

无创产前基因筛查在单双胎中的应用研究

彭海山 黄华洁 杨洁霞 侯亚萍 郭芳芳 齐一鸣 罗晓辉 王东梅 王奕霞 尹爱华*
(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 通过对广东地区双胎和单胎应用 NIPT 进行染色体非整倍体的研究对比,为双胎应用 NIPT 进行筛查增加研究数据的支持。**方法** 收集了2015年1月至2017年7月在广东省妇幼保健院自愿进行 NIPT 检测的单胎妊娠孕妇15 206例,双胎孕妇442例。分析入组孕妇的基本信息和结果。对高风险孕妇建议进一步行染色体核型分析进行确证,同时进行了 NIPT 与核型结果的分析,低风险孕妇均进行电话随访。**结果** 单胎和双胎在年龄与孕周上无显著性差异,但在受孕方式上,双胎组以 IVF 试受分者占比较多。单胎中 21、18、13-三体的灵敏度为 100%,90%,100%,特异度为 99.96%,99.98%,99.95%,阳性预测值分别为 89.66%,75%,36.36%,双胎中 21、18-三体的灵敏度均为 100%,特异度为 100%和 99.77%,阳性预测值分别为 100%和 50%。**结论** NIPT 在单胎和双胎中的筛查效果相似,NIPT 用于双胎妊娠的染色体非整倍体筛查有一定的应用价值,其对 21-三体的筛查效率高于 18-三体。

【关键词】 无创产前筛查;单胎;双胎;筛查效果

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Comparing the performance of NIPT in singleton and twin pregnancies for screening aneuploidy in Guangdong area, aim at adding data for supporting to apply NIPT in twin pregnancies. **Method** Collecting 15206 maternal blood samples of singleton pregnancies and 442 samples from twin pregnancies who voluntarily accepted NIPT in Guangdong Province Women and Children hospital during January 2015 to July 2017. Information and results of pregnancies were analyzed. Pregnancies with high risk results of NIPT received a suggestion for a confirmation by karyotype, with comparing the results of NIPT and karyotype. Pregnancies with low risk were followed up by telephone. **Results** There is no difference between singleton and twin pregnancies in age and gestational weeks. In method of conception, IVF is strikingly increasing in twin pregnancies. In singleton pregnancies, the sensitivity of trisomy 21, 18, 13 is 100%,90%,100% respectively; specificity is 99.96%,99.98%,99.95%; positive predictive value is 89.66%,75%,36.36%. In twin pregnancies, for trisomy 21 and 18, sensitivity of all is 100%, specificity is 100% and 99.77%; positive predictive value is 100% and 50%. **Conclusions** There is no difference of NIPT performance between singleton and twin pregnancies. Noninvasive prenatal screening for chromosomal aneuploidy is valuable in twins. The screening performance of trisomy 21 is better than it of trisomy 18.

【Key words】 noninvasive prenatal screening; singleton; twin; performance of screening

近年来,由于人们生育时间的推迟以及辅助生殖技术的发展,辅助生殖成为受孕困难患者的首要选择,而促排卵药物的使用导致越来越多的双胎妊

娠甚至是多胎妊娠发生^[1-4]。与单胎妊娠相比,双胎妊娠的染色体非整倍体发生率更高且筛查工作更为复杂,集中在双胎的合子性质对筛查的影响以及双胎更容易发生有创产前诊断的并发症等方面^[1,3,4]。因此,急需一项创伤性小且准确有效的筛查手段解

决双胎妊娠的产前筛查需求。

无创产前基因筛查因其筛查的高效准确且创伤性小无并发症等优点,在临床上受到了广泛的关注和应用^[5]。目前,已有许多文献报道无创产前基因筛查在单胎妊娠人群中有着很高的检出率与准确性,且许多专家学者也提出了其方法的可扩展性。国内外已有将无创产前基因筛查应用于双胎染色体非整倍体的筛查可能性的研究,但目前数据积累较少,仍需进一步证据支持。本文就广东地区双胎与单胎应用 NIPT 进行染色体非整倍体筛查进行对比研究,旨在为 NIPT 的双胎筛查增加研究数据的支持。

1 资料和方法

1.1 研究方案和对象 选择 2015 年 1 月至 2017 年 7 月于本院产检并自愿接受 NIPT 的孕妇双胎妊娠 442 例,单胎妊娠 15 206 例。纳入标准:①孕周 12 周以上;②孕妇体重 100kg 以下;③夫妻染色体未发现明显异常者;④近一年内未接受过异体输血,细胞治疗,免疫治疗及无移植手术者。双胎妊娠孕妇年龄为 16~48 岁,孕周 12~33 周。单胎妊娠孕妇年龄为 16~50 岁,孕周 12~38 周。所有孕妇均充分告知了 NIPT 的临床适应证和局限性,并签署了知情同意书且本研究通过广东省妇幼保健院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 抽取孕妇外周静脉血 8ml 置于 EDTA 抗凝管中,8 小时内分离血浆后分装保存于一 80℃ 冰箱。

1.2.2 NIPT 流程及数据分析 使用博奥晶芯胎儿染色体非整倍体检测试剂盒提取血浆游离 DNA 及制备文库,使用 ION Proton (life technology, America) 平台高通量测序。测序结果经生物信息学处理后通过 Z-score 值来判断某条染色体是否有拷贝数的异常,主要判断标准为:当 $Z \geq 3$ 时,结果提示为三体高风险;当 $-3 < Z < 3$ 时,结果提示为非整倍体低风险;当 $Z \leq -3$ 时,提示为单体高风险。

1.2.3 结果验证 NIPT 结果提示低风险的孕妇定期常规产检;提示为高风险的孕妇,建议进一步行羊水或脐血穿刺,通过染色体核型分析结果检验

NIPT 结果的准确性。

1.2.4 妊娠结局随访 打电话对所有孕妇妊娠结局追踪随访或查阅本院电子病历,包括孕期超声筛查结果、妊娠结局、新生儿体检的外貌、结构、智力发育等。

1.3 统计分析 应用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析,计数资料采用率表示,计算 NIPT 的灵敏度,特异度,阳性预测值,阴性预测值。计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 单双胎妊娠孕妇信息 除去临床信息不全和失访病例,共收集单胎孕妇 15 206 例,双胎孕妇 442 例,具体信息见表 1。单胎与双胎在年龄和孕周分布上无差别, χ^2 分别为 9.655 和 4.51, P 分别为 0.086 和 0.341。高龄所占比例分别为 35.14% 和 38.91%, $P = 0.101$ 。然而,在单胎妊娠孕妇中,通过 IVF 方式获得胎儿的仅占 4.14%,双胎中将近一半的受孕方式是 IVF。且双胎中大部分是双合子双胎。

表 1 单双胎孕妇基本信息

	双胎		单胎	
	例数 (例)	比重 (%)	例数 (例)	比重 (%)
年龄(岁)				
<20	4	0.90	115	0.76
20~24	29	6.56	1581	10.40
25~29	111	25.11	4170	27.42
30~34	126	28.51	3997	26.29
35~39	144	32.58	4485	29.49
40~49	28	6.33	858	5.64
高龄(≥ 35)	172	38.91	5343	35.14
孕周(周)				
12~15 ⁺	142	32.13	4820	31.70
16~19 ⁺	204	46.15	6762	44.47
20~23 ⁺	54	12.22	2339	15.38
24~27 ⁺	22	4.98	759	4.99
≥ 28	20	4.52	526	3.46
受孕方式				
IVF	228	51.58	630	4.14
非 IVF	214	48.42	14576	95.86
绒毛膜性质				
DCDA	302	68.33	—	—
MCMA	2	0.45	—	—
MCDA	86	19.46	—	—
未知	52	11.76	—	—
双胎之一消失/ 停育/宫内死亡	15	3.39	—	—

2.2 双胎妊娠孕妇 NIPT 结果及核型结果 442 例自愿进行 NIPT 的双胎妊娠孕妇中,共检出高风险 3 例。3 例高风险孕妇均选择进一步有创产前诊断,经染色体核型分析,其中 1 例 21-三体高风险,结

果确诊为 47,XN,+21;2 例 18-三体高风险,一例确诊为 47,XN,+18,后行选择性减胎术,另一例结果为 46,XN,选择继续妊娠。具体情况见表 2。

表 2 双胎妊娠无创检测异常与产前诊断结果比较

序号	无创检测 结果	产前诊断结果		产前诊断例数 (例)	真阳性例数 (例)	阳性预测值 (%)
		胎一	胎二			
1	T21	47,XN,+21	46,XN	1	1	100
2	T18	47,XN,+18	46,XN	2	1	50
3	T18	46,XN	46,XN			

2.3 NIPT 对单双胎妊娠筛查效能比较 15 206 例单胎妊娠孕妇中,NIPT 高风险选择进一步行产前诊断者共 81 例,其中经染色体核型分析确诊共 65 例。双胎 3 例高风险中确诊 2 例。在对单胎妊娠低风险孕妇的随访中,发现 1 例 18-三体假阴性病例,后经染色体核型确定为 18-三体嵌合。双胎妊娠低风险孕妇随访未发现异常。比较 NIPT 在单胎和双胎中的筛查效能,具体情况见表 3。

表 3 单双胎 NIPT 检测效能比较

项目	单胎妊娠 (n=15 206)			双胎妊娠 (n=442)		
	T21	T18	T13	T21	T18	T13
产前诊断例数(例)	58	12	11	1	2	—
真阳性例数(例)	52	9	4	1	1	—
阳性预测值(%)	89.66	75	36.36	100	50	—
假阴性例数(例)	0	1	0	0	0	0
阴性预测值(%)	100	99.99	100	100	100	100
灵敏度(%)	100	90	100	100	100	—
特异度(%)	99.96	99.98	99.95	100	99.77	—

3 讨论

染色体非整倍体是缺陷儿出生的主要原因,21、18、13 及性染色体三体综合征是最常见的染色体非整倍体^[2]。虽然我国从 2001 年开始实施出生缺陷干预工程,但出生缺陷率仍高达 5.6%,出生缺陷人数每年新增约 90 万人。大多出生缺陷无有效治疗手段,通过产前筛查和产前诊断进行出生缺陷的预防和干预是降低出生缺陷率最有效的手段^[6]。由于受生活方式改变和环境等多因素影响,不孕症患者逐渐增多,辅助生殖技术帮助了许多不孕症患者的同时也使得双胎和多胎妊娠发生率明显增加。本研究显示双胎中接受辅助生殖技术的比例明显高于单

胎妊娠,大约 51.58%左右的双胎是通过 IVF 方式受孕,而单胎妊娠中 IVF 的比例只占到了 4.14% (表 1)。自然状态下,双胎发生率约 1/90,而目前我国双胎妊娠发生率可达 2%^[7]。有研究表明,相对于单胎,双胎妊娠胎儿异常的发生率更高,且双胎的染色体非整倍体产前筛查更为复杂,主要表现在传统血清学筛查对双胎的检出率更低,假阳性率更高,而双胎妊娠进行有创产前诊断时更容易导致流产早产,需要承担更大的风险^[2,8,9]。因此,对于双胎妊娠,迫切需要一项安全且有效的筛查方式。

随着胎儿游离 DNA 理论的提出和高通量测序技术的发展,实现无创性的产前筛查成为可能。同时,由于该项技术无创、安全、高效,很快得到了广泛的应用,已有许多数据表明在单胎妊娠孕妇中,NIPT 有着优秀的检测效果,但双胎数据较少^[9]。虽然有证据表明 NIPT 在双胎筛查中对 21-三体的筛查效能较高,有潜在的应用价值^[10,11],但仍需要进一步的数据积累证明,目前指南中双胎仍是慎用人群。本研究收集了 442 例行 NIPT 的双胎孕妇,共检测出 1 例 T21、2 例 T18。经有创产前诊断结果证实 21-三体全部可被识别,18-三体有 1 例被正确识别,T21、T18 的灵敏度均为 100%,且该两例正确识别孕妇的胎儿情况均为一胎染色体异常,另一胎正常。本研究中 T21 的阳性预测值可达 100%,T18 阳性预测值为 50%,由于未检出 13-三体,其阳性预测值不可得。对比于单胎 21、18、13 的检测结果,T21 阳性预测值 89.66%,T18 阳性预测值 75%,T13 阳性预测值 36.36%,双胎的检测效能与单胎类似,对 21-三体的筛查效果比 18-三体高,说明 NIPT 在双胎染色体非整倍体筛查中有一定的应用价值。

虽然 NIPT 在双胎妊娠中有一定的应用价值,但是不可否认,相对于单胎而言,NIPT 应用于双胎需要更慎重。鉴于 NIPT 的检测原理,其结果的准确性与胎儿游离 DNA 的浓度即胎儿分数是密切相关的。未对胎儿浓度进行讨论是本研究的不足之处。对于单胎,检测要求胎儿游离 DNA 达到 4% 以上才符合检测标准,否则可能检测不到胎儿染色体异常,造成假阴性。而双胎由于合子性质的影响,更为复杂。单合子双胎由于由一个受精卵分裂而来,绝大部分的单合子双胎所含的遗传物质相同,可等同于单胎。双合子双胎则有着不同的遗传物质,是两个独立的胎儿,且有研究表明,在两个遗传物质不同的双胎中,两个双胎对胎儿游离 DNA 的贡献量是不同的,甚至可以达到 2 倍的差异^[12]。在双合子双胎中,常常存在一胎正常而另一胎异常的情况,通常正常胎儿贡献的游离 DNA 量比异常胎儿的高,这样就容易造成即使总体胎儿浓度分数达到检测要求也可能由于异常胎儿游离 DNA 量不足导致假阴性的发生。为了防止此情况的发生,有部分研究采用了释放较少 DNA 的一胎的胎儿浓度分数进行结果判读分析,但此方法由于胎儿浓度变低,可导致检测失效率增加^[13]。因此,NIPT 在双胎妊娠中应用如何增加检测成功率的同时又能够最大程度避免假阴性结果的可能是将来研究的方向。

4 结论

研究表明 NIPT 用于双胎妊娠的染色体非整倍体筛查有一定的应用价值,其对 21-三体的筛查效率高于 18-三体。由于 13-三体无阳性例数的缘故,对其的筛查效率未做评价。该结论需要大数据进一步支持证实。

参 考 文 献

[1] 姚静怡,崔岚,岳胜,等. 双胎妊娠胎儿染色体非整倍体产前筛查的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志,2017,44(1):67-

70.

- [2] 于文倩,吕远,尹少尉,等. 无创产前检测技术在双胎染色体非整倍体疾病筛查中应用研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2016,32(10):986-989.
- [3] 周希亚,刘俊涛. 双胎妊娠非整倍体异常的产前筛查与产前诊断[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2015,31(7):607-609.
- [4] 魏媛,赵扬玉. 双胎妊娠产前筛查和产前诊断[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2015,31(9):829-832.
- [5] 张颖. 无创产前基因检测的临床应用及遗传咨询[J]. 中国计划生育学杂志,2017,25(12):809-811.
- [6] 林晓娟,李静,宋筱玉,等. 5687 例高通量基因测序产前筛查指征及结果分析[J]. 中国妇幼健康研究,2017,28(10):1279-1281.
- [7] 许旭平,谢美娟,甘海燕,等. 基于高通量测序技术无创筛查双胎染色体非整倍体及胎儿游离 DNA 浓度分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2016,8(6):375-379.
- [8] Fosler L, Winters P, Jones KW, et al. Aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing in twin pregnancy[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2017,49(4):470-477.
- [9] 王佳燕,陈敏,吴莉,等. 无创产前基因检测双胎 21、18 和 13-三体综合征的应用研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2017,33(5):497-501.
- [10] Gil MM, Accurti V, Santacruz B, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2017,50(3):302-314.
- [11] Liao H, Liu S, Wang H. Performance of non-invasive prenatal screening for fetal aneuploidy in twin pregnancies: a meta-analysis[J]. Prenat Diagn,2017,37(9):874-882.
- [12] Du E, Feng C, Cao Y, et al. Massively parallel sequencing (MPS) of cell-free fetal DNA (cffDNA) for trisomies 21, 18, and 13 in twin pregnancies[J]. Twin Res Hum Genet,2017,20(3):242-249.
- [13] Sarno L, Revello R, Hanson E, et al. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2016,47(6):705-711.

(收稿日期:2018-08-21)

编辑:刘邓浩