

452 例无创产前检测高风险胎儿的产前诊断结果分析

路兴军 李晓东 张胜利 陶华娟* 吉龙龙

(潍坊市妇幼保健院 遗传科, 山东 潍坊 261011)

【摘要】 目的 分析无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)筛查胎儿 21、18、13-三体及性染色体非整倍体(sex chromosome aneuploidy, SCA)的阳性预测值(positive predictive value, PPV), 评估 NIPT 对胎儿常见染色体非整倍体检出的临床价值。**方法** 以羊水细胞核型分析作为产前诊断的金标准, 分析 2016 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日于潍坊市妇幼保健院就诊, NIPT 提示高风险孕妇的产前诊断结果。**结果** 452 例 NIPT 高风险孕妇中, 450 例接受侵入性产前诊断, 其中 363 例 21、18、13-三体高风险孕妇, 经羊水细胞染色体核型分析证实, 21-三体 259 例(PPV 为 90.88%)、18-三体 44 例(PPV 为 73.33%)、13-三体 5 例(PPV 为 27.78%); 87 例 NIPT 提示胎儿 SCA 孕妇接受侵入性产前诊断, 确诊 SCA 胎儿 56 例, 其中 47, XXY 25 例、47, XXX 14 例、47, XYY 4 例, 嵌合体 13 例, 假阳性 31 例, 假阳性率为 35.63%(31/87); NIPT 对性染色体三体的 PPV 为 82.86%, 对性染色体单体的 PPV 为 37.50%。**结论** NIPT 作为一种安全、快速的产前筛查手段, 在筛查常见的 21、18、13-三体的同时能够筛查出部分 SCA 患儿, 但 PPV 偏低, 必须进一步行侵入性产前诊断确诊; 对 NIPT 提示胎儿 SCA 的孕妇有必要同时行孕妇本人的外周血染色体核型分析, 以排除母体染色体异常。

【关键词】 无创产前检测; 性染色体; 核型分析; 阳性预测值

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To assess the positive predictive value(PPV) and clinical meanings of non-invasive prenatal testing(NIPT) in screening fetal chromosome aneuploidy(SCA). **Method** All pregnant women with high risks detected by NIPT were subjected to amniocytic karyotyping from January 1, 2016 to December 31, 2017, and the results of NIPT and karyotyping were reviewed to analyze. **Results** Among the 452 cases, 450 pregnant women proceeded with amniocentesis and fetal chromosomal detection. 363 women with high risk for trisomy 21, 18 and 13 were validated by karyotyping through invasive procedures, and PPV of NIPT for trisomy 21, 18 and 13 were 90.88%, 73.33% and 27.78%. 56 fetus were cytogenetically diagnosed as SCA from the 87 suspected cases, which included 25 fetus of 47, XXY, 14 fetus of 47, XXX, 4 fetus of 47, XYY and 13 chimeras. The PPV of NIPT for sex chromosome trisomy and monosomy X were 82.86% and 37.5%. **Conclusions** As a safe and rapid prenatal screening for trisomy 21, 18 and 13, NIPT could also identify SCA, but with relatively low PPV, so the pregnant women with high risks must be validated by karyotyping. The karyotype analysis of peripheral blood chromosomes should be performed for the suspected SCA women detected by NIPT, in order to exclude maternal chromosome aberrations.

【Key words】 non-invasive prenatal testing; sex chromosome; karyotyping; positive predictive value

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2019.01.003

基金项目: 潍坊市科学技术发展计划(2018YX037)

* 通讯作者: 陶华娟, E-mail: huajuantao@163.com

无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)是通过母体外周血中的游离DNA进行高通量测序,检测胎儿染色体数目异常的一种非侵入性产前筛查技术。近年来,随着高通量测序技术的发展,利用NIPT技术筛查胎儿常见染色体非整倍体异常,极大地提高了染色体疾病产前筛查的灵敏度和特异度,降低了侵入性产前诊断率^[1,2]。有大规模随机对照研究表明,如果侵入性产前诊断技术是基于NIPT的结果,那么约98%的有创性产前诊断是可以避免的^[3]。目前NIPT主要针对的目标疾病是21-三体、18-三体和13-三体,检出率分别超过了99%、97%和90%^[4]。从原理上看,基于血浆游离DNA全基因组测序的NIPT还可发现其他染色体非整倍体,因此目前许多实验室已将NIPT逐步拓展全部染色体的检测,但成果有限,结论不一^[5]。性染色体非整倍体(sex chromosome aneuploidy, SCA)是一种常见的染色体非整倍体异常,胎儿期的发生率高达1/435,常见类型有性染色体单体(45, X)、性染色体三体(47, XXX、47, XXY、47, XYY)及嵌合性染色体异常^[6],对于SCA的产前筛查目前尚无有效手段。本研究通过对452例NIPT提示高风险的孕妇进一步行羊膜腔穿刺后核型分析,分析NIPT筛查21、18、13-三体和SCA的阳性预测值(positive predictive value, PPV),并评估NIPT对SCA胎儿检出的临床价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集2016年1月1日至2017年12月31日于潍坊市妇幼保健院就诊,NIPT提示高风险孕妇452例,其中450例接受侵入性产前诊断。排除标准包括双胞胎、多胎妊娠,夫妻之一存在明确的染色体异常,1年以内接受过异体输血、移植手术、干细胞治疗、免疫治疗。所有孕妇均签署知情同意书,本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 研究方法 ①NIPT:孕12~22⁺⁶周抽取孕妇外周血5 ml,分离血浆游离DNA进行文库制备,在BGISEQ500测序平台(武汉华大基因科技有限公司)上进行全基因组高通量测序。将NIPT测序数据与人类基因组参考序列(HG 19, NCBI build 36)

进行比对。②侵入性产前诊断:NIPT提示高风险孕妇经产前遗传咨询,于孕18~22⁺⁶周行羊膜腔穿刺术,抽取羊水20 ml经培养、制片、显带后用Leica染色体分析系统进行拍照保存并阅片,每例标本计数20个分裂象,分析5个完整核型。参照人类遗传学国际命名体制(ISCN2013)对染色体核型命名。③外周血染色体核型分析:对所有NIPT提示SCA高风险的病例,在行侵入性产前诊断的同时行孕妇本人外周血染色体核型分析。

1.3 统计学处理 采用SPSS21.0软件对数据进行统计分析。正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料以率表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NIPT提示21、18、13-三体高风险孕妇的产前诊断结果 NIPT提示21、18、13-三体高风险孕妇共363例,其中21-三体高风险285例,18-三体高风险60例,13-三体高风险18例。经羊水细胞染色体核型分析证实,285例21-三体高风险孕妇中259例与NIPT结果一致,26例核型结果正常,为假阳性,NIPT对21-三体的PPV为90.88%;44例18-三体高风险孕妇羊水核型分析结果与NIPT一致,16例为假阳性,NIPT对18-三体的PPV为73.33%;13-三体高风险18例,5例经羊水细胞核型分析确诊一致,NIPT对13-三体的PPV为27.78%。见表1。

表1 NIPT高风险孕妇产前诊断结果

NIPT结果	总例数(例)	羊水细胞核型分析结果		性预测值(%)
		异常(例)	无异常(例)	
21-三体	285	259	26	90.88
18-三体	60	44	16	73.33
13-三体	18	5	13	27.78
合计	363	364	86	80.89

2.2 NIPT提示性染色体非整倍体孕妇产前诊断结果 NIPT提示SCA共89例,中性染色体数目偏多36例,性染色体数目偏少25例,性染色体数目异常28例;除2例孕妇拒绝行侵入性产前诊断外,余87例均接受了侵入性产前诊断,经羊水细胞核型分析证实56例为SCA,其中47,XXY 25例,47,XXX 14例,47,XYY 4例,嵌合体13例,假阳

性31例,假阳性率为35.63%(31/87)。NIPT对性染色体三体的PPV为82.86%,对性染色体单体的

PPV低于前者,为37.50%,两者间比较差异有统计学意义($P=0.00$)。见表2。

表2 NIPT提示性染色体非整倍体孕妇产前诊断结果

NIPT结果	总例数 (例)	羊水细胞核型分析结果					阳性预测值 (%)
		正常 (例)	47,XXY (例)	47,XXX (例)	47,XYY (例)	嵌合体 (例)	
性染色体偏多*	35	6	14	10	3	2	82.86
性染色体偏少*	24	15	0	0	0	9	37.50
性染色体数目异常	28	10	11	4	1	2	67.87
合计	87	31	25	14	4	13	64.37

注: *各有1例拒绝行侵入性产前诊断

2.3 NIPT提示SCA孕妇外周血染色体核型分析结果 NIPT提示SCA共89例,88例孕妇接受本人外周血染色体核型分析,结果发现12例染色体核型分析结果异常,其中嵌合型Turner综合征5例,47,XXX3例,46,XX,inv(9)2例,46,X,del(X)(q21.1q22.3)1例,46,XX,t(11;22)(q23;q11.2)1例,总异常率为13.63%,胎儿染色体核型分析均未见异常。见表3。

表3 NIPT提示SCA孕妇染色体核型分析异常结果

孕妇本人外周血核型分析结果	例数 (例)	检出率 (%)
45,X/46,XX	5	5.68
47,XXX*	3	3.41
46,XX,inv(9)	2	2.27
46,X,del(X)(q21.1q22.3)	1	1.14
46,XX,t(11;22)(q23;q11.2)	1	1.14

注: *1例孕妇未行产前诊断,仅行孕妇本人外周血染色体检查

3 讨论

1997年Lo等^[7]首次发现孕妇外周血浆中存在胎儿游离DNA,随后基于游离DNA高通量测序的NIPT迅速发展,并在临床试验中得到证实,是目前准确性最高的非整倍体产前筛查手段^[8],对于常见的染色体非整倍体疾病21-三体、18-三体和13-三体检测的敏感度可达98%,特异度超过99%^[9]。NIPT对于21-三体、18-三体和13-三体检测效率较高,成为目前产前筛查的热点^[10,11]。然而NIPT对于胎儿SCA检出的临床价值如何,NIPT是否应该将SCA作为目标检测疾病尚存在广泛争议^[12,13]。

尽管多项研究已证实NIPT在产前筛查常见染色体非整倍体中具有良好的临床有效性,但也存在

假阳性、假阴性的可能。Cheung等^[4]研究表明,NIPT的假阳性率相当高,其中对于21、18、13-三体的PPV分别为91%、77%和54%。本研究通过对363例这3种染色体疾病NIPT高风险孕妇进行产前诊断发现,NIPT对于21-三体、18-三体和13-三体的PPV分别为90.88%、73.33%和27.78%,略低于Cheung等的研究报道,可能与本研究NIPT高风险病例来自于不同检测机构,其诊断标准、测序深度不一有关。由于NIPT并非直接检测胎儿的遗传物质,因此存在假阴性及假阳性结果的风险^[14],本研究中假阳性病例较多,尤其是13-三体检阳性率高达72.22%,Benn等^[15]亦发现NIPT对13-三体的检测效能较低,认为与13号染色体的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸和胞嘧啶脱氧核糖核苷酸含量较低导致测序时产生偏差有关。此外,孕21-三体胎儿的母体血浆中胎儿游离DNA的含量会升高,而孕13-三体胎儿母体血浆中并不出现这种现象,这也降低了对其风险评估的准确性。因此,尽管NIPT的灵敏性和特异性较高,但不能替代确认性的胎儿染色体核型分析,NIPT高风险孕妇必须经过产前诊断进一步确诊。

SCA胎儿与常见的染色体非整倍体(21-三体、18-三体及13-三体)不同,表型多较轻微,孕期超声多无异常表现,可存活至出生或不影响寿命,但可有第二性征发育不良、身高发育异常和行为异常,是性腺发育及生育功能异常患者最主要的病因之一,因此对SCA胎儿的检出更需要安全、可靠的手段。随着NIPT技术的不断发展,目前不仅可检测常见的染色体非整倍体异常,而且可提示包括性染色体在

内的其他染色体非整倍体异常。本研究对 87 例 NIPT 怀疑 SCA 胎儿进行产前诊断,确诊 56 例,复合 PPV 为 64.37%,假阳性率为 35.63%。NIPT 对不同类型 SCA 检出的 PPV 不同,对胎儿性染色体三体的 PPV 为 82.86%,对性染色体单体的 PPV 低于前者,为 37.50%。Petersen 等^[17]在检测 712 例样本时发现,NIPT 对 47,XXY、47,XXX 和 45,X 的 PPV 分别为 87%、50%和 26%,与本研究一致。另外,值得注意的是,本研究 NIPT 提示性染色体数目偏少的 24 例胎儿经羊水细胞染色体核型分析,除 15 例正常胎儿外,其余 9 例胎儿核型分析结果均为 Turner 综合征的嵌合体型,郭颖等^[16]通过对大量研究总结发现,嵌合体是影响产前筛查和产前诊断结果准确性的重要因素之一。因此,专家建议针对 NIPT 提示所孕胎儿存在性染色体数目异常时,应在核型分析的同时进行性染色体的荧光原位杂交技术检测(fluorescence in situ hybridization, FISH),以排除性染色体嵌合体的可能。NIPT 筛查 SCA 假阳性率较高,分析其原因包括:①X 染色体和 Y 染色体高度同源不利于分辨;②X 染色体鸟嘌呤和胞嘧啶含量偏移;③Y 染色体与其他染色体相比,有较多的相似片段,使测序性噪比降低;④母体存在染色体拷贝数异常、限制性胎盘嵌合;⑤胎儿染色体存在嵌合,或双胎之一胎死宫内,这些因素均可造成分析不准确,导致假阳性率升高^[18,19]。

妊娠母体血浆中的游离 DNA 包括母体 DNA 片段和胎儿游离 DNA 片段,NIPT 通过高通量测序直接分析母体血浆中的游离 DNA 总量,比较受检个体与正常对照间的染色体测序片段数,因此母体存在染色体数目异常时会导致 NIPT 阳性。在该研究中,88 例 NIPT 提示 SCA 的孕妇接受本人外周血染色体核型分析,结果发现 12 例存在异常核型,其中嵌合型 Turner 综合征 5 例,47,XXX 3 例,46,XX,inv(9) 2 例,46,X,del(X)(q21.1q22.3) 1 例,46,XX,t(11;22)(q23;q11.2) 1 例,产前诊断胎儿核型均未见异常。Wang 等^[20]发现母体性染色体非整倍体尤其是嵌合体在 NIPT 检测中可导致假阳性,在该研究中有 8 例孕妇外周血染色体核型分析存在 SCA,其中 5 例为嵌合体,与 Wang 等的研究

一致。47,XXX 女性患者第二性征发育正常,大都具有生育能力,故目前仅 11%的 X 三体被检出,该研究发现的 3 例 47,XXX 综合征孕妇均因 NIPT 提示性染色体数目异常而被诊断。其中 1 例孕妇拒绝行侵入性产前诊断,孕妇准备再次妊娠时行外周血染色体核型分析诊断为 47,XXX,遗憾的是该孕妇当时因 NIPT 提示胎儿 SCA 未经产前诊断直接选择引产,因此,我们再次强调 NIPT 的局限性在检测前及检测后的咨询中均应谨慎讲解,充分告知孕妇 NIPT 假阳性原因和可能存在的问题,NIPT 高风险的孕妇必须经过产前诊断进一步确诊。

总之,NIPT 作为一种安全、快速的产前筛查手段,在筛查常见的 21、18、13-三体的同时能够筛查出部分 SCA 患儿,但阳性预测值偏低,必须进一步行侵入性产前诊断确诊;对 NIPT 提示胎儿 SCA 的孕妇有必要同时行孕妇本人的外周血染色体核型分析,以排除母体染色体异常。

参 考 文 献

- [1] Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation[J]. Clin Chim Acta, 2014, 428(2):44-50.
- [2] Sahota DS, Leung WC, Chan WP, et al. Prospective assessment of the Hong Kong Hospital Authority universal Down syndrome screening programme [J]. Hong Kong Med J, 2013, 19(2):101-108.
- [3] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study [J]. BMJ, 2011, 342:c7401.
- [4] Cheung SW, Patel A, Leung TY. Accurate description of DNA-based noninvasive prenatal screening [J]. N Engl J Med, 2015, 372(17):1675-1677.
- [5] Benn P, Borell A, Chiu R, et al. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7): 622-629.
- [6] Pieters JJ, Kooper AJ, van Kessel AG, et al. Incidental prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies: health, behavior, and fertility [J]. Isrn Obstet Gynecol, 2011, 2011: 807106.
- [7] Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma: progress through

- epigenetics[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1075(1):74-80.
- [8] Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy[J]. *Genet Med*, 2013, 15:395-398.
- [9] Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(9):578.
- [10] Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 211(4):365. e1-365. e12.
- [11] de Jong A, de Wert GM. Prenatal screening: an ethical agenda for the near future[J]. *Bioethics*, 2015, 29(1):46-55.
- [12] Benn P, Chapman AR. Ethical and practical challenges in providing noninvasive prenatal testing for chromosome abnormalities: an update[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(2):119-124.
- [13] Meck JM, Kramer DE, Matyakhina L, et al. Noninvasive prenatal screening for aneuploidy: positive predictive values based on cytogenetic findings [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 213(2):214. e1-5.
- [14] ACOG. Committee Opinion No. 640: Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(3): 31-37.
- [15] Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 42(1):15-33.
- [16] 郭颖, 常颖, 陈叙. 嵌合体形成及其对产前筛查及诊断结果的影响[J]. *国际妇产科学杂志*, 2018, 45(1):14-18.
- [17] Petersen AK, Cheung SW, Smith JL, et al. Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 217(6):691. e1-6.
- [18] Lebo RV, Novak RW, Wolfe K, et al. Discordant circulating fetal DNA and subsequent cytogenetics reveal false negative, placental mosaic, and fetal mosaic cfDNA genotypes[J]. *J Trans Med*, 2015, 13:260.
- [19] Mcnamara CJ, Limone LA, Westover T, et al. Maternal source of false-positive fetal sex chromosome aneuploidy in noninvasive prenatal testing[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 125(2):390-392.
- [20] Wang Y, Chen Y, Tian F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing[J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1):251-259.

(收稿日期:2019-01-03)

编辑:宋文颖