

血清学筛查联合胎儿非整倍体产前无创基因检测临床应用价值的研究

邱洁* 杨晓华 方虹 张红云 马竞 陈熙 吴琼玲

(深圳市宝安区妇幼保健院 产前诊断中心,广东 深圳 518133)

【摘要】 目的 探讨孕期血清学筛查联合无创性产前胎儿染色体非整倍体基因检测技术,应用于胎儿染色体非整倍体异常检出效率。**方法** 孕期适时行血清学筛查 23 039 例。采用时间分辨免疫荧光法检测,唐氏早、中期筛查,应用 Multicalc 软件评估出高风险,临界风险、单项生化指标异常,知情选择无创基因检测。**结果** 筛查出高风险 1546 例,占 6.71%,临界风险值 3257 例,占 14.17%,单项值异常 3018 例,占 15.86%,实施无创产前诊断 3342 例占 61.23%,介入性产前诊断 550 例,占 11.54%。产前诊断确诊胎儿染色体异常共 27 例,其中非整倍体 19 例,占 0.39%,其他染色体异常 8 例,占 0.16%,知情告知签字不落实产前诊断发生出生缺陷 7 例。调查表明,临界风险选择无创基因检测样本例数占 61.23%,羊水样本例数占 11.54%,无创检测高风险数经羊水再次核型分析一致性达 100%。**结论** 血清学产前筛查联合无创产前胎儿非整倍体 DNA 检测可提高产前诊断效率,特别是对临界风险值瓶颈线的突破起关键性作用,降低胎儿染色体非整倍体病率,是快捷、安全、较介入性产前诊断易于接受、大批量进行、值得推广是今后发展的必然趋势。

【关键词】 血清学筛查;无创产前诊断;胎儿染色体 DNA;非整倍体;基因检测

【中图分类号】 R446.11 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To study the clinical value of screening fetal aneuploidy, using a combination of maternal serum examination and massively parallel sequencing (MPS) based non-invasive prenatal diagnosis (NIPD). It improves the ability to identify chromosomal abnormalities for decreasing the birth defect. **Method** The study included 23 039 pregnancies between the 9th and 20+6th gestational week, who underwent Down's syndrome screening by time-resolved fluoroimmunoassay technology with maternal serum biomarkers in the first trimester and second trimester. The risk of trisomy 21 and trisomy 18 was estimated by software Multiaale, based on a model which generated the final risk for fetal aneuploidies from the pregnant woman's a priori age risk and the likelihood ratio of the distribution of the biochemical markers, according to the gestational weeks. The pregnancies assessed with high risk, critical risk and abnormal single biochemical indices chosed noninvasive genetic testing with informed consent. **Results** Screening tests identified 6.71% ($n=1546$) high-risk pregnancies and 14.17% ($n=3257$) critical risk pregnancies in this group. 59.17% ($n=2842$) and 11.54% ($n=550$) of the patients consented to non-invasive and invasive diagnosis respectively. 27 fetal chromosomal abnormalities were detected, of whom, 0.39% ($n=19$) were identified to chromosomal aneuploidies and 0.16% ($n=8$) were other abnormalities. According to the feedback of fetal delivery, 7 cases of refused prenatal diagnosis were diagnosed as birth defect. **Conclusions** A combination of maternal serum examination and massively parallel sequencing based non-invasive prenatal diagnosis improve the effect of prenatal diagnosis. It improves the ability to

* 通讯作者:邱洁,Email: qjijie6262@126.com

decrease the birth defect. Compared to the invasive diagnosis, massively parallel sequencing based non-invasive prenatal diagnosis is safe and convenient for detecting fetal aneuploidy.

【Key words】 serum screening; non-invasive prenatal diagnosis; fetal chromosomal; aneuploidy; genetic testing

目前 21 三体、18 三体和 13 三体是最常见胎儿先天性缺陷,占活产新生儿 1/700~1/800,居染色体非整倍体异常疾病发病首位,占 70%^[1,2],目前尚无有效治疗方法,一旦发生出生缺陷,会给社会和家庭带来沉重负担。通过产前筛查、诊断是减少出生缺陷有效的预防手段,目前产前诊断方法包括无创性方法和有创性(介入性)两大类,前者对胎儿染色体病诊断起到辅助作用,胎儿染色体非整倍体无创基因检测(non-invasive fetal trisomy, NIFTY)^[3]是目前无创产前检测方法之一,流程简便,且无流产、感染等风险,易于接受;有创性产前诊断对染色体病诊断具有较高的准确性,但是有发生流产、死胎、感染等风险^[4],且周期长,有培养失败的可能,因而部分孕妇存有心理负担,不愿接受有创性检查,因此无创产前检测是未来发展的趋势^[5,6]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2012 年 12 月,本院产前建册适时行血清学早期、中期筛查 23 039 例,筛查结果 21 三体、18 三体和 13 三体高风险、临界风险、单项值异常人群知情告知选择,实施胎儿染色体非整倍体无创基因检测(NIFTY)^[7,8]或选择介入性产前诊断者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清学早筛和中筛 各抽取空腹血 2~3 ml,应用芬兰 Wallal 公司型号 1235001-129704 时间分辨荧光免疫仪检测,操作过程严格按试剂盒说明操作^[9]。

1.2.2 染色体收获 每例制备 6~8 张染色体玻

片,羊水培养基 changMediun 最佳采集时间为 18~24 周^[10],采用染色体分析系统 LEICADM4000B/600(德国 Leica)。

1.2.3 胎儿染色体非整倍体基因检测 采集孕妇 12~24 周外周血 5 ml,提取其中游离 DNA^[11],采用第二代高通量测序技术进行覆盖度测序^[12-14],最后通过生物信息分析胎儿 DNA,分析得出胎儿患染色体非整倍体疾病的风险率^[15],因为该方法不是最终诊断结果,若检测为高风险仍需进行介入产前诊断。

1.2.4 判定标准 应用 Multiaale 软件^[16],结合孕妇一般信息、年龄、体质量、末次月经、有否使用胰岛素、胎数等计算风险切割值。21 三体风险分割值 1:270,≥1:270 为高风险,1:270~1:500 为临界风险;18 三体风险分割值 1:350,≥1:350 为高风险,1:350~1:1000 为临界风险值;13 三体风险分割值 1:100,≥1:100 为高风险,1:100~1:1000 为临界风险值^[17]。单项生化指标不在参考范围内。

2 结果(表 1)

2.1 2011 年 1 月至 2012 年 12 月,血清学筛查结果 21 三体、18 三体和 13 三体高风险为 1546 例,占 6.71%,较全国均数 5.67%^[3,18]稍高;21 三体、18 三体和 13 三体临界风险 3257 例,占 14.17%,与全国均数 13.9%^[3,19]接近;单项生化指标异常 3018 占 15.86%。

2.2 孕妇外周血查胎儿染色体非整倍体无创基因检测共 3342 例,占高风险和临界风险产前诊断的 61.23%。

表 1 血清学筛查风险值与产前诊断出生缺陷情况

高风险数 (21、18、13 三体)	临界风险数 (21、18、13 三体)	单项生化指标异常 (PAPP-A、AFP、HCG、uE3)	产前诊断		染色体异常	
			无创	有创	非整倍体	其他
1546(6.71%)	3257(14.17%)	3018 (15.86%)	3342(61.23%)	550(11.54%)	19(0.39%)	8(0.16%)

注:1. 单项生化指标异常(PAPP-A, HCG, AFP, uE3)不在参考范围内;2. 无创产前诊断高风险 3 例,最终经羊水胎儿染色体确诊一致性 100%

2.3 介入性产前诊断本院只开展羊膜腔穿刺术共 550 例,占高风险和临界风险产前诊断的 11.54%,产前诊断确诊出胎儿染色体异常共 27 例,其中非整倍体 19 例,占 0.39%,其他染色体异常 8 例,占 0.16%,知情告知签字不落实产前诊断发生出生缺陷 7 例,其中筛查出高风险 3 例,占 0.19%,临界风险 3 例,占 0.09%,低风险 1 例,占 0.04%。

2.4 因无创基因检测不是金标准,检测 3342 例中 3 例高风险经羊水染色体再次确认一致率 100%,终止妊娠,有效地杜绝出生缺陷的发生。

2.5 无创基因检测低风险中 4 例,在产前三级超声 20~24 周检查发现因胎儿畸形选择终止妊娠外,其余返回产前门诊例行产检,新生儿随访。

3 讨论

表 1 中,21 三体、18 三体、13 三体临界风险 3257 例,占 14.17%,与全国均数 13.9%^[3,23]较为接近,临界风险产前诊断出染色体非整倍体 3 例,占 0.09%,单项值异常占 15.86,通过无创基因检测发现 2 例 21 三体异常。早、中筛查介于 1/270~1/1000 临界值^[24]是目前提高筛查与产前诊断的热点,目前大部分医疗机构仅对高风险人群实施产前诊断,临界风险易忽略,此风险值范围易出现漏筛与忽略,因此对临界风险选择无创产前诊断临床价值及发展趋势意义重大,但是由于该方法仅针对 21、18、13 三体 3 种染色体病,存有局限性不适宜检测如胎儿染色体中的嵌合体、易位型、微缺失、微重复等结构异常^[24],尽管快捷、无风险,但费用高,目前还不能广泛应用。目前深圳市已实施政府补贴部分、个人出部分,若社保出部分,参与性覆盖面会大大提高。

胎儿非整倍体无创基因检测是基于提高产前诊断准确性及降低产前诊断技术风险为目的。无创胎儿 DNA 诊断的思路及取样方式是取孕妇外周血直接分析胎儿的遗传信息,而非通过母源标志物间接对胎儿进行风险评估,本院采用的是母血游离 DNA 片段,最早可于孕后 5 周在母血中测出^[20],为产前诊断提供新的诊断依据。胎儿游离 DNA 的更新和凋亡可能与滋养层细胞有关,早期报道胎儿游离

DNA 占母体血浆总 DNA 的 3%~6%。针对 35 岁以下 15~20 周单胎孕妇进行产前血清学早、中期筛查,并对高风险孕妇知情选择介入性产前诊断,虽然对降低唐氏儿的出生率起到一定的作用,但仍然存在较多问题,主要缺乏大批量实施和质量监控,从而影响产前诊断的实施效率、服务利用率及覆盖面。目前各大医疗机构产前诊断细胞学人才匮乏,制约了产前诊断的发展,要想在现有的基础上进一步做好产前诊断工作,无创产前诊断胎儿染色体非整倍体基因检测无疑是未来发展的趋势,其与传统产前诊断相比具有高灵敏性、特异性^[22],孕妇易于接受,有效减少了对孕妇身体的创伤,减轻了心理精神负担,为众多家庭及社会所受益。

本次研究发现,筛查高风险占 6.71%,较全国均数 5.67%稍高,临界风险 3257 例,占 14.17%,较接近全国均数 13.9%^[24],单项值异常中 AFP 值低,通过无创基因检测、羊水检测确诊发现 2 例胎儿染色体异常。目前在我国多个单位采用中期筛查主要有 3 种:应用芬兰 Wallal 公司型号 1235001-129704 时间分辨荧光免疫仪检测、酶联免疫法和化学发光法,本院采用的是应用芬兰 Wallal 公司型号 1235001-129704 时间分辨荧光免疫仪检测,数据来自国外与我国孕妇人群各项指标,不排除标准是有差异的,即假阳性率偏而导致后续产前诊断率上升。提高产前筛查质量及产前诊断检出率,包括具体技术问题如临界风险值的处理和本地中位数校正及质量控制高风险人数仍需探讨。

本次研究筛查数 23 039 例,产前诊断确诊胎儿染色体异常共 27 例,其中非整倍体 19 例,占 0.39%,其他染色体异常 8 例,占 0.16%。虽然筛查人数逐年增多,单纯依赖介入性产前诊断力量是远远不够的,产前筛查和产前诊断服务扩展到一定区域,一方面对筛查高风险人群的产前筛查的后续诊断问题仍为瓶颈问题,另一方面根据我国《母婴保健法》凡是年龄大于 35 岁初产妇都建议产前诊断^[25]。大中城市近几年高龄孕妇数越来越多,占产前诊断比例大,若以年龄为单一指标,原有产前诊断工作量加大,产前诊断存在高不确定性^[26]和高风险性,指征把握不好势必增加其他染色体病漏诊风险。

对于医疗卫生资源而言,最大程度优化产前诊断流程是当务之急,胎儿染色体非整倍体无创基因检测快速、便捷、易于接受则能大大改善产前诊断的服务模式,其综合效益大为提高,临床应用价值大,前景无量。

参 考 文 献

- [1] 张丹丹,李练兵,马明福,等. 出生缺陷的研究进展[J]. 中国优生优育,2010,16(1):4-7.
- [2] 喻琼,邓志辉. 利用孕妇血浆中胎儿游离 DNA 进行无创性产前基因诊断的研究进展[J]. 实验与检验医学,2012,30(1):1-3.
- [3] 边旭明,戚庆炜. 染色体异常产前筛查和产前诊断工作任重而道远[J]. 实用妇科与产科杂志,2010,26(12):889-890.
- [4] 吴清明,周瑾. 出生缺陷产前筛查及产前诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(1):129-131.
- [5] 王艳,胡平,许争峰. 血浆、血清游离核苷酸与产前诊断[J]. 现代妇产科进展,2011,20(3):236-238.
- [6] Wald NJ. Prenatal screening for open neural tube defects and Down syndrome: three decades of progress [J]. Prenat Diagn,2010,30(7):619-621
- [7] Nakata N,Wang Y,Bhatt S. Trends in prenatal screening and diagnostic testing among women referred for advanced maternal age [J]. Prenat Diagn,2010,30(3):198-206.
- [8] Jaques AM,Collins VR,Muggli EE,et al. Uptake of prenatal diagnostic testing and the effectiveness of prenatal screening for Down syndrome [J]. Prenat Diagn,2010,30(6):522-530.
- [9] Huang T, Hoffman B, Meschino W, et al. Prediction of adverse pregnancy outcomes by combinations of first and second trimester biochemistry markers used in the routine prenatal screening of Down syndrome [J]. Prenat Diagn,2010,30(5):471-477.
- [10] Hörmansdörfer C, Corral A, Scharf A, et al. Comparison of current methods of prenatal screening for down syndrome [J]. Rev Esp Salud Publica, 2010, 84(1): 43-51.
- [11] Benn PA, Chapman AR. Ethical challenges in providing noninvasive prenatal diagnosis [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2010, 22(2): 128-134.
- [12] Wright D, Bradbury I, Malone F, et al. Cross-trimester repeated measures testing for Down's syndrome screening: an assessment [J]. Health Technol Assess, 2010, 14(33): 1-80.
- [13] Wang M, Lu S, Zhu Y, et al. ADAM12 is an effective marker in the second trimester of pregnancy for prenatal screening of Down syndrome [J]. Prenat Diagn, 2010, 30(6): 561-564.
- [14] 宋志娇,童晓文,纪亚忠. 利用母体中胎儿遗传物质进行无创性产前诊断的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,18(2):102-104.
- [15] 苏辰,张毅,孙树汉. 基于胎儿遗传物质的唐氏综合征无创性产前诊断的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,2(2):102-106.
- [16] 李玉芝,任景慧,林琳华,等. 大规模并行基因组测序技术应用与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,2012,84(4):475-480.
- [17] 龚小会,李笑天. 胎儿遗传特征与产前诊断[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2010,26(12):956-959.
- [18] 王靖,陈汉平. 母体外周血中游离胎儿核酸物质在无创性产前诊断中的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(11):3-5.
- [19] 邓华艳,陈华云,丁渭,等. 唐氏综合征无创产前诊断的研究[J]. 热带医学杂志,2010,10(9):1069-1071.
- [20] 郭奇伟,周裕林. 唐氏综合征的无创产前诊断的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(4):137-139.
- [21] 黄仲军. 唐氏综合征产前检查的研究进展[J]. 安徽医学,2011,32(8):1043-1045.
- [22] 苗杰,黄庆,府伟灵. 无创产前诊断染色体非整倍体的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(8):877-879.
- [23] 薛燕萍,曹焯,刘新正,等. 孕中期唐氏综合征学期筛查联合无创产前基因诊断价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(6):580-582.
- [24] 舒青青,吴胜兰,何俊英,等. 联合血清学和超声进行产前筛查的临床价值[J]. 2010,7(30):76-78.
- [25] 侯巧芳,张卫华,吴东. 利用母体血浆游离胎儿 DNA 进行 SRY 基因定量检测[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(6):537-539.
- [26] 纪颖,郑晓瑛. 贫困地区出生缺陷患者家庭的负担分析[J]. 现代预防医学,2011,38(2):267-272.

编辑:郁君

(收稿日期:2013-05-04)