective In order to investigate the clinical application and the value of fetal chromosomal aneuploidy noninvasive genetic testing in prenatal diagnosis. **Method** 1246 pregnant women were selected to fetal chromosomal aneuploidy noninvasive genetic testing, they were high-risk or critical-risk in serological screening in January 2014 to June 2016 who checked the cards in our hospital. Karyotype analysis was carried out on positive pregnant women by amniocentesis. It is the study group. 1650 pregnant women were selected to fetal chromosomal aneuploidy noninvasive genetic testing, they were high-risk or critical-risk in serological screening in January 2008 to January 2011 who checked the cards in our hospital. Karyotype analysis was carried out on positive pregnant women by amniocentesis. It is the control group. **Results** eight cases were detected in 1246 pregnant women, including 6 cases of trisomy 21, 2 cases of trisomy 18. Compared with amniotic fluid karyotype analysis, the examination of trisomy 21 was 100%, false positive rate was 0%, and the examination of trisomy 18 was 100%, false positive rate was 5.0%. 90% chromosomal abnormalities were detected in study population and prenatal diagnosis participation rate was 98.7%, the detection rate of trisomy 21 was 78%, the examination of trisomy 18 was 100% in control group. 78% chromosomal abnormalities was detected in study population and prenatal diagnosis participation rate was 53.3%. **Conclusions** Fetal chromosomal aneuploidy noninvasive genetic testing has a high sensitivity and specificity in prenatal diagnosis; it can be used as the supplementary means of serology, to reduce the birth rate of congenital defects.

【Key words】 genetic testing; prenatal diagnosis; fetal chromosomal aneuploidy

我国新生儿缺陷发生率为5.6%，如果孕期得不到尽早准确的诊断，将会导致缺陷胎儿出生。虽然血清学检查已经在产前诊断中发挥了重要的作用，但临床上21-三体、18-三体等染色体非整倍体异常胎儿出生率仍然较高^[1]。同时，血清学产前筛查仍存在5.0%~8.0%的假阳性率，导致部分孕妇进行不必要的侵入式检查，增加了流产、早产、宫内感染率。近年来，胎儿染色体非整倍体基因检测在部分产前诊断中得到应用，该方法属于一种无创性操作，能进一步提高产前筛查产前诊断准确性^[2]。1997年，香港中文大学卢煜明教授^[3]证实了孕妇外周血中存在胎儿游离DNA，通过对孕母外周血中胎儿游离DNA进行测序及生物信息分析，最终可实现对胎儿的三体患病风险进行评估。为了探讨胎儿无创性基因检测在产前诊断中的临床实际应用价值，本研究选取2014年1月至2016年6月在淮安市第一人民医院建卡的11 000名孕妇血清学产前筛查高风险、临界风险及高龄孕妇共1246例，进行无创胎儿染色体非整倍体基因检测，检测阳性者进行羊膜腔穿刺；取2008年1月至2011年1月在淮安市第一人民医院建卡的15 000名孕妇血清学产前筛查高风险、临界风险及高龄孕妇共1650例，知情同意后行羊膜腔穿刺。两组对比确定无创胎儿染色体非整倍体介入临床后胎儿非整倍体检出率改变情况。

1 资料与方法

1.1 临床资料 2014年1月至2016年6月本院建卡产检的11 000例孕妇中选取血清学产前筛查高风险、血清学筛查临界风险及高龄孕妇1246例，进行无创胎儿染色体非整倍体基因检测，对于无创阳性孕妇抽取羊水细胞进行染色体核型分析，作为研究组；孕周12~23周，年龄19.5~38.5岁抽取孕妇外周血行无创胎儿染色体非整倍体基因检测，检测阳性者在合适孕周行羊膜腔穿刺及染色体核型分析。选取2008年1月至2011年1月本院建卡产检的15 000例孕妇中选取1650例血清学产前筛查高风险、血清学筛查临界风险及高龄孕妇进行羊水穿刺核型分析作为对照组，孕周12~23周，年龄20~

35.5岁。本研究排除标准：①多胞胎孕妇；②排除接受过移植手术者或干细胞者；③排除孕妇4周内接受过免疫治疗者；④夫妻双方有染色体病携带可能，基因病家族史；⑤超声检查胎儿有结构畸形。本次临床诊断试验均经孕妇、家属同意，试验通过医院伦理会批准，孕妇一般资料差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 无创胎儿染色体非整倍体基因检测 获得孕妇知情同意后，抽取5ml孕妇静脉血，EDTA抗凝管无创采血管，在4℃预冷离心机内1600×g离心10分钟，取上清液置于无菌离心管中。初步分离的血浆在4℃下再次以1600×g离心10分钟，以去除残存的细胞。提取血浆中游离DNA，制备测序文库并进行质控，采用Illumina HiSeq2500高通量测序仪进行检测，应用生物信息学工具放大并分析外周血中不同染色体水平的差异，从而精确识别胎儿染色体非整倍体异常，最终得出胎儿患染色体非整倍体疾病(21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征等)的风险概率。对于基因检测21-三体综合征、18-三体综合征和13-三体综合征阳性或高风险者，则需要完成介入性产前诊断。

1.2.2 羊膜腔穿刺及羊水染色体核型检测 在超声引导下，经腹壁穿刺抽取羊水30ml并置于无菌BD管内保存。实验室内细胞培养及收获、制片，分析染色体核型。

1.2.3 对照组 600例临界风险孕妇现行超声检查发现胎儿染色体病软指标后知情沟通后行羊膜腔穿刺。

1.2.4 随访 对所有纳入研究的孕妇所生胎儿进行生后随访，时限为出生后半年，电话通知至儿保门诊体检。

2 结果

2.1 胎儿染色体非整倍体检测结果 研究组1246例孕妇中9名孕妇检测结果阳性，其中7例21-三体综合征阳性，2例18-三体综合征阳性，与羊水染色体核型检测结果相比，胎儿染色体非整倍体无创基因检测21-三体综合征检出率100%，18-三体综合征检出率100%。胎儿染色体非整倍体无创基因检

测敏感度为 100%(8/8),特异度为 99.91%(1245/1246),假阳性率为 0.08%(1/1246),假阴性率为 0(0/1246),见表 1,其中 1 例高龄孕妇拒绝产前诊断漏诊 1 例 21-三体患儿。人群染色体患儿检出率 90%,产前诊断参加率 98.7%,对照组 1650 例诊断人群染色体患儿检出率 90%,产前诊断参加率 98.7%,诊断出染色体患儿 11 例,漏诊 4 例见表 2、3。染色体病检出率 78%,漏诊率 22%,产前诊断参加率 53.3%。1 例孕妇 DS 高风险(1/140),未行产前诊断,足月在本院分娩 1 例 21-三体儿,1 例 36 岁孕妇因胎儿珍贵拒绝产前诊断,分娩 1 例 21-三体儿,1 例临界风险拒绝进一步检查(1/500),1 例唐氏筛查低风险(1/2530)产后随访为 21-三体儿。

表 1 胎儿染色体非整倍体无创基因检测与羊水染色体核型检测结果比较

序号	孕周	无创检测结果	产前诊断核型	是否引产
1	18	21-三体阳性	47,XN,+21	是
2	17	21-三体阳性	47,XN,+21	是
3	18	21-三体阳性	47,XN,+21	是
4	19	21-三体阳性	47,XN,+21	是
5	18	21-三体阳性	47,XN,+21	是
6	16	21-三体阳性	47,XN,+21	是
7	15	18-三体阳性	47,XN,+18	是
8	17	18-三体阳性	46,XN	否

表 2 2008~2011 年在本院建卡的孕妇 15 000 例(300 例孕妇为高龄未进行血清学筛查)

分类	血清学筛查高风险例数	羊水穿刺染色体检查(例)	产前诊断核型(例)
高风险	18-三体 10 例	10	18-三体 2 例
	21-三体 740 例	700	21-三体 7 例
临界风险	600	20	21-三体 0 例
高龄	300	150	21-三体 2 例
漏诊	21-三体 4 例		

表 3 2014~2016 年在本院建卡的孕妇 11 000 例(200 例孕妇为高龄未进行血清学筛查)

分类	血清学筛查高风险例数	无创 DNA(例)	羊水穿刺(例)	产前诊断核型
高风险	18-三体 20 例	10	5	18-三体 2 例
	21-三体 600 例	600	1	21-三体 5 例
临界风险	426	420	2	21-三体 0 例
高龄	200	190	2	21-三体 2 例
漏诊	0			

表 4 对照组与研究组比较

年限	染色体异常检出率(%)	漏诊率(%)	参加诊断率(%)
2008~2011 年(对照组)	78	22	53.3
2014~2016 年(研究组)	90	10	98.7

注:与对照组染色体异常检出率相比, $\chi^2=2.34,P<0.05$;与对照组漏诊率相比, $\chi^2=3.45,P<0.05$;与对照组参加诊断率相比, $\chi^2=5.02,P<0.05$

2.2 出生后结果随访 所有纳入本研究的孕妇电话随访至出生后半年,必要时电话通知至儿保门诊进一步诊断,对照组电话随访发现 4 例漏诊,研究组发现 1 例漏诊。

3 讨论

胎儿出生缺陷发生率较高,主要是由于胚胎或胎儿在发育过程中发生结构和功能上的异常,我国每年约有新生儿 2000 万,其中约有 80 万~120 万的出生缺陷,全国新生儿缺陷率为 5%以上。染色体病是造成新生儿出生缺陷最为常见的遗传性疾病,且临床上缺乏理想的治疗方法^[4]。目前,临床上常见的染色体异常疾病包括 21-三体综合征、18-三体综合征及 13-三体综合征。数据报道显示^[5],我国唐氏综合征发生率为 1/600~1/800,我国每年有 26 600 例唐氏儿出生,平均每 20 分钟就有 1 例唐氏儿出生。常规的诊断方法为血清学筛查出高风险人群后进行有创侵入性产前诊断,血清学筛查是血液生化指标结合孕妇的预产期、体重、年龄和孕周等指标计算生出唐氏患儿的危险系数。因其影响因素较多,且不是直接针对遗传物质的检测,由此计算得出的风险值误差很大,假阳性和漏诊率较大。唐氏筛查的检出率只有 60%~70%左右,漏诊率高达 30%~40%,因此唐筛低危孕妇也可能孕有唐宝宝;而唐筛结果高危的孕妇大部分经产前诊断确诊均孕正常胎儿。因其筛查假阳性率高导致大量不必要的有创检查,本研究中对对照组因无创 DNA 的介入,大批临界风险及高龄孕妇,及少数高风险孕妇需进一步诊断的孕妇因惧怕有创检查权衡利弊后放弃有创检查而导致高漏诊率的产生(22%),产前诊断接受率仅 53.5%,有创检查率 53.3%(表 4);研究组因无创 DNA 的介入,孕妇对产前诊断的依从性明显升高,产前诊断率 98.7%,有创检查率 7.2%,染色体

患儿漏诊率 10%。

无创基因检测属于是一种新型的产前诊断方法,该方法是基于提高产前诊断准确性、降低产前诊断技术风险为主要目的。文献报道显示^[6],孕妇最早在第 4 周的母血中就能测出胎儿游离的 DNA,且妊娠 7 周后检测结果最可靠,胎儿游离的 DNA 浓度或随着孕龄的增加而不断提高。通常来说每周增长速度为每毫升 4.2 个基因组,并且利用基因检测准确率超过 97.9%,能帮助胎儿早期诊断,了解胎儿生长情况,为后续采取有效的应对措施提供依据。随着技术的日渐成熟,基因检测在产前诊断中得到非常广泛的应用,且效果理想。本研究中,1246 例孕妇中 9 名孕妇胎儿染色体非整倍体无创基因检测结果阳性,其中 7 例 21-三体综合征阳性,2 例 18-三体综合征阳性,与羊水染色体核型检测结果相比,胎儿染色体非整倍体无创基因检测 21-三体综合征检出率 100%,18-三体综合征检出率 100%,华大及贝瑞和康等各大无创检测公司都是宣称准确率在 99%以上。这与 Chen 等^[7]对 329 例孕妇外周血 DNA 进行基因测序,检测出 25 例 13-三体和 34 例 18-三体,检出率分别是 100%和 91.9%基本相符。随后 Palomaki 等^[8]及 Dan 等^[9]的研究也得到了相似的结果,证明了此结论的可靠性。

这一方面可以解决血清学筛查特异性低,假阳性过高而导致孕妇及家属不必要的担心及焦虑,另一方面还能有效避免羊膜腔穿刺等有创操作可能引起的流产、宫内出血、感染等并发症。

目前影响无创 DNA 检测数据的因素主要是 cfDNA 在孕妇血浆游离 DNA 中的含量,检测中出现的假阳性结果和检测失败的样本大多数是由于胎儿 DNA 含量过低($<3\%$),因此解决 cfDNA 含量低对检测灵敏度的影响是胎儿染色体非整倍体检测的最大技术难题。未来在方法学上通过进一步优化生物信息学分析流程可使无创基因检测的准确率达到诊断要求,这将会避免大多数有创检查给孕妇带来的痛苦。目前多家实验室已在试行将胎儿游离 DNA 检测用于单基因遗传病的筛查及检测并取得了初步成果,未来将可能通过无创 DNA 迎来无创产前诊断时代,这是未来产前筛查检测领域的发展

趋势。

综上所述,胎儿染色体非整倍体无创基因检测在产前诊断中具有敏感度高、特异度高、无创等优点,具有其他筛查技术无可比拟的优越性,能有效缓解孕妇及家属的心理负担,大大降低先天性缺陷儿出生率。可作为一种高精密筛查检查方法运用于临床,因其费用高,技术难度大,且不能包括 OSB 筛查,目前还不能完全取代血清学筛查。

参 考 文 献

- [1] 侯朝晖,刘华平,陈冰,等. 无创 DNA 检测在唐氏综合征产前筛查中的作用[J]. 现代生物医学进展,2013,13(8):1508-1510.
- [2] 李玉芝. 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]. 华中科技大学学报,2012,41(4):1672.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet,1997,350(9076):485-487.
- [4] 赵晓曦,苏日娜,谷孝月,等. 无创产前基因检测技术的临床应用价值[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(2):10920-10922.
- [5] 窦琳琳,杨国绘,楼乐飞,等. 杭州市萧山区 25796 例产前筛查结果回顾性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(14):2090-2093.
- [6] 宋亦军,刘俊涛. 无创产前检测技术在胎儿非整倍体产前检测的应用现状及前景[J]. 中华围产医学杂志,2013,16(10):627-631.
- [7] Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing [J]. PLoS One,2011,6(7):e21791.
- [8] Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study[J]. Genet Med,2011,13(11):913-920.
- [9] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomy 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors[J]. Prenat Diagn,2012,32(13):1225-1232.

(收稿日期:2016-07-30)

编辑:宋文颖