

高通量基因测序产前筛查技术(NIPT)在常州地区的临床应用经验总结

张玟 刘建兵 张晓青 周琴 陈英苹 史焱 虞斌*

(南京医科大学附属常州市妇幼保健院,江苏 常州 213003)

【摘要】 目的 探讨孕妇血浆中游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术(NIPT)在常州地区产前筛查中的临床应用经验总结及推广。**方法** 选择 2012 年 10 月至 2016 年 3 月在常州市妇幼保健院产前诊断中心就诊的 6505 例单胎孕妇在知情同意的情况下抽取孕妇外周血 10ml,4 小时内分离血浆中游离 DNA 建立文库,采用 Illumina Nextseq CN500 测序平台对其进行测序分析,对测序结果进行生物信息分析,提示染色体异常患者再行羊膜腔穿刺,羊水细胞培养后染色体 G 显带核型分析。对确诊患者建议终止妊娠。**结果** 6505 例检测样本中 NIPT 结果提示有 97 例胎儿染色体异常,其中 81 例孕妇自愿接受羊水穿刺。①胎儿常染色体非整倍体 49 例(T21 43 例,T18 5 例,T13 1 例),羊水培养核型分析后发现:T21 阳性预测值达 95.1%,T18 4 例确诊(4/5),T13 1 例确诊(1/1);②32 例性染色体非整倍体异常,其阳性预测值达 53.1%,包括:14 例 45,XO 高风险中仅确诊 4 例,假阳性 10 例;12 例 47,XXY 高风险,进一步确诊发现 8 例,4 例假阳性;最后确诊 2 例 47,XXX 和 2 例 47,XXY。**结论** NIPT 技术在唐氏综合征筛查上准确性高、假阳性率低;T18,T13 样本少无统计学上意义。在性染色体数目筛查方面,结果准确性偏低,特别体现在 Turner 综合征,故对 45,XO 筛查结果在遗传咨询须谨慎处理。

【关键词】 唐氏综合征;无创性产前诊断(NIPT);胎儿游离 DNA;性染色体异常;产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To explore the clinical performance of massively parallel sequencing-based non-invasive prenatal testing (NIPT) in Changzhou in China. **Method** A total of 6505 maternal blood samples were collected from Oct 2012 to Mar 2016 at the prenatal diagnosis center of Changzhou maternal and child health care hospital. The peripheral venous blood from the pregnancies was drawn, plasma cell-free fetal DNA was extracted in 4 hours after sampling, the sequencing library was established. High-throughput sequencing procedure was carried out on Illumina NextSeq500 platform. The pregnancies with fetal chromosomal abnormalities were advised to accept prenatal fetal chromosomal karyotype analysis of amniotic fluid cells using G-banding technique. **Results** High-throughput sequencing detected 97 pregnancies with fetal chromosomal aneuploidies in 6505 pregnancies. After receiving informed consent, 81 voluntarily accepted amniotic fluid prenatal diagnosis. ① 49 were autosomal chromosome aneuploidy (of which 43 cases were trisomy 21, 5 cases were trisomy 18, and 1 case was trisomy 13) by NIPT. The positive predictive value for trisomy 21 was 95.1%. 4 cases were diagnosed as trisomy 18 and 1 case was diagnosed as trisomy 13. ② The positive predictive value for sex chromosomal abnormalities was 53.1%. Among 14 positive cases of 45,X by NIPT, there were only 4 true positive cases confirmed by amniotic fluid prenatal diagnosis. There were 12 cases of 47,XXY by NIPT, only 8 cases were confirmed by amniotic fluid prenatal diagnosis. 3 positive cases of 47,XXX and 2 positive cases of 47,XYY also confirmed. **Conclusions** The use of

NIPT for DS was high accuracy and low false positive rate, however, the accuracy of sex chromosomal aneuploidies was very low, especially for Turner's syndrome. Genetic counseling should be handled with care.

【Key words】 Down's syndrome; non-invasive prenatal testing; cell-free fetal DNA; sex chromosomal aneuploidies; amniotic fluid; prenatal diagnosis

出生缺陷日益成为突出的公共卫生问题和社会问题。据统计,目前我国出生缺陷发生率在 5.6% 左右,每年新增出生缺陷人数约 90 万^[1,2]。出生缺陷不仅影响儿童的生命健康和生活质量,而且影响整个国家人口素质和人力资源的健康存量,影响经济社会的健康可持续发展。我国政府对出生缺陷防控极为重视,相关法律法规不断完善,出生缺陷防治体系逐步健全,三级防治措施深入落实。其中二级预防措施,即通过产前筛查/诊断及时阻断严重缺陷儿出生,是预防出生缺陷最有效的关键环节。

本院从 2012 年 10 月引进高通量基因测序产前筛查技术(NIPT),并于 2015 年获得国家首批临床应用试点单位资质,在临床率先开展了该项目服务,逐渐在常州市形成“一个平台、多个分中心”的网络化 NIPT 产前筛查体系,避免本地孕妇到无资质的民营医院就诊。NIPT 产前筛查体系先后经历了以下几个标志性阶段:

第一阶段,2012 年 10 月至 2014 年 2 月,项目试点开展阶段。常州市产前诊断中心与湖南省家辉遗传医院合作,省内率先、市内首家在临床试点开展高通量基因测序产前筛查项目。期间共完成 1633 例,发现 34 例高风险病例。

第二阶段,2015 年至今,胎儿染色体非整倍体 NIPT 临床检测阶段。2015 年 1 月项目组争创为国家首批高通量基因测序产前筛查临床应用试点单位,引进了二代测序平台,建立高通量测序实验室,4 月正式在临床开展了 NIPT 项目,率先在江苏省内实现了从问诊、检测、报告解读、遗传咨询本地化全流程服务,填补了常州市该领域的空白。到目前为止,已完成 4872 例筛查,共发现胎儿染色体非整倍体异常 34 例(T21 26 例,T18 7 例,T13 1 例),经羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析确诊,对这 3 种常见胎儿染色体非整倍体的检出率达 95% 以上,达

到国际先进水平。

第三阶段,2015 年 9 月,对胎儿性染色体非整倍体 NIPT 临床探索阶段。在应用 NIPT 技术产前筛查 3 种常见胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)的基础上,进一步拓展 NIPT 产前筛查的应用范围,重点加强了胎儿的性染色体及其他染色体异常的临床探索性研究。至今,共完后 6505 例检测,发现性染色体异常 32 例,经羊水确诊 17 例,准确率达 53.13%,达到国际先进水平。

第四阶段,2015 年 6 月,区域性 NIPT 网络化建设阶段。项目组依托常州市产前诊断网络,在省内率先推进 NIPT 规范化网络建设,实现了市产前诊断中心与市产前筛查机构双向转诊、信息互通机制,协助常州市卫生和计划生育委员会在省内首家出台地方性规范开展高通量基因测序产前筛查的规范化文件,在武进、金坛和溧阳三个地区分别建立了产前筛查分中心,形成了“一个平台、多个分中心”横向网络化产前筛查联合体,将先进的产前筛查技术全面辐射到全市。

本研究大致分为两大部分,第一、高通量基因测序染色体非整倍体产前筛查的临床应用研究,2012 年 10 月起,常州市产前诊断中心先后经历了试点开展、平台搭建、常见疾病筛查、其他疾病筛查几个过程,主要研究内容与效果如下:

1 高通量基因测序在染色体非整倍体产前筛查的临床研究

1.1 资料与方法

1.1.1 研究对象 2012 年 10 月至 2016 年 3 月,在常州市妇幼保健院产前诊断中心就诊,经知情同意自愿选择 NIPT 的 6505 例单胎孕妇,孕龄 15~26 周,年龄 18~49 岁。NIPT 指征如下:血清学筛查高风险(即 21-三体综合征风险值 $\geq 1/300$, 18-三体综合征风险值 $\geq 1/350$)、血清学筛查临界风险(即

1/1000≤21-三体综合征风险值<1/300,1/1000≤18-三体综合征风险值<1/350)、高龄(预产期年龄≥35岁)、超声提示胎儿结构异常、超声软指标异常、染色体非整倍体生育史及部分自行要求行NIPT检测的孕妇。武进、金坛和溧阳产前筛查分中心已经外送69例标本至本中心检测。

1.1.2 方法

1.1.2.1 高通量基因测序产前筛查检测 孕妇知情同意后,使用 Streck 公司生产的 cell-free DNA BCT 采血管抽取孕妇外周血 10ml,室温保存时 48 小时内分离血浆,4℃条件下 1600×g 离心 10 分钟,取上清血浆 16000×g 离心 10 分钟,分离上清血浆至 EP 管中,得到不少于 1.2ml 血浆。提取血浆中胎儿游离 DNA,构建文库。采用 Illumina Next-Seq500 测序平台对其进行测序,获得不低于 400M 的有效 reads 数,平均每个样本不低于 4M 的 reads。运行序列比对软件 BWA map 将测序所得序列比对至人类基因组参考序列图谱。使用自有软件 BGD v2.0.1 针对对比对结果进行每条染色体序列个数统计。计算每条染色体 reads 所占比例(%hrN), sample 代表需检测的样品,mean% ChrN_{reference} 和 S. D. %ChrN_{reference} 分别代表参照样品组平均值和变异系数,并利用以下公式计算各个染色体 Z 值。利用 Z 值来评估样本的实际患病情况(cutoff:|Z|=3)。

$$\text{chrN } Z\text{-score for test sample} = \frac{\% \text{chrN}_{\text{sample}} - \text{mean} \% \text{chrN}_{\text{reference}}}{\text{S. D. } \% \text{chrN}_{\text{reference}}}$$

Z>3 时代表该染色体可能是三倍体,Z<-3 代表该染色体可能是单倍体。

1.1.2.2 羊水穿刺细胞培养和核型分析 对无创基因测序提示性染色体非整倍体异常患者,进行产前遗传咨询,经知情同意后于孕 18~22 周在超声引导下行羊膜腔穿刺术,细胞培养、制片、阅片过程均按本实验室常规操作进行。

1.2 结果

1.2.1 6505 例 NIPT 检测的孕妇情况分布 常州地区 6505 例实施 NIPT 检的孕妇基本情况分布,高龄孕妇 2090 例;中孕期唐氏血清学筛查高风险

1948 例,临界风险 1240 例;其他情况(超声提示胎儿结构异常、超声软指标异常、染色体非整倍体生育史及部分自行要求行 NIPT 筛检的孕妇)1098 例,见表 1。

表 1 常州地区 6505 例 NIPT 检测的孕妇情况分布

特征	例(%)
孕妇年龄	
≥ 35 岁	2090(32.13)
唐氏血清学筛查结果	
高风险	1948(29.95)
临界风险	1240(19.06)
其他情况	1227(18.86)

1.2.2 中孕期各类筛查指征孕妇的 NIPT 检测结果 对中孕期唐氏血清学筛查高风险及临界风险人群,以及高龄妊娠孕妇行 NIPT 的筛查结果与羊水染色体核型分析确诊结果进行比对(表 2)。

表 2 中孕期各类筛查指征孕妇的 NIPT 结果及阳性预测值

因素类型	例数(例)	NIPT 高风险	检出率
高龄	2090	24	1.15%
T21		12	0.57%
T18		2	
T13		-	
SCA		10	
高风险	1195	34	2.85%
T21		16	1.34%
T18		8	
T13		1	
SCA		8	
临界风险	1240	19	1.53%
T21		5	0.40%
T18		4	
T13		-	
SCA		10	

注:SCA,性染色体非整倍体异常

1.2.3 NIPT 筛查高风险结果和产前诊断的结果比较 6505 例检测样本中 NIPT 结果提示有 97 例胎儿染色体异常,经产前遗传咨询,81 例孕妇自愿接受羊水穿刺,其中胎儿常染色体非整倍体 49 例(T21 43 例,T18 5 例,T13 1 例),羊水培养核型分析后发现:① 41 例 T21 核型结果与 NIPT 结果一致,对 T21 阳性预测值达 95.1%;② 5 例 T18 高风险孕妇发现 4 例核型结果与 NIPT 结果一致,1 例为假阳性,NIPT 对 T18 阳性预测值达 80.0%;③ 1 例 T13 高风险孕妇经羊水细胞学确诊。见表 3。

表3 NIPT 检测高风险结果与羊水核型分析结果比较

综合征类型	NIPT 高风险 (例)	TP (例)	FP (例)	PPV (%)	发生率 (%)
T21	43	41	2	95.30	0.70
T18	5	4	1	80.00	0.16
T13	1	1	0	100.00	0.03
SCA	32	17	15	52.17	0.32
Total	59	45	14	76.27	1.21

注:TP:真阳性;FP:假阳性;PPV:阳性预测值;SCA:性染色体非整倍体异常

2 高通量基因测序在胎儿性染色体非整倍体的产前筛查临床研究

2015年9月,在应用NIPT技术产前筛查3种

表4 NIPT 检测胎儿性染色体异常结果同羊水检查结果比较

例号	产前诊断指征	NIPT 结果	羊水染色体核型结果
1	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	46,XX
2	高龄妊娠	47,XXY	46,XY
3	高龄妊娠	45,X	46,XX
4	血清学筛查 21-三体临界风险	47,XXX	47,XXX
5	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	46,XX
6	血清学筛查 18-三体高风险	45,X	45,X
7	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	45,X
8	高龄妊娠	47,XXY	47,XXY
9	高龄妊娠	45,X	45,X
10	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	46,XX
11	高龄妊娠	45,X	46,XX
12	高龄妊娠	47,XXX	47,XXX
13	血清学筛查 21-三体高风险	47,XXY	47,XXY
14	血清学筛查 21-三体高风险	47,XXX	47,XXX
15	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	45,X
16	高龄妊娠	47,XXY	46,XY
17	血清学筛查 21-三体临界风险	47,XXY	47,XXY/46,XY
18	其他人群	45,X	46,XY
19	高龄妊娠	46,XY(X部分重复)	46,XY
20	其他人群	47,XXY	47,XXY
21	高龄妊娠	45,X	46,XX
22	其他人群	47,XXY	47,XXY
23	血清学筛查 21-三体高风险	47,XXY	47,XXY
24	血清学筛查 21-三体高风险	47,XXY	47,XXY
25	血清学筛查 21-三体临界风险	46,XY(X部分重复)	Chr(X)p22.2-p22.13 0.82M 重复
26	其他人群	45,X	46,XX
27	高龄妊娠	47,XXY	47,XXY
28	其他人群	47,XXY	47,XXY
29	高龄妊娠	46,XY(X部分缺失)	46,XY
30	高龄妊娠	47,XXX	46,XX
31	血清学筛查 21-三体高风险	45,X	46,XX
32	高龄妊娠	45,X	46,XX

常见胎儿染色体非整倍体的基础上,项目组进一步拓展NIPT产前筛查的应用范围,重点加强了胎儿的性染色体的临床研究。

2.1 资料与方法 同“高通量基因测序染色体非整倍体在产前筛查的临床研究”的研究内容和方法。

2.2 结果 6505例样本中经NIPT筛查发现胎儿性染色体异常32例。羊水细胞核型分析确诊17例胎儿性染色体非整倍体,灵敏度(真阳性率)仅为53.13%。

3 讨论

1997年香港中文大学卢煜明教授^[3]发现,母体外周血中存在游离胎儿DNA,大概在孕4周的时候含量很少,孕8周的时候明显增多,随孕周增加稳定存在,浓度约3%~13%,被认为主要来自胎盘,并在分娩后数小时内从母体血液中清除。母体血中存在的胎儿游离DNA,为无创DNA检测提供了理论基础。这一发现成为无创DNA检测的基础,发表在1997年的《柳叶刀》杂志上。无创胎儿非整倍体检测(NIPT)是一项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(可以是全基因组测序,也可以选择一部分区域进行目标区域测序),并将测序结果进行生物信息分析,得到胎儿的遗传信息,从而判断胎儿是否患21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征这三大染色体疾病的新兴技术。所谓“无创”,是指对胎儿没有创伤,这是相对于传统介入性检测的一个概念(介入性检查准确度高,但手术取样操作会有一定胎儿流产风险,概率在0.5%~1%)。NIPT的出现,改变了整个产前诊断领域的格局,也获得国内外相关专业学会及专家的高度关注。顶级医学期刊《新英格兰医学杂志》评价这是“无创产前检测的新时代”^[4]。

目前,有创产前诊断技术包括绒毛穿刺、羊水穿刺、脐血穿刺,具有染色体核型分析高准确率的优点,且能分析出除了染色体数目异常外的结构异常,为产前诊断的金标准,但是诊断技术取样时却存在0.5%~2%的流产风险,容易导致胎膜早破、绒毛羊膜炎、阴道出血、早产等并发症^[5]。然而,无创产前检测具有高准确性、无创伤等优点,且有效降低了侵入性操作引起的流产、感染等风险,便于孕妇接受,同时其适用于孕12~26周的所有孕周,克服了传统产前诊断技术在取材以及检测时间等方面的缺陷和限制,可广泛应用于临床。但NIPT也存在一些不可避免的缺陷,比如:①不适用于孕妇本身为染色体数目异常的孕妇,而在临床上此类孕妇对产前诊断的需求更大;②筛查仅针对21-三体、18-三体、

13-三体的染色体数目异常疾病,无法准确检测染色体结构异常,如部分缺失、易位、倒位等,且对于三体疾病中存在的嵌合体,精确深度测序仍存在难度;③孕妇游离胎儿DNA含量低于检出量时,会降低检测的特异性、敏感性和准确性^[6]。

对无创DNA检测结果异常者进行羊水染色体核型分析,结果表明:①43例NIPT提示T21高风险孕妇发现41例核型结果与NIPT结果一致,对T21阳性预测值达95.1%,与目前文献报道相符^[7,8];②5例NIPT提示T18高风险孕妇发现4例核型结果与NIPT结果一致,1例为假阳性;③1例T13高风险孕妇经羊水细胞学确诊。但18-三体和13-三体临床样本较少有关可能与其低发病率及高流产率有关,我国唐氏综合征的发病率为1/800~1/600^[9],Edward综合征发病率明显低于唐氏综合征,大约为1:3000。Patau综合征发病率约为1:25000^[10]。18-三体和13-三体临床数据有待进一步积累资料或多中心资料综合分析才能进一步探讨。以上的结果更进一步说明无创DNA检测技术可以作为传统产前诊断技术的有效辅助手段。NIPT对T21阳性预测值达到了95%以上,是一项精确度接近于产前诊断的筛查新技术。NIPT技术检测性染色体非整倍体异常的阳性预测值仅为53.13%,因此对于性染色体非整倍体和T18, T13异常的确诊仍需通过羊水或脐带血进行染色体核型分析才能确诊。

2012年5月至2016年3月,本项目已经对6505例孕妇成功完成NIPT检测,但有4例样本检测失败,其中3例是由于血浆中游离DNA碎片过高,无法计算Z值。对孕妇随访时发现其中2例由于妊娠早期有一胎停止发育,其胎盘细胞DNA碎片释放入血中,使游离DNA碎片过高,与母亲游离DNA碎片不成比例。无法用生物信息学推算出Z值。另一例是由于母源性DNA碎片不明原因增加,可能是由于肿瘤引起或近期输血引起。

项目组率先将NIPT纳入到胎儿性染色体非整倍体的探索性研究,经福建省医学情报研究所科技查新(2016年179),认为项目组主导开展的常州市NIPT在胎儿性染色体非整倍体的研究,国内未见

相关研究报道。

无创产前检测(NIPT)技术目前已经比较成熟,可应用于胎儿常见非整倍体的产前筛查特别是唐氏综合征筛查,是精确度接近于产前诊断的筛查新技术。加入了 NIPT 技术后的产前筛查与产前诊断服务流程更显得完善,在预防胎儿染色体非整倍体疾病的临床应用中将发挥更大的作用。此外,随着 NIPT 技术的深入研究和不断完善,还有可能建立地中海贫血、苯丙酮尿症等多种单基因遗传病的无创产前检测^[11],使二级预防成为高效降低新生儿出生缺陷率的最佳干预关口,减轻社会经济负担,提高出生人口的健康素质。

目前,较高的检测费用也成为了将该技术广泛应用的瓶颈,因此将无创 DNA 技术向临床推进仍需大量工作,包括政策层面的支持与规范,以尽快推出适应我国现状的技术标准,以及确定合适的检测费用。但我们有理由相信在不久的将来,随着测序技术的进一步提高,检测费用降低,无创 DNA 技术纳入医保范围必将成为产前筛查的主要手段。

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] Zhang Z, Zhang L. Appling cell-free fetal DNA and RNA of maternal plasma in non-invasive prenatal diagnosis[J]. Clin J Lab Med, 2013, 36(1): 14-17.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997,

350(9076): 485-487.

- [4] Greene MF, Mello MM, Morain S. A new era in noninvasive prenatal testing[J]. N Engl J Med, 2013, 369(22): 2165.
- [5] Weisz B, Pandya P, Chitty I, et al. Practical issues drawrt from the implementation of the integrated test for Down syndrome screening into routine clinical practice [J]. BJOG, 2007, 114(4): 493-497.
- [6] American College of Obstetricians Gynecologists Committee on Genetics. Committee opinion no. 640: cell- free DNA screening for fetal aneuploidy [J]. Obstet Gynecol, 2015, 126: 1-7.
- [7] Yao H, Jiang F, Hu H, et al. , Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: initial experience in a Chinese hospital[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2014, 44(1): 17- 24.
- [8] Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. , Cell- free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy[J]. New Engl J Med, 2015, 372(17): 1589- 1597.
- [9] 刘颖,曾志光,黄健. 中国 86 万余份唐氏产前筛查结果荟萃分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(35): 5944-5946.
- [10] Ke WL, Zhao WH, Wang XY. Detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma for Down syndrome, Edward syndrome and Patau syndrome of high risk fetus[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6): 9525-9530.
- [11] Liu S, Chen L, Zhang X, et al. Primer-introduced restriction analysis polymerase chain reaction method for non-Invasive prenatal testing of β -thalassemia[J]. Hemoglobin, 2014, 39(1): 1-6.

(收稿日期:2016-05-30)

编辑:刘邓浩