

孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测在产前筛查中的临床应用

彭园园* 张艳华 赵丽娟 高虹

(石家庄市第四医院产前诊断中心, 河北 石家庄 050011)

【摘要】 目的 探讨无创性染色体非整倍体检测技术在临床中的应用价值。方法 采用高通量基因测序技术对 1680 例孕妇进行母体血浆游离胎儿 DNA 检测, 分析胎儿染色体拷贝数。结果异常者进一步行羊水或脐血穿刺染色体核型分析以确诊。结果 1680 例孕妇中共报告异常 19 例, 包括 21 三体 10 例, 18 三体 3 例, 性染色体非整倍体 6 例。经羊水或脐血染色体核型分析, 检出的 10 例 21 三体中 1 例为假阳性, 6 例性染色体异常中 1 例为假阳性。游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术的敏感度为 100% (17/17), 特异度为 99.88% (1661/1663), 阳性预测值为 89.47% (17/19), 阴性预测值为 100% (1661/1661)。结论 利用高通量基因组测序技术检测孕妇血浆游离胎儿 DNA 行无创产前检测胎儿染色体非整倍体, 具有无创、快速、敏感特异等优势, 具有临床实际应用价值。

【关键词】 非整倍体; 游离胎儿 DNA; 无创产前检测

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.03.012

【Abstract】 **Objective** To investigate the value of noninvasive chromosome aneuploidy detection technology. **Method** High-flux sequencing was applied to analyze fetal chromosome sequence copy numbers in 1680 pregnant women. Fetal karyotyping was carried out on positive samples by amniocentesis or cordocentesis. **Results** Nineteen cases were detected with fetal chromosomal abnormalities by high-flux sequencing analysis, including 10 cases of trisomy 21, 3 cases of trisomy 18, 6 cases of sex chromosome aneuploidy. One case of trisomy 21 and one case of sex chromosome abnormalities were false positive identified by karyotyping. trisomy). The sensitivity and specificity of high-flux sequencing were 100% (17/17) and 99.88% (1661/1663), respectively. The positive predictive value was 89.47% (17/19), and negative predictive value of 100% (1661/1661). **Conclusions** High-flux sequencing analysis of free DNA derived from maternal plasma is noninvasive, rapid and highly sensitive and specific for detecting fetal chromosomal aneuploidies, which therefore has a broad clinically practical value.

【Key words】 aneuploidy; free fetal DNA; noninvasive prenatal test

我国是出生缺陷的高发国。据 2012 年中国出生缺陷防治报告显示, 目前我国出生缺陷率约为 5.6%, 每年新增出生缺陷儿约 90 万例。目前临床二级预防出生缺陷的主要方法是血清学筛查高危后进行羊水穿刺等有创产前诊断。但由于血清学筛查是通过孕妇血清标志物水平间接反应胎儿的情况,

存在约 5% 的假阳性率, 增加了不必要的有创产前诊断, 且检出率较低, 存在漏检的风险。而羊水穿刺等侵入性操作亦存在一定的流产率, 在实际应用中给孕妇及其家属带来了极大的精神心理负担。因此, 临床上急需一种更安全、高效、准确的非侵入性检测方法, 以提高现有产前筛查和产前诊断的效率和质量。

* 通讯作者: 彭园园, Email: pyyduck@163.com

随着 1997 年香港中文大学的卢煜明教授等^[1]首次发现母体外周血中存在游离胎儿 DNA 以及基因测序等技术的快速发展,无创产前检测(noninvasive prenatal test, NIPT)技术越来越受到临床的重视。本研究中我们采用高通量基因组测序技术检测孕妇血浆游离胎儿 DNA,以评估 NIPT 技术的准确性和临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1 月至 2013 年 11 月,共收集因高龄、产前筛查高风险、超声显示胎儿异常等同意进行无创产前检测的孕妇 1680 例,均为单胎,且无其他不适宜进行该检测的情况。孕妇年龄 19~47 岁,平均 29.78 岁,孕龄为 12~36 周,平均 20.56 周。孕妇临床资料详见表 1。

1.2 方法 经知情同意后抽取外周静脉血 5 ml。由北京贝瑞和康生物技术有限公司进行 DNA 提取、文库制备以及并行基因组测序。测试样本的 21 号染色体 T 值 ≥ 3 即判定胎儿为 21 三体高风险,18 号染色体 T 值 ≥ 3 即判定胎儿为 18 三体高风险。对检测结果阳性者进行羊水或脐血穿刺及染色体核型分析,对检测结果阴性者行电话随访其胎儿出生后情况。计数资料采用卡方检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 视为具有统计学差异。

表 1 1680 例无创产前检测孕妇的临床资料

分组	例数(构成比)
年龄 <35 岁	1359(81.89%)
分布 ≥ 35	321(19.11%)
孕周 12~15 周	37(2.20%)
分布 16~20 周	1025(61.01%)
21~25 周	412(24.52%)
26~30 周	181(10.77%)
31~35 周	22(1.31%)
36 周	1(0.06%)
孕周不详	2(0.12%)
风险指征分布 年龄高风险(≥ 35 岁)	321(19.11%)
低龄 21 三体高风险($\geq 1/270$)	399(23.75%)
低龄 21 三体临界风险($1/270 < X \leq 1/1000$)	404(24.05%)
低龄 18 三体高风险($\geq 1/350$)	19(1.13%)
低龄且产筛低风险($< 1/1000$)	34(2.02%)
产筛结果未知,本人要求,超声异常等	503(29.94%)

2 结果

所有孕妇均成功完成游离胎儿 DNA 检测,检测结果为阳性者共 19 例,包括 21 三体 10 例、18 三体 3 例、性染色体非整倍体 6 例(表 2)。高龄组孕妇的异常检出率为 2.49%(8/321),显著高于低龄组孕妇的 0.81%(11/1359)。未发现不同孕周患者的异常检出率存在显著性差异。

表 2 1680 例孕妇血浆游离胎儿 DNA 检测异常情况[n(%)]

分组	样本数	21 三体	18 三体	性染色体非整倍体	总计
风险指征					
年龄高风险	321	4(1.25)	2(0.62)	2(0.62)	8(19.11)
低龄 21 三体高风险	399	2(0.50)	0(0)	0(0)	2(23.75)
低龄 21 三体临界风险	404	2(0.50)	0(0)	1(0.25)	3(24.05)
低龄 18 三体高风险	19	0(0)	1(5.26)	0(0)	1(1.13)
低龄且低风险	34	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
产筛结果未知	503	2(0.40)	0(0)	3(0.60)	5(29.94)
年龄					
<35 岁	1359	6(0.44)	1(0.07)	4(0.29)	11(0.81)
≥ 35 岁	321	4(1.25)	2(0.62)	2(0.62)	8(2.49*)
孕周					
12~20 周	1062	6(0.56)	1(0.09)	3(0.28)	10(0.94)
21~25 周	412	2(0.49)	2(0.49)	1(0.24)	5(1.21)
26~36 周	204	1(0.49)	0(0)	1(0.49)	4(1.96)

注: * 与 <35 岁组孕妇相比, $\chi^2 = 5.16, P < 0.05$

游离胎儿 DNA 检测结果异常的 19 例孕妇均进行了羊水穿刺或脐血穿刺及染色体核型分析。结

果显示,1 例 21 三体高风险者为假阳性,1 例性染色体非整倍体者为假阳性,两者的染色体核型均正常。

截至发稿,对游离 DNA 检测结果阴性孕妇经随访新生儿出生情况,未诉明显异常。游离胎儿 DNA 检测对 21 三体检测的灵敏度为 100%(9/9),特异度为 99.94%(1670/1671),阳性预测值为 90%(9/10),阴性预测值为 100%(1670/1670);对 18 三体检测的灵敏度为 100%(3/3),特异度为 100%(1677/1677),阳性预测值为 100%(3/3),阴性预测值为 100%(1677/1677);对性染色体非整倍体检测的灵敏度为 100%(5/5),特异度为 99.94%(1674/1675),阳性预测值为 83.33%(5/6),阴性预测值为 100%(1674/1674)。因此,游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术的敏感度为 100%(17/17),特异度为 99.88%(1661/1663),阳性预测值为 89.47%(17/19),阴性预测值为 100%(1661/1661)。

3 讨论

Bianchi 等^[2]的研究显示 NIPT 对 21 三体、18 三体、13 三体的检测灵敏度分别为 100%、97.2% 和 78.6%,特异性均为 100%。国内 Dan 等^[3]的研究显示,NIPT 针对 21、18 三体的检测灵敏度为 100%,特异度为 99.96%。何小玲等^[4]对胎儿游离 DNA 用于产前检测染色体非整倍体准确性的系统评价显示,NIPT 对 21 三体的检测灵敏度为 100%,特异性为 99.3%;对 18 三体的检测灵敏度为 97.4%,特异性为 99.95%。本研究显示,NIPT 对 21、18 三体及性染色体非整倍体的检测敏感度均为 100%,特异度均达 99.9% 以上,与国内外报道一致。研究中有 1 例 21 三体和 1 例性染色体非整倍体为假阳性。母体血浆中胎儿 DNA 含量是影响结果准确性的因素之一。游离胎儿 DNA 主要来源于胎盘组织,其在母体血浆中的含量可能与胎盘屏障功能关系密切^[5]。如果存在胎盘钙化、胎盘发育不良、胎盘破损等胎盘屏障功能障碍,很可能会导致母体血浆中的游离胎儿 DNA 含量下降而影响检测结果。

目前产前筛查体系存在较高的假阳性率。除了对高危低龄孕妇进行产前诊断外,还需对日益增加的高龄孕妇进行产前细胞遗传学诊断,但现有医疗资源无法满足不断增多的产前诊断需要。国内外研究报道,对高风险孕妇的大规模血浆游离胎儿 DNA 高通量基因测序分析可以避免 98%~99% 的有创

操作^[6,7]。本研究通过 2 年的实际应用,可以看到对血清学筛查高风险的孕妇(739 例)先进行无创 DNA 检测,然后再进行羊水或脐血细胞培养和核型分析(11 例),可使 98.5% 的孕妇避免不必要的有创性产前诊断,极大地降低了孕妇的心理压力,也缓解了临床资源紧张的压力。

2012 年国际产前诊断学会发表声明指出,通过筛查、年龄或家族史确定为高风险的孕妇,可以进行 NIPT 检测^[8]。美国妇产科学会与美国母胎医学会也共同发表委员会指导意见,推荐 NIPT 作为非整倍体高危人群的初筛检测^[9]。2013 年 1 月美国国家遗传咨询师协会的指导意见认为^[10],NIPT 当前只作为产前染色体非整倍体评估的补充检测,其结果不能视为诊断,异常结果必须通过细胞遗传学诊断确诊。此外,由于缺乏在中低风险人群中的临床数据,NIPT 暂时不能替代现有的染色体非整倍体筛查方法。2012 年我国产前诊断技术专家组指出^[11],NIPT 检测技术是一种“近似于诊断水平”、“目标疾病指向精确”的产前筛查新技术,应该与现行的产前筛查体系相结合,并准确把握临床适用人群。

NIPT 检测胎儿染色体非整倍体具有以下优点:①安全无创,无流产及感染风险;②敏感性和特异性均高达 99% 以上;③孕 12 周以上均可进行检测,克服了传统产前诊断技术在取材及检测时间等方面的缺陷和限制;④检测周期短;⑤极低的假阳性率可大幅降低侵入性产前诊断比例。但是该技术也存在着一定的局限性:①不适用于本身为染色体病或携带者的孕妇和双胞胎孕妇;②仅针对 21 三体、18 三体和 13 三体,无法检测染色体结构异常;③血浆中游离胎儿 DNA 浓度较低时,检测的特异性和敏感性较差;④检测费用过高;⑤此技术目前仍定位为筛查实验,当出现高风险结果时需通过有创性诊断以确诊。

本研究为回顾性总结分析,不足之处在于未对大样本的孕妇同时开展 NIPT 检测、传统唐筛、羊水/脐血穿刺-核型分析 3 种方法之间的比较,缺乏假阴性率的评价,未能对 NIPT 技术的准确性做出完整的评估。

综上所述,随着科学研究的不断深入,检测样本量的增加,信息分析方法的不断优化以及未来临床规范的制定,相信 NIPT 技术应用于(下转第 20 页)

venous blood flow pattern in fetuses with severe tricuspid valve regurgitation[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2005, 26(2): 180-182.

- [30] Antolin E, Comas C, Torrents M, et al. The role of ductus venosus blood flow assessment in screening for chromosomal abnormalities at 10-16 weeks of gestation[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001, 17(4): 295-300.
- [31] Toyama JM, Brizot ML, Liao AW, et al. Ductus venosus blood flow assessment at 11 to 14 weeks of gestation and fetal outcome[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2004, 23(4): 341-345.
- [32] Borrell A, Martinez JM, Seres A, et al. Ductus venosus assessment at the time of nuchal translucency measurement in the detection of fetal aneuploidy[J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23(11): 921-926.
- [33] Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2005, 25(3): 221-226.
- [34] Figueras F, Puerto B, Martinez JM, et al. Cardiac function monitoring of fetuses with growth restriction[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110(2): 159-163.

- [35] Picconi JL, Hanif F, Drennan K, et al. The transitional phase of ductus venosus reversed flow in severely premature IUGR fetuses[J]. *Am J Perinatol*, 2008, 25(4): 199-203.
- [36] Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, et al. Predictors of neonatal outcome in early-onset placental dysfunction[J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 109(2 Pt 1): 253-261.
- [37] Geerts L, Odendaal HJ. Severe early onset pre-eclampsia: prognostic value of ultrasound and Doppler assessment[J]. *J Perinatol*, 2007, 27(6): 335-342.
- [38] Dahlback C, Pihlsgard M, Gudmundsson S. Abnormal ductus venosus pulsatility index in the absence of concurrent umbilical vein pulsations does not indicate worsening fetal condition [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 42(3): 322-328.
- [39] Zielinsky P, Marcantonio S, Nicoloso LH, et al. Ductus venosus flow and myocardial hypertrophy in fetuses of diabetic mothers[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2004, 83(1): 51-56.
- [40] 邓学东. 产前超声诊断与鉴别诊断[M]. 北京:人民军医出版社, 2013:321-323.

(收稿日期:2014-07-29)

编辑:宋文颖

(上接第 48 页)

胎儿染色体非整倍体检测的局限性将越来越小,检测准确率将越来越高,从而切实有效的推动我国的产前筛查和产前诊断工作。

参考文献

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350:485-487.
- [2] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing [J]. *Obstet Gynecol*, 2012, 119(5):890-901.
- [3] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(13):1225-1232.
- [4] 何小玲, 徐红兵. 母血胎儿游离 DNA 用于无创产前诊断染色体异常疾病准确性的系统评价[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(10):1130-1132.
- [5] 李玉芝, 任景慧, 林琳华, 等. 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(医学版)*, 2012, 41(4):475-480.

- [6] 向萍霞, 刘翎, 冷培, 等. 游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术在产前筛查的临床应用[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(10):777-780.
- [7] Chiu RW, Akolelar R, Zheng YW, et al. Noninvasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. *BMI*, 2011, 342:7401-7404.
- [8] Benn P, Borrell A, Cuckle H, et al. Prenatal detection of down syndrome using massively parallel sequencing(mps): a rapid response position statement from a committee on behalf of the board of the international society for prenatal diagnosis [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(1):1-2.
- [9] ACOG. Committee opinion no. 545: noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy[J]. *Obstet Gynecol*, 2012, 120(6): 1532-1534.
- [10] Devers PL, Cronister A, Ormond KE, et al. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors[J]. *J Genet Couns*, 2013, 22(3):291-295.
- [11] 边旭明, 蒋宇林, 戚庆炜. 产前诊断, 走中国自己的道路 [J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(11):801-803.

(收稿日期:2014-04-11)

编辑:孟梦