

1 例室间隔缺损胎儿染色体无创产前筛查假阴性病例报告

王奕霞 胡蓉 王东梅 彭海山

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 510010)

【中图分类号】 R714.53

【文献标识码】 B

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是胎儿时期心脏及大血管发育异常所致的先天畸形,包括室间隔缺损、房间隔缺损、动脉导管未闭、法洛四联症、大动脉转位、永存动脉干等^[1]。先天性心血管缺陷是导致出生缺陷和婴儿死亡的最常见原因,数据显示 24% 死于出生缺陷的婴儿有心脏缺陷^[2],因此产前筛查对于预防先天性心脏病患儿的出生尤为重要。与先天性心脏异常相关的染色体异常及基因病有很多,21 三体是最常见的染色体异常之一。基于无创进行的常见染色体非整倍体筛查,技术成熟,结果准确,安全有效,因此在临床应用中常被选择用于 21 三体的检测。但是该项技术也仍然存在一定的局限性,在实际应用过程中需警惕,仍应重视后续的超声监测,做好相关的遗传咨询。本文就一例超声表现为室间隔缺损无创筛查 21 三体假阴性的案例进行报道,阐明无创结合超声在产前筛查中的重要性,为后续遗传咨询和临床管理提供依据。

临床资料与方法

1 临床资料

孕妇 28 岁,孕 1 产 0,既往史和家族史无特殊。本次妊娠因早孕期唐筛 21 三体临界风险(风险值 1/560)来我科就诊,于孕 14⁺周行无创基因筛查,随后常规产检。25 周 III 级超声和 28 周心脏彩超提示室缺,由于孕妇自己拒绝进行遗传咨询及进一步产前诊断。于孕 38 周分娩一女婴,因胎儿室缺收入

心脏中心监测。观察新生儿外观异常,怀疑 21 三体可能。遂取新生儿外周血行核型分析、STR 及 CNV-Seq 检查,同时留取胎盘组织,多点取样,进行 CNV-Seq 检测。为了排除实验室弄错标本的可能性,取原实验样本留样重复无创检测。并取原实验样本的母血细胞留样与新生儿外周血进行亲缘关系鉴定。

2 方法

2.1 NIPT 抽取孕妇外周静脉血 8ml 收集于 EDTA 抗凝管中,4℃ 保存,8 小时内分离血浆。4℃,1600g 离心 10min,留取上层血浆,再将初次分离的血浆 16000g 离心 10min,最后分装成每管 600 μ l 的血浆,取第一管血浆进行游离 DNA 提取,其余-80℃ 冰箱保存。用 Bakerman 自动化工作站(Biomek 4000)和博奥晶芯胎儿染色体非整倍体检测试剂盒(博奥木华 中国)提取血浆游离 DNA 及制备文库,具体操作严格按照仪器和试剂盒说明书进行。用 Proton(life technology)高通量测序平台检测。通过序列的比对、拼接等分析,可对不同染色体水平进行统计,从而来识别胎儿染色体非整倍体。结果分析主要判断标准为:当 Z 值 ≥ 3 时,结果提示为三体高风险或重复;当 $-3 < Z$ 值 < 3 时,结果提示为非整倍体低风险;当 Z 值 ≤ -3 时,提示为单体可能性或缺失。

2.2 STR 提取新生儿外周血 DNA,具体操作流程按照 Magen 磁珠法通用核酸提取试剂盒说明书。NanoDrop 2000 评估所提取 DNA 的浓度和纯度。

将 DNA 浓度稀释至 20 ~ 40 ng/ μ l, 利用荧光标记多重 PCR 技术扩增 13 个常染色体 STR 位点(21 号染色体 5 个、18 和 13 号染色体各 4 个)。扩增产物经 ABI 3500 xL 测序仪毛细管电泳检测出各基因座的等位基因电泳数据, 将电泳数据导入数据分析软件 GeneMarker V2. 2. 0, 进行数据分析及结果判断。根据 GeneMarker V2. 2. 0 软件分析结果, 计算各个位点峰面积比值得出染色体倍体正常或异常的结论。

2.3 CNV-seq 取多点绿豆大小胎盘组织经消化处理, 提取 DNA, 取 DNA 100 ng 进行片段化处理, 具体操作流程参照试剂盒 NEBNext dsDNA Fragmentase Kit 说明书进行。按照晶芯 胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒说明书对片段化后的 DNA 进行文库构建及定量, 然后上机测序。测序完成后, 将样本的 DNA 序列与已知人类参考基因组序列进行比对, 运用环状二元分割算法分析样本的 CNV 情况。

3 结果

孕 14⁺ 周无创结果提示非整倍体低风险 21 号染色体 Z 值 2.49(如图 1), 随后常规产检。于孕 25⁺ 周 III 级超声提示心脏发育异常、室间隔缺损, 28 周复查心脏彩超仍旧提示膜周型室间隔缺损, 缺口 2.7mm(如图 2)。新生儿外周血核型结果显示为 21

三体(如图 3); STR 结果也显示 21 三体(如图 4), 新生儿外周血 CNV-Seq 验证确认为 21 三体(如图 5)。原标本再次复查无创结果仍旧显示低风险, Z 值 0.58(如图 6)。胎盘多点取样行 CNV-Seq 检测显示胎盘 21 三体嵌合, 各点嵌合比例约 10%~20% 不等(如图 7)。母血细胞留样与新生儿外周血亲缘关系鉴定显示为亲生血缘关系(如图 8)。

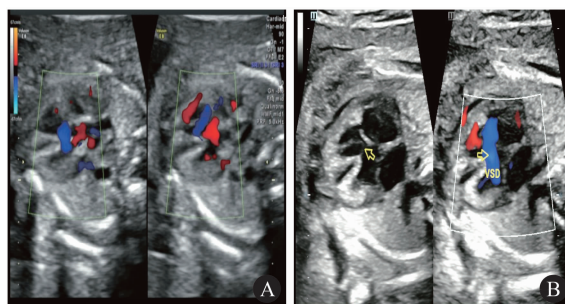


图 2 A 孕 25⁺ 周 III 级超声显示膜周型室间隔缺损;
B 孕 28⁺ 周胎儿心脏超声显示膜周型室间隔缺损

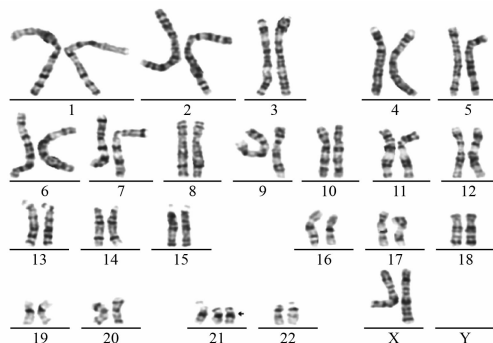


图 3 新生儿外周血核型结果

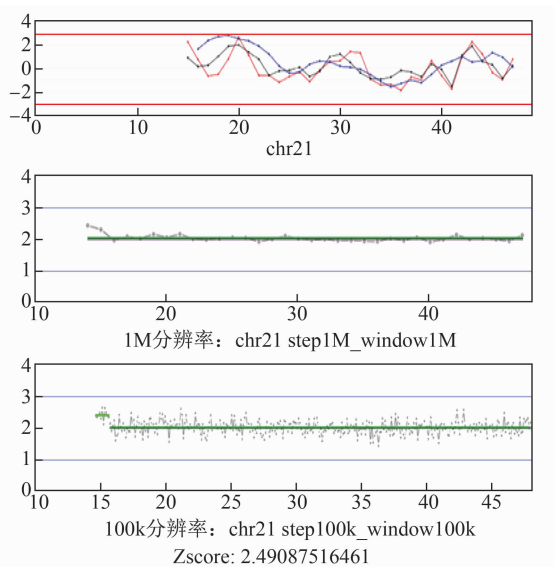


图 1 孕 14⁺ 周无创检测 Chr21 结果 Z=2.49

4 讨论

先天性心脏病是最常见的出生缺陷, 也是病死率最高的先天性异常之一, 在活产新生儿中占 0.8%~1.3%^[3, 4]。自 2011 年来我国每年约有 13 万的 CHD 患儿出生, 给社会经济的发展带来了沉重的负担^[5]。其病因尚未十分清楚, 多数学者认为多种类型的心脏畸形都有明确的遗传学基础。染色体数目异常和结构异常都可以引起 CHD, 其主要涉及单基因病和染色体病^[6]。约 20% 的 CHD 在产前被诊断为染色体异常^[7], 染色体畸变导致的心血管异常, 大部分心脏缺损是非特异性的。21 三体是最常见的染色体异常之一^[6]。在患有 21 三体的新生儿中

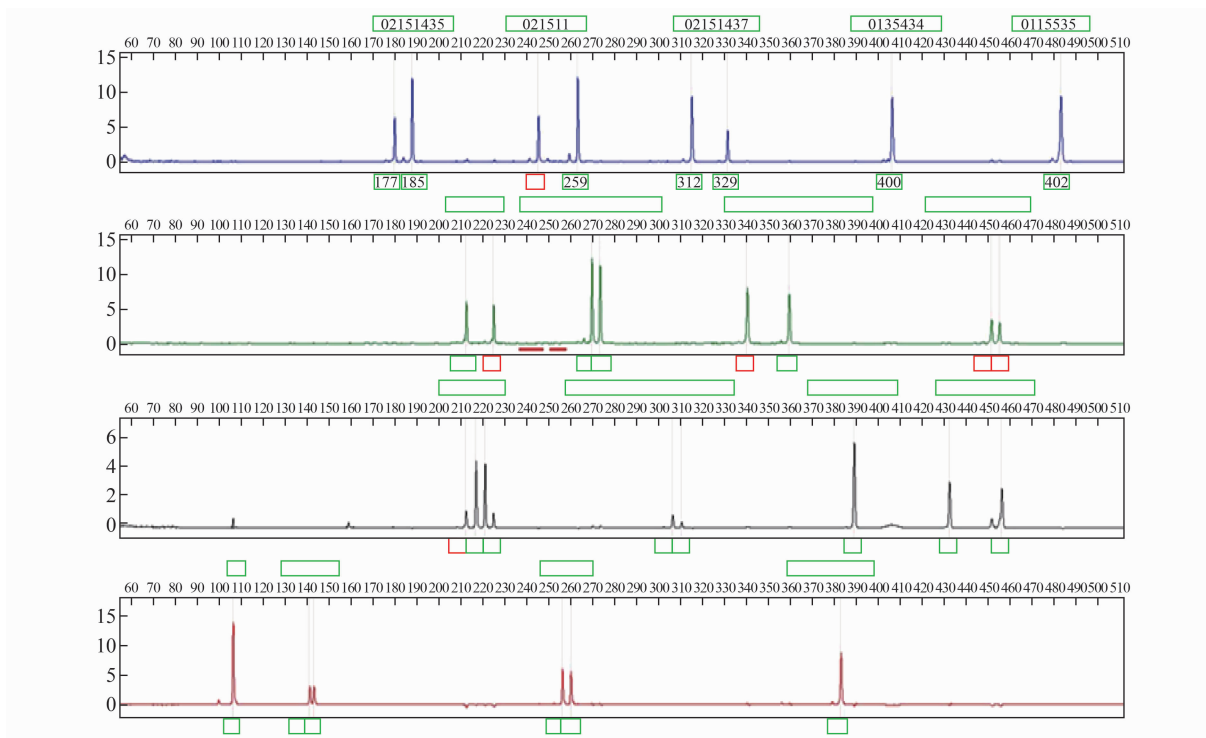


图 4 新生儿外周血 STR 检测结果

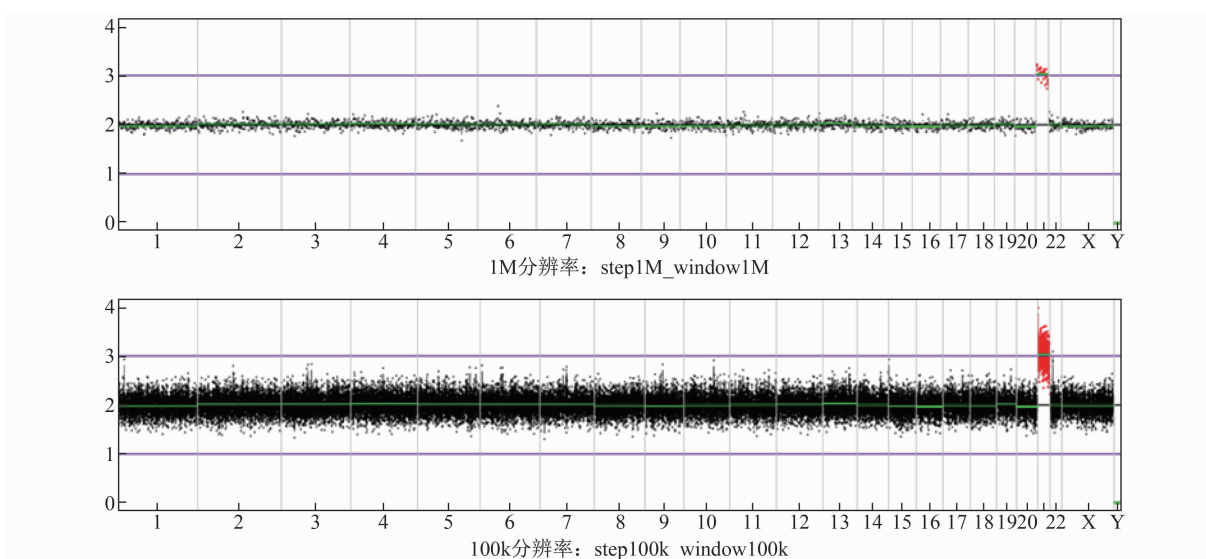


图 5 新生儿外周血 CNV-Seq 检测结果

有 45%~50% 的有先天性心脏病的表现,主要为房室间隔缺损、室间隔缺损、房间隔缺损,间隔类缺损占了 85% 以上,除此之外复杂的法洛四联症(TOF)和大动脉转位等也有见报道^[8]。有研究表明在患有 21 三体的 CHD 中 21q22.2 是致病位点的关键区域,该区域包含了 3 个已知的蛋白编码基因(DSCAM, BACE2, PLAC4)和 4 个已知的非编码 RNAs^[9],可能与心内膜垫发育相关。本例病例中

的孕妇在后期产检中也发现有心脏超声的异常,仅表现为膜周型室间隔缺损,说明仅有心脏超声的异常在产前筛查中也应重视。先天性心脏病,尤其是间隔类缺损其对于提示常染色体非整倍体的可能有一定的意义。有研究表明在产前超声筛查时鼻骨发育异常、心脏畸形和羊水过多与 21 三体综合征关联度高^[10]。而另一项对无创假阴性病例的超声结果分析的研究中也显示在无创假阴性的结果中有

27.5%~90.5%的病例会出现超声的异常^[11]。说明超声筛查,尤其是超声表现为心脏异常对常见染色体非整倍体筛查的重要性不容忽视。

和特异度都很高。在我们以往的研究中无创检测常染色体非整倍体的灵敏度有91.67%~100%,阳性

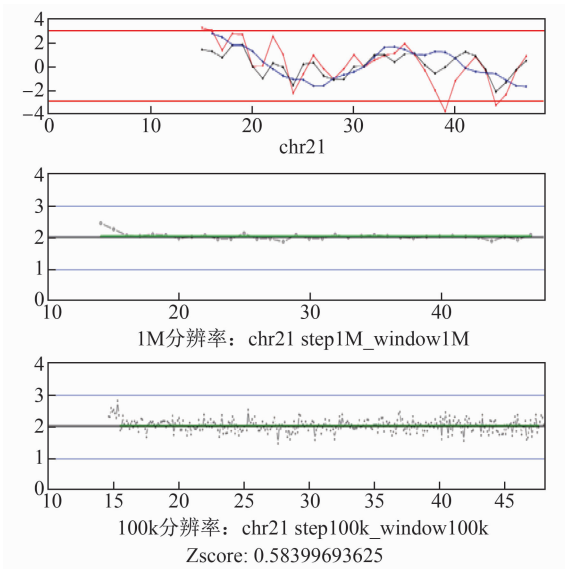


图6 原标本复查无创 Chr21 结果 Z=0.58

众所周知,在染色体非整倍体的筛查上已经从传统的基于年龄和血清学标志物的筛查方法逐步向基于胎儿游离DNA的高通量测序技术过渡。通过近十年无创产前筛查技术的推广应用和数据积累,其在非整倍体筛查的优势已经很明确,它的灵敏度

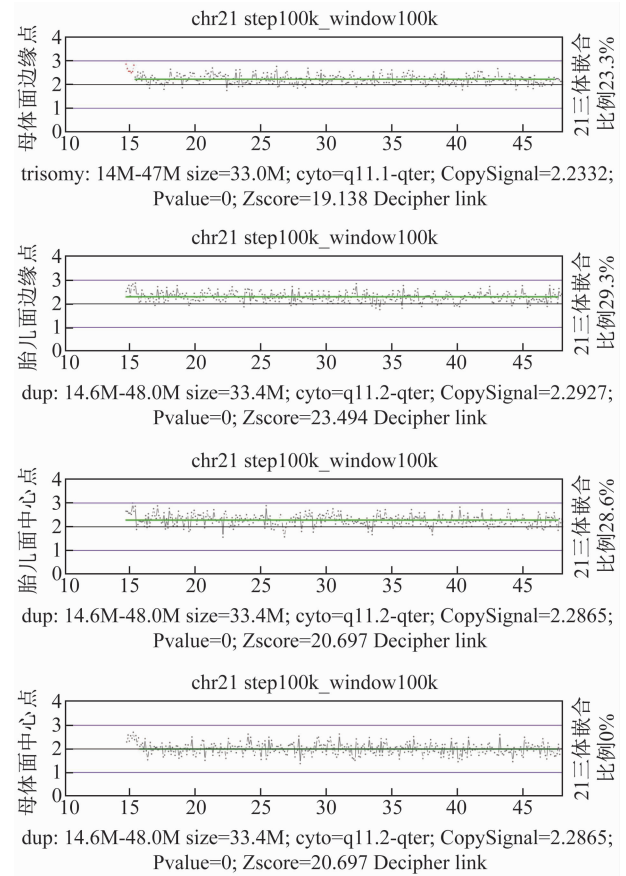


图7 胎盘多点取样 CNV-Seq 检测结果

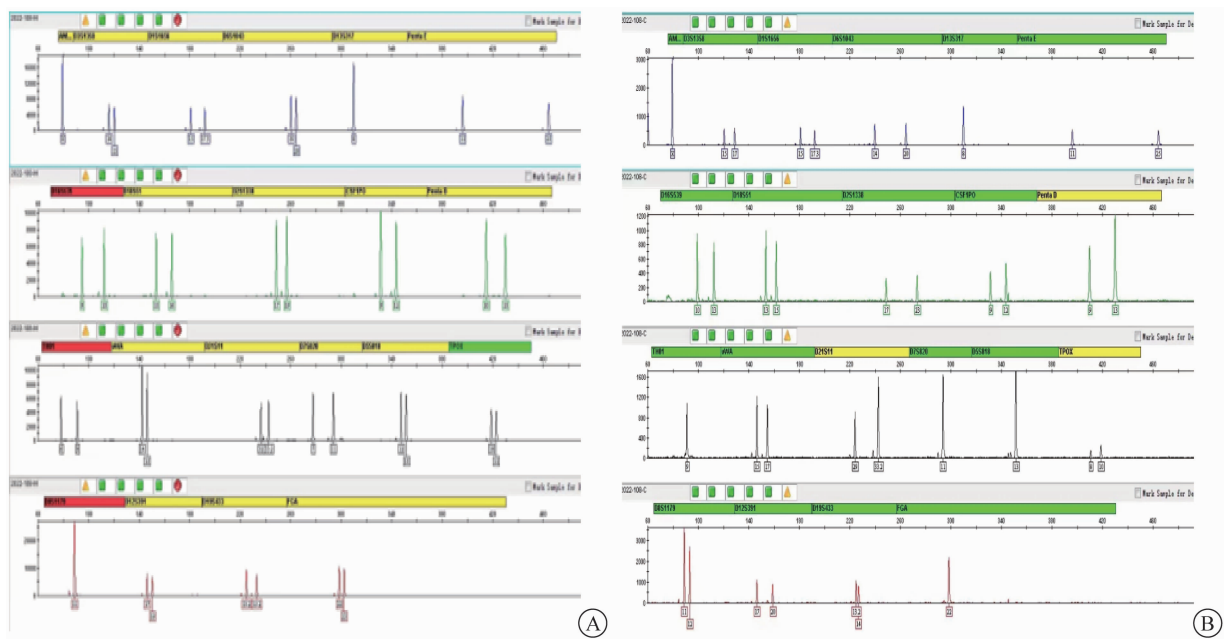


图8 A 孕妇外周血亲子鉴定位点结果 B 新生儿外周血亲子鉴定位点结果

预测值有 33.33%~88.06%,21、18、13 三体复合阳性预测值可达 79.57%^[12]。但是该技术仍然有其自身的局限性,即有假阳性以及假阴性的可能。由于无创基因检测是基于母血中游离胎儿 DNA 进行检测的,而胎儿游离 DNA 来源于胎盘滋养层细胞凋亡释放入血^[13],因此,无创检测的结果实际上是反映了胎盘的结果而不是真正胎儿的核型,胎儿和胎盘组织间的核型差异是导致 NIPT 与诊断结果不一致的重要原因^[14]。胎儿游离 DNA 浓度低和限制性胎盘嵌合等原因是造成无创假阴性的主要原因^[15, 16]。2014 年 Meagan Smith^[17],2018 年 Kai-Sven Heling^[18],2020 年王杰等^[19]均报道了无创筛查 21 三体检阴性的案例。根据文献报道^[20, 21]无创假阴性率大约 0.86%,漏诊风险 1/10000。本案例中胎儿游离 DNA 浓度为 16.5%,21-Z score 为 2.49,新生儿外周血结果为 21-三体,胎盘母体面中心点结果未见异常,母体面边缘点 21 三体嵌合比例 23.3%、胎儿面中心 21 三体嵌合比例 28.6%及边缘点 21 三体嵌合比例 29.3%。由于胎儿游离 DNA 浓度不低,Z 值不高,而胎盘多点取样结果也证实了胎盘存在嵌合情况,胎盘的异常细胞比例低于检测下限。因此,本案例的 21 三体检阴性也是由于胎儿和胎盘核型不符合,胎盘低比例嵌合导致异常值低于检测下限而漏诊的。无创检测为低风险,并且排除实验室弄错标本等人为错误的原因,则应该考虑到是由于生物因素及技术的局限性导致的漏诊。

对于选择进行无创检测的普通孕妇,应该做好检测前和检测后的遗传咨询,在告知孕妇该技术的优点的同时也要强调技术的局限性,做好知情同意。而对于超声有结构异常的孕妇,即使是只有孤立性的结构异常,也应该重视,做好遗传咨询的同时提供下一步诊断的参考依据。我们的案例表明超声筛查结合无创可以更加有效的筛查染色体非整倍体异常,避免无创假阴性的漏诊。

参 考 文 献

[1] 李娟,田杰. 染色体异常致先天性心脏病的研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2013,40(1):55-58.
[2] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Heart

disease and stroke statistics—2012 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2012,125(1): e2-e220.

- [3] 江洪,何心勤,林元,等. 不同类型先天性心脏病胎儿染色体异常特征分析[J]. *山东医药*, 2016,56(46):65-68.
[4] 黄杏玲,邓新娥,王远流,等. 不同类型胎儿先天性心脏病的产前诊断及预后分析[J]. *实用医学杂志*, 2020,36(21): 2990-2994.
[5] 闫亚妮,吴青青,姚苓,等. 胎儿先天性心脏病与染色体及 22q11 微缺失异常的临床研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014,35(2):249-253.
[6] 陈新民. 先天性心脏病的病因-基因突变与染色体异常[J]. *中国全科医学*, 2006(16):1309-1311.
[7] PIERPONT M E, BRUECKNER M, CHUNG W K, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2018,138(21):e653-e711.
[8] TIDRENCZEL Z, HAJDU J, SIMONYI A, et al. Trends in the prenatal diagnosis of trisomy 21 show younger maternal age and shift in the distribution of congenital heart disease over a 20-year period[J]. *Am J Med Genet A*, 2021,185(6): 1732-1742.
[9] PELLERI M C, GENNARI E, LOCATELLI C, et al. Genotype-phenotype correlation for congenital heart disease in Down syndrome through analysis of partial trisomy 21 cases[J]. *Genomics*, 2017,109(5-6):391-400.
[10] 赵嘉,高燕,陈阳广,等. 81 例产前诊断 21 三体综合征胎儿孕中期超声表现的分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019,27(5):553-555.
[11] LI W, ZENG F, FAN B, et al. Impact of ultrasonography on identifying noninvasive prenatal screening false-negative aneuploidy[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020,8(6):e1213.
[12] 彭海山,黄华洁,杨洁霞,等. 广东地区 23852 例孕妇无创产前筛查指征及结果分析[J]. *新医学*, 2018,49(12):878-883.
[13] HOCHSTENBACH R, NIKKELS P G, ELFERINK M G, et al. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast; proof from an unique case[J]. *Clin Case Rep*, 2015,3(6):489-491.
[14] LI X, JU D, SHI Y, et al. Fetal aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing of maternal plasma DNA sequencing with "false negative" result due to confined placental mosaicism: A case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020,99(29):e20848.
[15] GRATI F R, MALVESTITI F, FERREIRA J C, et al.

- Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results[J]. *Genet Med*, 2014,16(8):620-624.
- [16] MAO J, WANG T, WANG B J, et al. Confined placental origin of the circulating cell free fetal DNA revealed by a discordant non-invasive prenatal test result in a trisomy 18 pregnancy[J]. *Clin Chim Acta*, 2014,433:190-193.
- [17] SMITH M, LEWIS K M, HOLMES A, et al. A Case of False Negative NIPT for Down Syndrome-Lessons Learned [J]. *Case Rep Genet*, 2014,2014:823504.
- [18] HELING K S, CHAOUI R, FLOTTER M, et al. False-Negative NIPT Result for Trisomy 21[J]. *Ultraschall Med*, 2018,39(1):92.
- [19] 王杰, 董弘, 武丽琼, 等. 3 例胎儿染色体非整倍体无创产前筛查假阴性病例分析[J]. *临床检验杂志*, 2020,38(9):714-718.
- [20] LIANG D, CRAM D S, TAN H, et al. Clinical utility of noninvasive prenatal screening for expanded chromosome disease syndromes[J]. *Genet Med*, 2019,21(9):1998-2006.
- [21] SUZUMORI N, SEKIZAWA A, TAKEDA E, et al. Retrospective details of false-positive and false-negative results in non-invasive prenatal testing for fetal trisomies 21, 18 and 13[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2021,256:75-81.

(收稿日期:2022-09-07)

编辑:葛玉纯

· 视频导读 ·

芯片及全基因组测序对先天性心脏病的产前诊断

邢娅

(同济大学附属第一妇婴保健院, 上海 200000)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.01.013



国内的许多高水平文章在国际期刊上发表受到广泛关注,我刊将邀请她们来分享最新研究成果,同时也欢迎各位青年才俊以视频的形式“毛遂自荐”。

本期由同济大学附属第一妇婴保健院的邢娅医生分享 2022 年 5 月发表于 *Prenatal Diagnosis* 杂志(DOI: 10.1002/pd.6168)的关于先天性心脏病产前诊断的一项研究。研究入选了 2016 年至 2019 年同济大学附属第一妇婴保健院胎儿医学科就诊的 II 级超声及胎儿心超诊断的先心病胎儿,采用基

因芯片作为一线检测技术,未能诊断的先心病胎儿进一步采用全外显子测序技术进行检测。研究对比分析了使用基因芯片技术及全外显子测序技术,分别在非孤立性先心病组及孤立性先心病组中,检出的与先心病表型相关的致病性/可能致病性异常的检出率,从而指导在先心病产前诊断中如何提供合适的检测技术。结果显示非孤立性先心病的基因芯片异常检出率远高于孤立性先心病组,但亚显微水平的拷贝数变异的异常检出率是相当的。因此,在非孤立性及孤立性先心病组,均应采用基因芯片进行检测。全外显子测序技术结果中,同样非孤立性先心病组的检出率更高。但研究结果显示部分非孤立性先心病的病例在产前仅能表现为孤立性的先心病表型,另外,全外显子测序技术有助于检出那些存在不完全外显的遗传自父母的基因变异。所以研究认为在孤立性先心病组同样有必要进行全外显子测序检测。研究通过对比非孤立性及孤立性先心病组中基因芯片技术及全外显子测序技术对先心病的诊断率,为产前先心病诊断技术的选择提供了数据支持。