

无创 DNA 阳性结果的验证和分析

燕凤 陈必良 徐慧 李春燕 徐盈 王德堂 郭芬芬 黎昱 郑娇 张建芳

(第四军医大学西京医院妇产科产前会诊中心,陕西 西安 710032)

【摘要】 目的 探讨无创 DNA 产前检测在产前诊断中的应用及价值。**方法** 对 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在西京医院妇产科做羊水穿刺的病人资料回顾性分析,发现因无创阳性做羊水穿刺的孕妇 84 例,用羊水染色体核型分析和 FISH 对其结果进行验证,并对两者不一致的结果进行电话随访。**结果** 无创 DNA 84 例阳性结果中 21-三体 48 例,经羊水穿刺后确认为假阳性的有 2 例;18-三体 11 例,经羊水穿刺后确认为假阳性 3 例;13-三体 4 例,经羊水穿刺验证 2 例为假阳性;性染色体异常 21 例,经验证 6 例假阳性。**结论** 孕妇外周血中游离胎儿 DNA 检测对 21-三体检测准确率达 95.8%,18-三体准确率 73%,性染色体检出准确率 71%,13-三体准确率 50%。无创 DNA 是产前筛查 21-三体的有效方法,对其他染色体异常的检测还需要进一步提高现有检测技术。

【关键词】 无创 DNA 产前检测;异常结果;核型分析;FISH

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application value of non-invasive gene detection of aneuploidy in fetal as noninvasive prenatal diagnosis. **Method** The amniocentesis and karyotyping results in Xijing Hospital from January 2012 to December 2014 were retrospectively analyzed. The only indication for amniocentesis in these group of woman was positive NIPS (Non-invasive prenatal screening) results. 84 case of positive NIPS results were required for validating by fetal karyotype analyzing through invasive procedures such as amniotic cavity. The NIPT result were compared with the fetal karyotyping and FISH for verification and analysis, telephone follow up after fetus birth for the chromosome result. **Results** Abnormal 84 cases did amniotic fluid puncture or umbilical cord puncture and chromosome karyotype analysis, 48 cases of trisomy 21 were detected that 2 cases were false positive, 11 cases of trisomy 18 were detected that 4 cases were false positive, 4 cases trisomy 13 were detected that 2 cases were false positive, 21 cases abnormal in sex chromosome were detected that 6 cases were false positive. **Conclusions** Sequencing technology of free fetal DNA in pregnant women, detection of trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13 and abnormal in sex chromosome accuracy up to 95.8%, 73%, 71% and 50%. Non-invasive detection of DNA was an effective method of prenatal screening of trisomy 21, but on trisomy 18, 13 trisomy and sex chromosome detection rate, accuracy rate to be further improved existing technologies.

【Key words】 noninvasive DNA prenatal testing; abnormal test results; karyotype analysis; FISH

染色体非整倍体是指相对于人正常的 46 条染色体细胞中的一条或几条染色体数目增加或减少。目前,我国新生儿中染色体的发病率为 1/60,其中

21-三体、18-三体和 13-三体是 3 种最主要的染色体非整倍体疾病。目前临床上对胎儿这几种病变产前诊断方法主要是通过 B 超引导下的羊水穿刺染色体核型分析,该技术检测所需时间长,穿刺过程又对胎儿有一定的风险。因此,寻求安全、准确、快速的无创产前检测技术是优生优育的基本需要。而

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2016.02.005

基金项目:陕程(L03-09)

* 通讯作者:张建芳, E-mail: zhzhao@163.com

胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测通过采取孕妇静脉血,利用新一代 DNA 测序技术对母体外周血浆中的游离 DNA 片段(包含胎儿游离 DNA)进行测序,并将测序结果进行生物信息分析,可以从中得到胎儿的遗传信息^[1]。本研究利用高通量测序技术检测孕妇外周血中的游离 DNA,对其异常结果进行分析验证,旨在探讨无创 DNA 产前检测的临床应用价值。

1 材料与方 法

1.1 基本资料 2012年1月至2014年12月在西京医院妇产科产前诊断中心因无创产前基因检测结果高风险的孕妇84例,自愿做羊水穿刺。使用染色体 FISH 和核型分析对无创结果进行验证并对每个孕妇的妊娠结局的进行随访。

1.2 方 法

1.2.1 染色体制备 B超引导定位,在无菌条件下,采用羊水专用穿刺针经腹部穿刺,抽取15 ml 羊水,经离心处理后接种于培养瓶内,置37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养,培养液为 CHANG MEDIUM。经过换液后观察,镜下见小堆贴壁细胞长成大的克隆,并出现成对圆形透亮细胞,即可加入秋水仙碱收获细胞,经低渗、数次固定后常规制片,60~80℃烤片2小时。G显带染色分析。

1.2.2 FISH 检测 未培养的羊水参照金菩嘉公司提供的操作步骤处理后进行 FISH 分析。每个杂交区至少数100个信号强、无重叠的杂交细胞。CSP18/X/Y 探针和 GLP13/21 探针。阳性判断标准:GLP13/21、CSP18/X/Y 探针至少计数100个细胞,非整倍体细胞比例>60%判为非整倍体。非整倍体细胞比例>30%为嵌合体。

1.2.3 追踪随访 对因无创阳性做羊水穿刺确诊的孕妇进行电话随访,随访其妊娠结局或出生后孩子的性别及出生后的健康状况。

2 结 果

无创 DNA 84 例阳性结果中,21-三体 48 例,18-三体 11 例,13-三体 4 例,性染色体异常 21 例。无创 84 例阳性结果无创提示 48 例 21-三体经羊水染

色体核型和 FISH 验证 16 例为 21-三体,2 例假阳性,假阳性率为 4.2%。无创 DNA 检出 18-三体 11 例经验证,3 例假阳性,假阳性率为 27%;无创 13-三体高风险有 4 例经验证 2 例为假阳性,假阳性率为 50%;无创 DNA 提示性染色体异常 21 例,经核型和 FISH 验证 6 例为假阳性,假阳性率为 29%。

84 例无创 DNA 结果异常的孕妇均对其进行了电话随访,其中染色体异常结果共 71 例引产 70 例,其中 1 例胎儿核型 47,XXY,孕妇不想引产。因孕妇已发生 3 次胚胎停育此次自愿继续妊娠。其中 13 例无创 DNA 假阳性结果经染色体核型和 FISH 确认染色体核型正常的出生后电话随访后,家属均口述发育正常,健康,随访发现性别与染色体结果均一致。

3 讨 论

在孕妇妊娠期开辟一种安全、可靠的产前筛查和产前诊断方法进行产前干预,是当前降低出生缺陷率最切实可行的方法。目前侵入式取样是产前诊断的金标准,但其存在一定的弊端^[2]。因此针对妊娠高危人群进行多技术联合筛查和诊断,并根据病人自身情况作出合适的选择。胎儿染色体非整倍体无创基因检测技术它具有无创性、孕早期检测、相对血清学检查有很高的准确性。早孕期检测最主要的优势是早发现、早诊断、早干预,早期终止妊娠相对于中期引产更安全,还可以减少孕妇及家属的焦虑。但胎儿染色体非整倍体无创基因检测技术也有一定的局限性。首先该技术对目前检测的对象具有局限性,如母体本身染色体有异常(如嵌合体,21-三体平衡易位携带),或者母体在孕前期接受异体输血、移植手术、干细胞治疗等,均对检测结果的准确性造成影响。并且孕妇孕周较大接受胎儿染色体非整倍体无创基因检测,检测的结果为阳性的,再接受羊水穿刺手术检查胎儿染色体,不仅增加病人的焦虑感,而且手术的风险也相对增加。因此不建议孕周超过 24 周的孕妇做无创基因检测。同时对于 B 超筛查如心脑血管系统异常,羊水量异常,明显器官、四肢异常及 NT 值异常的都不建议做无创基因检测。同时,双胎或多胎也不适合做无创基因检测。

影响无创 DNA 检测结果准确性的主要因素是孕妇外周血中胎儿游离 DNA 浓度。如果胎儿游离 DNA 浓度低于 3%, 检测结果的准确性将受到一定的影响^[3,4]。研究表明, 孕妇血清中游离 DNA 的含量受孕周和体重的影响。一般认为孕 8 周后孕妇外周血中游离胎儿 DNA 含量上升并稳定存在, 孕期胎儿 DNA 含量在 5%~50%, 孕周越大 DNA 含量越高。无创 DNA 要求孕妇血清中游离 DNA 的含量占外周血中总 DNA 的 50% 以上, 所以当孕妇由于各种原因导致自身游离 DNA 含量增高时孕妇血中胎儿游离 DNA 含量就相对偏低, 这时就会导致检测失败。临床上引起孕妇自身 DNA 增高的原因有溶血、肿瘤等, 另外也可能与个体差异有关。如孕妇自身体重指数肥胖, 将增加循环血量而导致的稀释作用, 使孕妇血液中胎儿游离 DNA 浓度降低^[5]; 孕妇自身游离 DNA 总量随体重指数按比例增加, 而胎儿游离 DNA 不增加, 即相当于胎儿游离 DNA 浓度降低^[6]。

目前无创 DNA 技术被倾向于定位为 T21、T18 和 T13 等常见染色体非整倍体的筛查手段, 受检者需要在给予充分咨询、知情同意的情况下自愿选择参加无创 DNA 检测。

对于本次研究无创结果与传统胎儿染色体方法进行分析发现, 其中 21-三体的准确率最高, 其次为 18-三体 and 性染色体, 13-三体的准确率相对较差。研究发现 18-三体、性染色体检测稳定性较差, 受 GC 含量干扰所致^[7], Jiang F 等^[8]以标准 Z-Score 值为基础, 通过改进染色体内标参照及计算方式, 实现结果值变异系数小, 一定程度上克服 GC 含量问题, 提高和稳定了 18-三体及性染色体检出率, 而后继研究需要我们不断克服技术难题, 并逐步推向临床。综上所述, 胎儿染色体非整倍体无创基因检测技术对于诊断 21-三体综合征敏感性及特异性高, 且因其为无创诊断, 能有效缓解孕妇及家属的心理负担, 故该检测方法可应用于唐氏综合症的早期产前诊断的新技术。

本次实验采用羊水核型分析和 FISH 技术对无创 DNA 进行验证, 核型和 FISH 的符合率为 99%, 只有 1 例结果不一致, FISH 结果为 45,XO(35%)/

46,XX, 而核型结果为 45,XO 究其原因, 这是因非整倍体细胞传代培养时较正常细胞生长速度快, 原有的正常细胞比例就会在传代被稀释, 如分子技术很易检测的 45,XO/46,XX 嵌合, 经细胞培养后的核型分析为单纯 45,XO。抽脐血验证后以 FISH 结果为准。FISH 技术作为一个新的生物学诊断技术, 可以对流产组织及产前诊断标本进行目标染色体数目异常的检测。本研究中通过和常规细胞遗传学方法的对比, FISH 技术显现出独特的优势: ①检测周期短, 可以 48~72 小时出结果; ②检测成功率高, 本研究中成功率达到了 100%; ③取材时间不受孕周限制; ④检测标本不受限; ⑤操作简便; ⑥FISH 技术是低嵌合体检出判断的金标准。但是 FISH 技术也有一定的局限性, 只能检测目标染色体数目异常, 对染色体结构异常不能检测。因此 FISH 技术作为独立的产前诊断技术是有一定风险的。

因此对于国内目前的技术现状, 做好孕妇产前诊断遗传咨询工作至关重要, 根据孕妇的不同临床情况做出不同的检查项目。由于无创 DNA 检测技术的一些局限性^[9,10], 所以, 目前的胎儿染色体诊断以细胞遗传学和 FISH 为主, 无创 DNA 检测技术和基因芯片等技术可以对传统方法进行有益的补充, 多种检测方法联合应用, 以提高产前诊断的准确性、成功率。目前出现如此多的快速产前诊断技术, 目的是促进优生医学的发展, 而不应成为临床专业人员的障碍当然也提出了更高的要求, 如何选择应用这些技术, 如何达到最优的质量控制, 如何做到检测前后最充分的咨询等。

参 考 文 献

- [1] 边旭明. 胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(5): 330-333.
- [2] 杨灿锋, 石锦平, 肖建平, 等. 无创 DNA 测序与传统方法在产前诊断应用中的比较[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(11): 27-28.
- [3] Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study[J]. Genet-Med, 2011, 13(11): 913-920.
- [4] Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of

- maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study [J]. Genet Med, 2012, 14(3): 296-305.
- [5] Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies [J]. Prenat Diagn, 2013, 33: 667-674.
- [6] Vora NL, Johnson KL, Basu S, et al. A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI [J]. Prenat Diagn, 2012, 32: 912-914.
- [7] Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21791.
- [8] Jiang F, Ren J, Chen F, et al. Noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies [J]. BMC Med Genomics, 2012, 5: 57.
- [9] Cavallotti D, Casilla G, Piantelli G, et al. Early complications of prenatal invasive diagnostics: perspective analysis [J]. Acta Biomed Ateneo Parmense, 2004, 75 Suppl 1: 23-26.
- [10] Fan HC, Gu W, Wang J, et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome [J]. Nature, 2012, 487(10): 320-324.

(收稿日期: 2016-03-24)

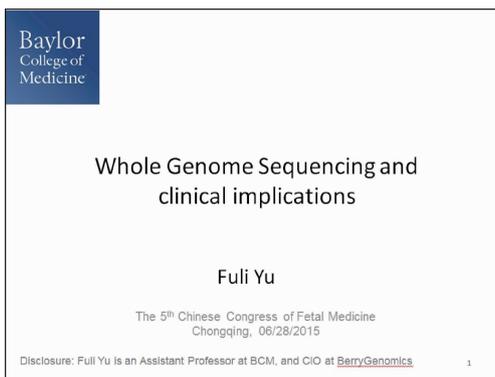
编辑: 宋文颖

· 视频导读 ·

全基因组测序及临床应用

于福利

(美国贝勒医学院)



全基因组测序是当今遗传学领域的热门话题。全基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体的基因组测序。1986年, Renato Dulbecco 是最早提出人类基因组定序的科学家之一。也有人称这一技术是一个改变世界的技术。

在第五届中国胎儿医学大会上, 我们邀请到了来自贝勒医学院的于福利教授讲授了有关全基因组测序的课题。于福利教授来自贝勒医学院人类基因组测序中心, 致力于大规模人类基因组学研究, 特别在人类遗传变异及其在群体遗传学中的特性, 以及遗传疾病病因的揭示等方向颇有建树。于教授曾参与多项国际

重大人类基因组项目。这些项目包括人类基因组单体型项目(The HapMap Project)、人类千人基因组项目(The 1000 Genomes Project)、人类心血管疾病项目(The CHARGE Project)等。他的讲课能让我们更深入地了解这一全新的领域。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2016.02.006