

新型无创 DNA 产前检测在诊断胎儿染色体非整倍体疾病中的应用

杨湘玲 朱健生* 刘贤云

(安徽省妇幼保健院,安徽医科大学妇幼保健临床学院,安徽 合肥 230001)

【摘要】 目的 探讨新一代测序技术的新型无创 DNA 产前检测在诊断胎儿染色体非整倍体疾病中的应用价值。**方法** 2012 年 8 月 1 日至 2013 年 4 月 30 日在安徽省妇幼保健院接受孕妇外周血中游离胎儿 DNA 检测者 1365 例,均为单胎,孕周(19.1±5.8)周,按照孕妇年龄及血清学筛查结果分为唐氏综合征筛查(唐筛)高危组、高龄组和其他原因组 3 组由北京贝瑞和康生物技术有限公司和湖南湘雅医院产前诊断中心合作开展的“大规模基于新一代测序技术的新型无创 DNA 产前检测”,对孕妇外周血中游离胎儿 DNA 进行序列分析,对检测结果阳性者进行羊水穿刺及胎儿染色体核型分析;对检测结果阴性者行电话随访其胎儿出生后情况。**结果** ① 3 组孕妇共计 1365 例均成功完成游离胎儿 DNA 检测,检测结果为阳性者共 33 例,包括 21 三体 19 例、18 三体 8 例、45,X 6 例。其中唐筛高危组检出 21 三体 8 例、18 三体 7 例、45,X 4 例;高龄组检出 21 三体 9 例、18 三体 1 例、45,X 2 例;超声侧脑室增宽检出 21 三体 1 例、鼻骨缺失检出 21 三体一例。② 游离胎儿 DNA 检测结果异常的 33 例孕妇中,28 例进行了羊膜腔穿刺及染色体核型分析。19 例 21 三体检测阳性者 18 例进行了羊膜腔穿刺,17 例染色体核型均为 47,XN,+21,另 1 例核型为 46,XN(70)/47,XN,+21(10),最后经胎儿脐血染色体检测为 46,XN,随访新生儿正常。胎儿鼻骨缺失发现时已 24 周,无创检出 21 三体,行脐带血检测结果为异位型 21 三体,核型 46,XX,der(21;21)(q10;q10),+21。结果检出率 100%,准确率 94.4%。8 例 18 三体检测阳性者中有 7 例进行了羊膜腔穿刺,7 例核型为 47,XN,+18;两者结果完全一致,另 1 例拒绝羊水穿刺,引产中发现胎儿全身水肿。③ 6 例 45,X 检测阳性者中有 3 例进行了羊膜腔穿刺,2 例核型为 45,X,1 例为 46,XX(出现了假阳性),另 3 例拒绝羊水穿刺,其敏感性和准确性无法统计。④ 3 组孕妇血浆中游离胎儿 DNA 检测结果阴性者 1312 例,经电话随访,截止至 2012 年 4 月 30 日,已出生的新生儿经检查均未发现唐氏综合征患儿。**结论** 孕妇外周血中游离胎儿 DNA 检测对 21 三体和 18 三体的检测准确率达 96%,对 45,X 的检出率也达到了很高水准,准确率有待临床配合进一步证实。但是在其他染色体异常的检测中还需要进一步研究。此外该方法不能筛查出染色体结构异常。

【关键词】 唐氏综合征;大规模基于新一代测序技术;染色体;无创产前诊断

【中图分类号】 R394.2 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To explore the value of a Massively Parallel Genomic Sequencing Technology, a new type of non-invasive prenatal diagnosis was applied on fetal chromosomal aneuploidy disease. **Method** 1365 singleton pregnant women with gestational age among from 13~25 weeks tested for free fetal DNA in peripheral blood, of whom 1051 had high risk in Down's syndrome biochemical screening, 294 more than 35 years old, 10 were shown fetal abnormalities by ultrasound and 10 for other reasons. Amniotic fluid puncture and fetal karyotype analysis were carried out for positive on the test results, telephone follow-up after fetus birth for the negative test result. **Results** ① In 19 out of 1365 pregnant women, massively parallel genomic sequencing technology revealed high risk of Down's syndrome, 18 had amniotic cavity puncture and chromosome karyotype, 1 high risk fetuses was misdiagnosed. The detection rate

* 通讯作者:朱健生, E-mail: jennytiger97@hotmail.com

of fetal Down's syndrome was 100%, accurate rate 94.4%. ② Non-invasive technology detected 8 cases of 18 trisomy, 1 case refused for puncture, 7 cases consistent with the result of karyotype analysis. ③ 6 cases karyotype were 45,X0, 3 cases in testing positive for the amniotic cavity puncture, 2 cases of karyotype 45, X0, 1 case of 46, XX. ④ Providing telephone follow-up for screening negative cases, no Down's syndrome baby was found. **Conclusions** Sequencing technology of plasma free DNA in pregnant women can detect fetus chromosome aneuploidy rapidly, and which is highly consistent with karyotype analysis in accuracy and specificity.

【Key words】 Down's syndrome; aneuploidy sequencing technology; chromosome; non-invasive Prenatal diagnosis

产前诊断染色体数目的变异—三体、单体,常见的遗传疾病有唐氏综合征(21-三体)、爱德华综合征(18三体)、Patau综合征(13三体)、Turner综合征(45,X)、Klinefelter综合征(45,XXY)占产前遗传疾病的80%~95%,约占新生儿所有染色体异常的65%~80%。最常见的染色体异常是唐氏综合征。《中华人民共和国母婴保健法实施办法》规定,高龄初产妇应进行产前诊断。对预产年龄<35岁,唐氏综合征血清学筛查结果高风险孕妇也应进行产前诊断。介入性产前诊断羊膜腔穿刺术相关的胎儿丢失率为0.2%~0.3%^[1],因此很多孕妇不愿接受,尤其是那些胎儿珍贵、已有流产先兆的孕妇,如何进行合适的产前筛查和产前诊断策略,已成为产科临床的一个实际问题。为此本文对在安徽省妇幼保健院接受孕妇外周血中游离胎儿DNA检测者1365例结果进行回顾性分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 资料来源于2012年8月1日至2013年4月30日在安徽省妇幼保健院接受孕妇外周血中游离胎儿DNA检测者1365例,均为单胎,孕周(19.1±5.8)周,纳入标准:按照孕妇年龄及血清学筛查结果分为3组,唐氏综合征筛查16~19⁺6周妇女进行血清标记物AFP和free-β-hCG2项指标双标记检测,筛查结果应用LifeCycle和Elipse软件计算唐氏综合征风险。唐氏筛查风险切割值为1:300,当切割值≥1:300时为唐氏高危孕妇,当18三体风险≥1:350时为18三体高危孕妇。①高危组:1051例,预产年龄<35岁,平均年龄27岁,唐氏综合征血清学筛查提示21三体或18三体高风险;②高龄组:294例,预产年龄≥35岁,平均年龄38岁;③其他原因组:20例,预产年龄<35岁,未做母血清学筛查,超声有异常发现10例(脑积水1例、脑

室增宽3例、左心室强光点3例、单脐动脉2例、鼻骨缺失1例);孕妇心理恐惧要求直接检查10例。唐筛高危组及高龄组共计1345例孕妇,均因担心穿刺手术的感染、流产风险或孕周大于22⁺6周等原因,未行介入性产前诊断。排除标准:有染色体异常和先天畸形家族史、孕妇及其配偶之一为染色体易位或倒位携带者、双胎或多胎。

1.2 研究方法 孕妇知情同意后,于妊娠13~26周抽外周血10 ml,由北京贝瑞和康生物技术有限公司和湖南湘雅医院产前诊断中心合作开展的“大规模基于新一代测序技术的新型无创DNA产前检测”,对孕妇外周血中游离胎儿DNA进行序列分析,对检测结果阳性者进行羊水穿刺及胎儿染色体核型分析,对检测结果阴性者行电话随访其胎儿出生后情况。

2 结果

2.1 3组孕妇游离胎儿DNA检测结果 3组孕妇共计1365例均成功完成游离胎儿DNA检测,检测结果为异常者共33例,包括21三体19例;18三体8例;45,X6例。其中唐筛高危组检出21三体8例,18三体7例,45,X4例;高龄组检出21三体9例,18三体1例,检出45,X2例;超声侧脑室增宽检出21三体1例,鼻骨缺失检出21三体1例,见表1。

表1 1365例孕妇外周血游离胎儿DNA检测异常情况

组别	例数	47,+21(例数)	47,+18(例数)	45,x(例数)
高危组	1051	8	7	4
高龄组	294	9	1	2
其他	20	2	0	0
合计	1365	19	8	6

2.2 孕妇外周血DNA检测异常结果与羊水染色体核型分析结果比较 1365例孕妇外周血游离胎儿DNA检测异常者共33例,19例21三体阳性者

18例进行了羊膜腔穿刺及染色体核型分析。结果:17例染色体核型均为47,XN,+21,另1例核型为46,XN(70)/47,XN,+21(10),最后经胎儿脐血染色体检测为46,XN,随访新生儿正常。胎儿鼻骨缺失发现时已24周,无创DNA检测检出21三体,行脐带血检测结果为异位型21三体,核型46,XX,der(21;21)(q10;q10),+21。检出率100%,准确率94.4%。8例18三体检测阳性者中有7例进行了羊膜腔穿刺,7例核型为47,XN,+18;两者结果完全一致,另1例拒绝羊水穿刺,引产中发现胎儿全身水肿。6例45,X检测阳性者中有3例进行了羊膜腔穿刺。2例核型为45,X,1例为45,XX(出现了假阳性),另3例拒绝羊水穿刺,其敏感性和准确性无法统计。3组孕妇血浆中游离胎儿DNA检测结果阴性者1312例,经电话随访,截止至2012年4月30日,已出生的新生儿经检查均未发现唐氏综合征患儿(见表2)。

表2 33例孕妇外周血DNA检测异常结果与羊水染色体分析结果比较

染色体异常	孕妇外周血DNA检测结果	例数	羊水染色体核型分析结果	例数	检出率	准确率
21三体	21三体	19	47,XN,+21	17	100%	95%
			46,XN,der(21;21)(q10;q10)+21	1		
			46,XN[70]/47,XN,+21[10]	1		
18三体	18三体	8	47,XN,+18	7	100%	100%
			拒绝羊水穿刺	1		
45,X	45,X	6	45,X	2	/	/
			46,XX	1		
			拒绝羊水穿刺	3		

3 讨论

3.1 新一代测序技术的新型无创DNA产前检测孕妇血浆中的游离胎儿DNA因其高含量、短半衰期、容易提取,成为简便、有效的胎儿基因物质来源^[2]。胎儿染色体非整倍体无创基因检测是指对母体外周血血浆中提取的游离DNA片段(包括来自母体和胎儿的DNA片段)进行高通量大规模平行基因组测序,并将测序结果进行以生物统计学为基础的信息分析,从而检查胎儿染色体是否存在非整倍性变化的产前检测方法。胎儿染色体非整倍体无创基因检测技术具有最佳检测时间为孕早、中期,具有无创取样、无流产风险、高灵敏度及准确度的特点。

3.2 有创产前诊断技术(绒毛穿刺、羊水穿刺检查、脐血穿刺)染色体核型分析产前诊断准确率高,为临床的金标准^[3],但有创取样有0.5%~2%的流产风险,且容易导致胎膜早破、绒毛羊膜炎、阴道出血、早产等并发症。

3.3 孕妇外周血中游离胎儿DNA非整倍体检测的临床意义 21、18、13三体以及性别染色体数目异常占产前遗传疾病的80%~95%,约占新生儿所有染色体异常的65%~80%,最常见的染色体异常是唐氏综合征,是产前诊断的主要内容。但是目前产前筛查体系存在较高的假阳性率,就母体中孕期血清筛查出的高风险人群进行羊水穿刺,染色体异常发生率为2.14%^[4]。除了对筛查阳性的高危低龄孕妇进行产前诊断以外,还要对日益增加的高龄孕妇进行产前细胞遗传学诊断,使得产前诊断工作量大大增加,现有卫生资源无法满足产前筛查后续诊断的需要。本资料1365例孕妇外周血游离胎儿DNA检测异常者进行羊水染色体分析,结果表明,孕妇外周血中游离胎儿DNA大规模测序,对21三体和18三体的检出率100%,准确率96%。可以作为传统产前诊断技术的有效辅助手段^[5]。但是对于其他染色体非整倍体异常的筛查有局限性。此外,该方法不能筛查出染色体结构异常,对于非整倍体和染色体结构异常的确诊仍需通过羊水或脐带血行染色体核型分析。新技术具有潜在的不确定风险。

参考文献

- [1] 戚庆伟,蒋宇林,周希亚,等. 6585例高龄孕妇妊娠中期羊水染色体核型分析结果[J]. 中华围产医学杂志,2013,16:76-77.
- [2] 陈晓蕾,陈辉,李扬,等. 孕妇血浆中游离胎儿DNA的检测和分析[J]. 国际遗传学杂志,2010,33:65-66.
- [3] Wang JY, Zhen DK, Zilberstein ME, et al. Non-invasive exclusion of fetal aneuploidy in an at-risk couple with a balanced translocation[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(2): 103-106.
- [4] 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.
- [5] 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.

编辑:刘邓浩
(收稿日期:2013-04-30)