

QF-PCR 技术检测 4262 例胎儿常见染色体非整倍体结果回顾分析

周伟宁¹ 杜倩怡¹ 钟志成¹ 何天文¹ 张艳霞¹ 唐纯芳^{2*}

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442; 2. 广东省妇幼保健院 新生儿外科, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 回顾分析荧光定量聚合酶链反应(quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR)技术对常见染色体(21、18、13、X/Y)非整倍体产前诊断的结果,评价其应用价值。了解不同产前诊断指征诊断为常见染色体非整倍体的阳性率,从而对遗传咨询提供参考依据。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2018 年 12 月在广东省妇幼保健院进行产前诊断的标本 4262 例,用 QF-PCR 和染色体核型分析的方法双盲检测,统计 QF-PCR 的符合率、灵敏度和特异度及不同产前诊断指征诊断为染色体非整倍体的阳性率。**结果** 与金标准染色体核型分析比较,QF-PCR 快速诊断常见染色体(21、18、13、X/Y)非整倍体阳性数 305 例,漏诊 4 例低比例非整倍体嵌合体,另外有 1 例 21-三体嵌合体 QF-PCR 阳性,而核型分析阴性,符合率 98.8%,灵敏度和特异度分别为 85.9%和 99.9%,剔除常见 5 条染色体非整倍体检测范围以外的阳性标本,灵敏度和特异度分别为 98.7%和 99.9%。不同的产前诊断指征中诊断为常见染色体非整倍体的阳性率:无创产前基因筛查高风险(77.6%);颈项透明层厚度增厚(10.7%);胎儿超声异常(9.0%);唐氏综合征血清学筛查高风险(8.2%);孕妇年龄 ≥ 35 岁(4.4%);高危妊娠(3.9%);不良孕产史(1.0%)。**结论** QF-PCR 快速诊断常见染色体(21、18、13、X/Y)非整倍体,灵敏度和特异度高,但对低比例嵌合体非常容易漏诊,两种结果不符合时,不能完全依靠染色体核型分析诊断,了解不同产前诊断指征的阳性率,对遗传咨询有一定的指导价值。

【关键词】 荧光定量聚合酶链反应; 产前诊断; 非整倍体; 嵌合体

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Retrospective analysis of 4262 cases of common chromosome aneuploidy detected by QF-PCR

Zhou Weining, Du Qianyi, Zhong Zhicheng, He Tianwen, Zhang Yanxia, Tang Chunfang*

Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400, China

* Corresponding author: Tang Chunfang, E-mail: 978743784@qq.com

【Abstract】 Objective To assess the application value of quantitative fluorescence polymerase chain reaction(QF-PCR)for rapid prenatal diagnosis of common chromosome (21, 18, 13, X/Y) aneuploidies; Understand the positive diagnosis rate of chromosome aneuploidy in different prenatal diagnostic indications and provide reference for genetic counseling. **Methods** 4262 specimens of prenatal diagnosis in our hospital from January to May 2018 were selected and tested by QF-PCR and karyotype analysis. The coincidence rates, sensitivity and specificity of QF-PCR, and the positive rate of aneuploidy in different prenatal diagnostic indications were statistically analyzed. **Results** Compared with the gold standard karyotype analysis, QF-PCR rapidly diagnosed 305 cases of common aneuploidy (21, 18, 13, X/Y), 4 cases of low-grade aneuploid chimera were missed, and another 21-trisomy chimera was positive for QF-

PCR, while the karyotype analysis was negative, the coincidence rate was 98.8%, and the sensitivity and specificity were 85.9% and 99.9%. Excluding positive samples from the common 5 chromosome aneuploidy detection range, the sensitivity and specificity were 98.7% and 99.9%. Different prenatal diagnostic indications have different positive rates of chromosome aneuploidy, Non-invasive Prenatal Testing (77.6%); Nuchal translucency thickening (10.7%); Fetal ultrasound abnormalities (9.0%); Down's screening high risk (8.2%); advanced age (4.4%); high-risk pregnancy (3.9%); poor pregnancy history (1.0%). **Conclusion** QF-PCR can rapidly diagnose the aneuploidy of common chromosomes (21, 18, 21, X/Y) with high sensitivity and specificity, but it is easy to miss the diagnosis of chimera. When the two results are not met, the karyotype analysis diagnosis cannot be completely relied on. The positive rate of different clinical diagnosis has certain guiding value for prenatal genetic counseling.

【Key words】 Quantitative fluorescence polymerase chain reaction; Prenatal diagnosis; Aneuploidy; Chimera

染色体异常是导致出生缺陷最常见的遗传病之一,新生儿各种染色体异常的发生率约为 1/160,主要包括数目异常和结构异常,其中数目异常更为常见^[1]。常见的 5 条染色体数目异常包括 21、18、13、X、Y,引起了 80%~90% 以上的有临床重大意义的染色体疾病^[2,3]。随着产前诊断技术的发展,社会的科普及孕妇对其认识度的提高,诊断染色体数目异常的技术已在临床上得到普遍的应用,传统的染色体核型技术已经应用了很多年了,其金标准的地位至今没被取代,但其报告周期长,实验受环境影响大,有一定的失败率,孕妇及家属心情非常焦虑,不利于孕期健康,甚至可能引起医患矛盾^[4]。因此,一项快速稳定的检测技术对染色体非整倍体的产前诊断非常具有临床价值。荧光定量聚合酶链反应 (quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR) 技术利用荧光引物对染色体上特异的多态性短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 位点进行扩增,通过毛细管电泳,用荧光变量双峰的比值对染色体数目进行判断,这种技术方法具备快速、方便、成本低、通量高等优点,而且还能进行污染鉴定,在国内外一些大型的产前诊断机构得到了广泛的应用^[5-7],这一技术在报告周期上比核型分析具有较大的优势^[8]。很多孕妇对筛查高风险非常的恐惧, QF-PCR 能在 48 小时内出结果,结果阴性就基本排除了 80% 以上的染色体疾病,可以减轻孕妇的心理负担,对孕期检查有很大的指导

作用。我们实验室的 QF-PCR 选择杂合度高的 STR 位点比一般实验室多,共 24 个,那准确率有多高呢? 会不会出现假阳性或假阴性? 本研究收集了产前诊断的病例标本 4262 例,将病例标本用 QF-PCR 和染色体核型分析两种方法检测后的结果进行比较,评估 QF-PCR 技术在大数据支持下的灵敏度和特异度,深入探讨 QF-PCR 在染色体非整倍体产前诊断应用中的能力。另外,需要进行 QF-PCR 检测的原因有好几种,我们统计染色体非整倍体在不同的产前诊断指征中的阳性率,了解数据对临床咨询的参考意义。

1 资料与方法

1.1 基本资料 收集 2018 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 30 日在广东省妇幼保健院医学遗传中心门诊进行产前诊断的高风险孕妇的标本,并用 QF-PCR 共成功检测 4262 例,染色体核型分析成功检测 4254 例,8 例培养失败。高风险的指标包括孕妇年龄 ≥ 35 岁、唐氏综合征血清学筛查高风险、无创产前基因筛查高风险、超声软指标异常、染色体异常儿生育史等。

1.2 方法 所有进行产前诊断的孕妇都签署知情同意书,绒毛穿刺在 11~14 周,羊水穿刺在 16~24 周,脐血穿刺在 24 周之后。绒毛标本 210 例,羊水标本 3940 例,脐血标本 112 例。羊水标本采集 20ml,其中 15ml 用于核型分析,5ml 用于 QF-PCR;

脐血标本 2ml, 1.5 ml 用于核型分析, 0.5 ml 用于 QF-PCR。

1.2.1 染色体核型分析 核型分析首先按照常规细胞培养, 制片 G 显带, 参照 ISCN(2009) 标准进行核型分析。

1.2.2 QF-PCR

1.2.2.1 DNA 提取预处理 ①绒毛: 在显微镜下挑取绒毛 2 根, 用生理盐水清洗后加入蛋白酶 K 和 ATL 组织裂解液 200 μ l, 56℃ 水浴 5~10 分钟直到组织溶解; ②羊水: 2200rpm/min 离心 10min, 去上清留细胞液 200 μ l; ③脐血: 混匀后取 200 μ l。

1.2.2.2 采用 QIAGEN 试剂盒对预处理的标本按照说明书提取步骤进行处理。

1.2.2.3 引物合成 引物设计从 NCBI 数据库中选取 5 条染色体中 24 个多态位点作为引物序列。13 号染色体位点 4 个: D13S305、D13S628、D13S634 和 D13S742; 18 号染色体位点 5 个: D18S978、D18S386、D18S391、D18S535 和 D18S1002; 21 号染色体位点 7 个: D21S1411、D21S1412、D21S1414、D21S11、D21S2039、D21S1435、D21S1437, 性染色体的 STR 位点 8 个: AMEL、SRY、DXS7423、X22、DXS1187、DXS981、DXYS218、DYS448。检测位点的引物上游 5' 端采用不同荧光标记, 引物的合成和标记由 TAKARA 公司完成。

1.2.2.4 扩增 ①TAKARA 公司的 PCR 反应混合液 25 μ l, 引物 7.5 μ l, DNA 模板 5 μ l, 总体积 25 μ l。使用 ABI9700PCR 仪器进行扩增。②反应条件: 95℃ 预变性 5min 后, 94℃ 变性 30s, 最适退火温度保温 30s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环, 72℃ 延伸 60min, 置 4℃ 保存。

1.2.2.5 毛细管电泳检测 ①取 9 μ l 的上样液(甲酰胺 8.6 μ l 加分子内标 internal lane standard 600 0.4 μ l)和 1 μ l PCR 产物混合; ②PCR 仪器 95℃ 变性 5min 后放冰上 5min; ③ABI 3500 测序仪采用 POP-4 凝胶进行毛细管电泳。

1.2.2.6 结果分析 ①将电泳数据结果导入软件 Gene Scan3.7 进行分析。②根据国际公认的判断标准(ACC/CMGS)对结果进行判断。正常: STR 位点两个等位基因荧光信号峰面积比例在 0.8~1.

4 之间。三体: STR 位点等位基因扩增产物电泳后呈现 3 个荧光峰, 峰面积的比例约为 1:1:1; 呈现的是双峰, 比例 >1.8 或 <0.65 。如果 STR 位点的等位基因呈现的是单峰, 认为是无效峰, 每一条染色体必须要有两个以上 STR 位点异常才能判断为异常。

2 结果

2.1 QF-PCR 检测结果 成功检测总例数 4262 例, 正常 3957 例, 占总例数 92.8%, 阳性数是 305 例, 阳性率为 7.2%, 其中 21-三体 184 例, 占总阳性例数的 60.3%, 18-三体 62 例(20.3%), 13-三体 24 例(7.9%), X 单体 12 例(3.9%), XXY10 例(3.3%), XYY6 例(2.0%), XXYY2 例(0.7%), 21-三体嵌合体 3 例(1.0%), X/XX 嵌合体 2 例(0.7%)。

2.2 染色体核型分析结果 送检标本 4262 例, 成功检测 4254 例, 其中有 8 例培养失败, 成功率 99.8%。在成功检测的 4254 例标本中, 结果正常有 3900 例, 占 91.7%。阳性标本 354(8.3%), 其中包括非整倍体 300 例(21-三体 184 例, 18-三体 62 例, 13-三体 24 例, X 单体 12 例, XXY 10 例, XYY 6 例, XXYY2 例), 46 例结构异常和 8 例嵌合体。

2.3 两种方法验证对比 4262 例 QF-PCR 检测标本用染色体核型分析金标准进行验证, 其中 8 例培养失败, 这 8 例标本用 QF-PCR 检测为阴性。将两种方法都成功地对 4254 例标本进行比较, 304 例非整倍体符合。结构异常共 46 例, 不在 QF-PCR 的检测范围内。核型分析检测出的 8 例嵌合体中, QF-PCR 只检测出 4 例, 漏诊率达 50%。有 1 例嵌合体 QF-PCR 检测阳性, 而核型分析是阴性(表 1)。以染色体核型分析作为检测金标准, QF-PCR 技术的灵敏度为 85.9%, 特异度为 99.9%(表 2)。把结构异常等不在检测范围内的标本剔除后的灵敏度和特异度分别为 98.7% 和 99.9%(表 3)。

2.4 不同产前诊断指征的染色体非整倍体的阳性率 根据这些孕妇的就诊病历, 按最主要的产前诊断指征, 我们大概分为以下常见几类, ①唐氏综合征筛查高风险; ②无创产前基因筛查高风险; ③胎儿超声异常包括发育迟缓、脑室增宽、唇腭裂、羊水过多、羊水过少、心脏异常, 脐血流异常等; ④颈项透明层厚度(nuchal translucency, NT)增厚; ⑤不良孕产史

表 1 4262 例样本产前诊断结果对比				
核型分析结果	例数 (例)	QF-PCR 检出例数 (例)	QF-PCR 未检出例数 (例)	符合率 (%)
46,XY 或 46,XX	3896	3895	0	99.9
21-三体	184	184	0	100.0
18-三体	62	62	0	100.0
13-三体	24	24	0	100.0
45,X	12	12	0	100.0
47,XXY	10	10	0	100.0
47,YYY	6	6	0	100.0
47,XXX	4	4	0	100.0
48,XXYY	2	2	0	100.0
Mos47,XX,+21[18]/46,XX[32]	1	1	0	100.0
Mos45,X[16]/46,XX[34]	1	1	0	100.0
Mos47,XY,+21[27]/46,XY[73]	1	0	1	100.0
Mos47,XY,+21[7]/46,XY[43]	1	0	1	0.0
Mos47,XX,+21[24]/46,XX[26]	1	1	0	100.0
Mos 47,XXX[7]/46,XX[93]	1	0	1	0.0
Mos45,X[20]/46,XX[30]	1	1	0	100.0
Mos47,XY,+18[10]/46,XY[40]	1	0	1	0.0
21-三体嵌合体	0	1	0	0.0
结构异常	46	0	46	0.0
总计	4254	4204	50	98.8
培养失败	8	8	0	
合计	4262	4212	50	98.8

表 2 统计 QF-PCR 的灵敏度和特异度(例)			
QF-PCR 检测结果	染色体核型分析		合计
	+	-	
+	304	1	305
-	50	3899	3949
合计	354	3900	4254
注:灵敏度=304/(304+50)×100%=85.9% ,特异度=3899/(1+3899)×100%=99.9%;+表示检测结果阳性;-表示检测结果阴性。			

表 3 统计 QF-PCR 的灵敏度和特异度(例)			
QF-PCR 检测结果	染色体核型分析		合计
	+	-	
+	304	1	305
-	4	3899	3903
合计	308	3900	4208
注:灵敏度=304/(304+4)×100%=98.7% ;特异度=3899/(1+3899)×100%=99.9%;+表示检测结果阳性;-表示检测结果阴性。			

包括生育过唐氏患儿,胎死宫内等;⑥孕妇年龄≥35 岁等等,笔者尝试对这些常见的高风险指标最终诊

断为染色体非整倍体的阳性率进行分类统计,详细见表 4。

表 4 不同产前诊断指征的染色体非整倍体的阳性率(例)			
临床诊断	例数 (例)	阳性例数 (例)	阳性率 (%)
无创产前基因筛查高风险	152	118	77.6
NT 增厚	56	6	10.7
胎儿超声异常	600	54	9.0
唐氏综合征筛查高风险	1200	49	8.2
双胎发育异常	38	2	5.3
孕妇年龄≥35 岁	412	18	4.4
高危妊娠	102	4	3.9
不良孕产史	196	2	1.0
双方父母地贫携带	1444	8	0.56
双亲染色体异常	46	0	0.0
辅助生殖	16	0	0.0
双胎唐氏综合征筛查高风险	4	0	0.0

3 讨论

大家都清楚染色体非整倍体疾病是一种危害非常严重的常见遗传病,其主要临床表现是发育迟缓,智力低下,多发畸形,甚至致死致残,给家庭带来沉重的精神压力和经济负担^[9]。到目前为止预防染色体非整倍体患儿的出生目前主要还是对孕妇进行唐氏综合征血清学的筛查,高风险再进行无创产前基因筛查或产前诊断。染色体核型分析准确率高,金标准的地位依然未能动摇,但报告周期太长,孕妇及家属都会非常担心,而且标本需要培养,容易受环境影响,有一定的失败率,容易引起医患矛盾,这些都是染色体核型分析不可避免的缺点^[10]。QF-PCR技术对标本要求较低,量要求较少,不需要培养,只要对标本提取DNA即可,失败率低,48小时内就能出报告,其非常重要一点是能够对产前诊断标本进行母血污染鉴定,这是很多方法不可比拟的优点^[11]。QF-PCR同时也存在缺点,不能取代染色体核型分析单独进行产前诊断,如只能检测常见的5条染色体数目异常,不能检测结构异常,嵌合体和少数性染色体异常诊断会比较困难^[12-13],QF-PCR在产前诊断方面的诊断价值早期就有些文献报道,但数据都不是很大,QF-PCR灵敏度和特异度没有大数据的支持,对于一些嵌合体的检出率就更少了,而我们采用的STR位点非常多,杂合度高,在诊断方面更加的容易^[14]。

本研究收集了1年的标本病例,回顾性分析了4262例QF-PCR产前诊断的标本,并每一例标本都和染色体核型结果进行对比,发现:①核型分析有8例标本培养失败,这8例标本QF-PCR都检测出来了,结果是阴性的,QF-PCR技术和染色体核型分析技术在常见5条染色体(13、18、21、X、Y)非整倍体的诊断符合率达98.8%。②核型分析发现8例嵌合体而QF-PCR只检测出4例,对于高比例的嵌合如30%以上,QF-PCR能起到提示作用,对于低比例的嵌合,QF-PCR技术也无能为力,这些观点某些文献已有报道^[15]。而值得一提的是其中有1例标本QF-PCR提示是21-三体嵌合体,而染色体核型分析并没有发现异常,最后用FISH技术也检测出

约35%比例的嵌合,对于比例并不低的三体嵌合核型分析未检出的原因科室也做了讨论,考虑羊水细胞在培养过程中,异常细胞被淘汰的可能,因此,染色体核型分析和QF-PCR结果不符合,需要第三技术进行验证,不能完全依靠核型分析做诊断。③参照染色体核型分析作为金标准,QF-PCR检测技术的灵敏度和特异度的是85.9%和99.9%,如果剔除结构异常等不在QF-PCR检测范围内的标本,在常见5条染色体(13、18、21、X、Y)非整倍体的检测范围内灵敏度和特异度分别为98.7%和99.9%。

孕妇年龄 ≥ 35 岁(高龄)、胎儿颈项透明层增厚、唐氏综合征血清学筛查高风险,这些都是发生染色体非整倍体的高风险指标,也是比较常见的产前诊断指征,除此之外,胎儿超声异常、不良孕产史等临床上都会建议行QF-PCR,核型分析,全基因组芯片分析等方法进行产前诊断,不同的指征最后诊断为(13、18、21、X、Y)非整倍体的阳性率究竟有多高,甚少文献报道,这对于临床医生的遗传咨询也有一定的指导价值,经过分类汇总发现无创产前基因筛查高风险阳性率最高,达到77.6%,其次是胎儿颈项透明层增厚、胎儿超声异常、唐氏筛查高风险,阳性率在8%~10%,高龄阳性率4.4%。高危妊娠、不良孕产史阳性率较低,分别为3.9%和1.0%,双亲染色体异常、IVF阳性率为零,这样分类的科学性和严谨性暂时没有找到文献的支持,但结果和我们的共识也很接近。

综上所述,QF-PCR技术在48小时内能成功地对常见5条染色体(13、18、21、X、Y)非整倍体进行快速诊断,灵敏度,特异度和成功率高,在低比例的嵌合体非常容易漏诊,但它也能发现核型分析因培养因素漏诊的嵌合体,因此,染色体核型分析和QF-PCR结果不符合,需要第三技术进行验证,不能完全依靠核型分析作诊断。另外关于不同产前诊断指征最终诊断为常见5种染色体非整倍体的阳性率,对临床医生遗传咨询有一定的参考价值。

参考文献

- [1] Driscoll DA, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy[J]. N Engl J Med, 2009, 360(24): 2556-

2562.

[2] Brown L, Abigania M, Warburton D, et al. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States[J]. Prenat Diagn, 2006, 26(11):1068-1074.

[3] Writters I, Devriendt K, Legius E, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(1):29.

[4] Hewison J, Nixon J, Fountain J, et al. A randomized trial of two methods of issuing prenatal test results: the ARIA (Amniocentesis Results: Investigation of Anxiety) trial[J]. BJOG, 2007, 114: 462-468.

[5] Cirigliano V, Voglino G, Ordoez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(1):40-49.

[6] Atef SH, Hafez SS, Mahmoud NH, aneuploidies using QF-PCR: the egyptian study[J]. J Prenat Med, 2011, 5(4):83-87.

[7] Rostami P, Valizadegan S, Ghalandary M, et al. Prenatal screening for aneuploidies using QF-PCR and karyotyping :a comprehensive study in Iranian population [J]. Arch Iran Med, 2015, 18(5):296-303.

[8] Liao C, Li DZ. Acceptability of supplementary QF-PCR among women undergoing prenatal diagnosis in mainland China[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(8):813-814.

[9] 梁丽, 廖灿. QF-PCR 快速产前诊断染色体非整倍体应用研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(11):5-7.

[10] Tekcan A, Tural S, Elbistan M, et al. The combined QF-PCR and cytogenetic approach in prenatal diagnosis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11):7431-7436.

[11] 荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用协作组. 荧光原位杂交技术在产前诊断中应用的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, (5):321-324.

[12] Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(10):1001-1006.

[13] Liao C, Yi C X, Li F T, et al. The prevalence of non-detectable chromosomal abnormalities by QF-PCR in amniocentesis for certain referral indications :experience at a mainland Chinese hospital[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 289(1):75-78.

[14][7] 江帆, 丁渭, 王霞, 等. 多重定量荧光 PCR 快速检测染色体非整倍体疾病[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(15):1846-1849.

[15] Donaghue C, Mann K, Docherty Z, et al. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(1):65-72.

(收稿日期:2019-12-18)
编辑:宋文颖