

无创产前基因检测对血清学筛查临界风险孕妇的检测效能

王奕霞 彭海山 李怡 杨洁霞 侯亚萍 郭芳芳 欧阳浩新 王东梅*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 **目的** 探讨无创产前基因检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)对血清学筛查临界风险孕妇的检测效能。**方法** 通过选取广东省妇幼保健院2015年1月至2019年12月12 342例血清学筛查临界风险单胎孕妇,采用高通量测序技术分析孕妇外周血胎儿游离DNA,结果提示高风险孕妇建议行羊水或脐血染色体核型分析或者染色体微阵列芯片分析,并对所有纳入研究的孕妇追踪随访母胎妊娠结局,未进行产前诊断的孕妇以随访结果为准,随访率100%。**结果** 12 342例血清学临界风险孕妇中,NIPT检测结果提示高风险74例,其中21-三体28例、18-三体3例、13-三体10例、性染色体异常22例、染色体缺失/重复11例,阳性率为0.60%(74/12 342)。74例高风险孕妇通过进一步的结果验证,产前诊断阳性病例为21-三体20例、18-三体1例、13-三体4例、性染色体异常5例、染色体缺失/重复4例。21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征、性染色体异常和染色体缺失/重复阳性预测值(positive predictive value, PPV)分别为71.43%、33.33%、40.00%、22.73%和6.36%,NIPT低风险孕妇全部完成追踪随访,未发现21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征、性染色体异常和染色体缺失/重复漏诊病例。**结论** 无创产前基因检测提高了21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征的临床检测效能,有效避免了血清学筛查临界风险的漏诊,不仅降低出生缺陷,还可以避免过度介入性产前诊断。

【关键词】 无创产前基因检测;血清学筛查临界风险;阳性预测值

【中图分类号】 R394.3 **【文献标识码】** A

The performance of noninvasive prenatal testing (NIPT) for pregnant women with moderate-risk in standard screening

Wang Yixia, Peng Haishan, Li Yi, Yang Jiexia, Hou Yaping, Guo Fangfang, Ouyang Haoxin, Wang Dongmei*

Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children Health Care Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China

* Corresponding author; Wang Dongmei, E-mail: wangdongmei0802@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the performance of noninvasive prenatal testing (NIPT) for pregnant women with moderate-risk results in standard screening. **Methods** In this retrospective study, data were collected from women with moderate-risk results in standard screening who underwent noninvasive prenatal testing in Guangdong Women and Children Hospital between January 2015 and December 2019. Invasive prenatal diagnosis was suggested for those with a positive NIPT result, and pregnancy outcomes were followed up for all cases. **Results** NIPT was performed on 12,342 pregnancies with moderate-risk results in standard screening. Among them, 74 cases were with high risk results,

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.013

* 通信作者:王东梅, E-mail: wangdongmei0802@126.com

including 28 cases of trisomy 21, 3 cases of trisomy 18, 10 cases of trisomy 13, 22 cases of sex chromosome abnormality, and 11 cases of chromosomal deletion/duplication. The total positive rate was 0.60% (74/12,342). Further invasive prenatal diagnosis of 74 cases with positive NIPT results showed that 34 cases were confirmed as positive results, including 20 cases of trisomy 21, 1 cases of trisomy 18, 4 cases of trisomy 13, 5 cases of sex chromosome abnormality, and 4 cases of chromosomal deletion/duplication. The positive predictive value of NIPT in the diagnosis of 21 trisomy, 18 trisomy and 13 trisomy, sex chromosome abnormality and chromosomal deletion/duplication were 71.43%, 33.33%, 40.00%, 22.73% and 36.36%, respectively. The follow-up survey of cases with negative NIPT results showed that no 21 trisomy, 18 trisomy and 13 trisomy, sex chromosome abnormality and chromosomal deletion/duplication results were found. **Conclusion** High performance of NIPT was showed among pregnancies with moderate-risk results in standard screening.

【Key words】 Noninvasive prenatal testing; Moderate-risk results in standard screening; Positive predictive value

我国每年新增约 90 万例出生缺陷儿,染色体异常是导致出生缺陷的最常见因素,最常见的染色体异常主要包括 21-三体、18-三体、13-三体和性染色体异常,每年新增的缺陷儿已经成为影响我国人口素质及群体健康水平的公共卫生问题^[1,2]。在无创产前基因检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)进入临床应用之前,预防出生缺陷主要靠血清学筛查和介入性产前诊断等,但血清学的漏诊率(20%~40%)和假阳性(5%)很高^[3],而介入性产前诊断虽是金标准但又具有很大的风险(如宫内感染、流产等),且有部分患者存在一定的禁忌证(发热、先兆流产、出血倾向以及感染未愈)而不适用。无创产前基因检测是抽取孕妇外周血检测游离胎儿 DNA 的技术,其特点具有快速,无创伤性,安全性高,不会对胎儿和孕妇造成任何风险,且经国内外研究证实具有很高的灵敏度和特异度,可高达 99%^[4,5],因此 NIPT 作为产前筛查的手段受到了广大孕妇的青睐,特别是对于血清学筛查临界风险的孕妇来说是一个不错的选择,可以有效地降低介入性产前诊断带来的风险,并提高产前筛查的效能。本研究通过选取 12 342 例血清学筛查临界风险的病例,采用高通量基因测序技术分析孕妇外周血胎儿游离 DNA,对 NIPT 提示高风险的孕妇进一步行产前诊断,并对所有纳入病例进行妊娠结局随访,探讨无创产前基因筛查对于血清学筛查临界风险孕妇的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 基本资料 选取了 12 342 例于 2015 年 1 月至 2019 年 12 月就诊于广东省妇幼保健院,血清学筛查临界风险的单胎孕妇(孕 12~38 周,年龄 15~47 岁),自愿接受 NIPT 检测。所有孕妇符合孕期不合并恶性肿瘤、一年内没有异体输血、移植手术和细胞治疗、夫妇均没明确的染色体异常。检测前把适应证、局限性及可能存在的风险告知孕妇,孕妇充分知情同意后签署知情同意书。NIPT 提示高风险的孕妇进一步行产前诊断,并对所有纳入研究范围的孕妇进行随访,本研究符合伦理标准并通过医院医学伦理委员会的批准。

1.2 检测方法

1.2.1 早中期血清学筛查 采用 PerkinElmer 公司 DELFLA-1235 型全自动时间荧光分辨仪及检测试剂盒对孕妇外周血进行检测:①孕早期(9~13⁺周)采用血清学标志物(PAPPA+游离 β -HCG+NT)评估风险;②孕中期(15~20⁺周)采用血清学标志物(AFP+游离 β -Hcg+uE3)评估风险。根据血清学筛查结果,并结合孕妇体重、年龄、孕周等因素通过唐氏综合征风险评估软件“LifeCycle4.0”评估风险。21-三体的临界风险值介于 1/1000~1/250,18-三体临界风险值介于 1/1000~1/350。

1.2.2 无创产前基因检测流程 采集孕妇外周血于 EDTA 抗凝管或游离核酸采样管,前者 4℃ 保存,

8h内分离血浆,后者放置室温,3天内分离血浆。

①分离后的血浆用 tianLong 核酸提取仪和磁珠法游离核酸 DNA 提取试剂盒提取 DNA; ② Biomek4000 全自动化工作站和博奥晶芯测序试剂盒构建文库、文库定量等操作,具体操作严格按照仪器和试剂盒说明书进行; ③将待测文库混合后在 Proton 高通量测序平台检测; ④测序后,通过序列的比对、拼接等生物信息学处理,对不同染色体水平进行统计,识别胎儿染色体是否有异常,并通过统计学公式得出胎儿患染色体非整倍体或拷贝数变异的风险。

2.3 染色体核型分析和随访 NIPT 提示高风险的孕妇,充分告知孕妇各种方法的局限性,可能存在的风险,经孕妇知情同意后,抽取羊水或脐血进行染色体核型分析或者染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis,CMA)检测。对所有纳入标准的孕妇进行电话随访或者病例查询,高风险孕妇随访至有妊娠结局出现,低风险孕妇则

随访至新生儿出生后,随访率 100%。

2.4 统计学处理 所有计数资料用频数和频率表示。无创结果和核型或 CMA 结果比较则通过阳性预测值(positive predictive value,PPV)、灵敏度、特异度、假阳性率进行评估。 $PPV = \text{真阳性病例数} / (\text{真阳性病例数} + \text{假阳性病例数})$; $\text{灵敏度} = \text{真阳性病例数} / (\text{真阳性病例数} + \text{假阴性病例数})$; $\text{特异度} = \text{真阴性病例数} / (\text{真阴性病例数} + \text{假阳性病例数})$; $\text{假阳性率} = \text{假阳性病例数} / (\text{假阳性病例数} + \text{真阴性病例数})$ 。

3 结果

3.1 不同年龄组的分布情况 本研究血清学临界风险病例共 12 342 例,经孕妇知情同意,自行选择进行 NIPT 检测,检测成功率 100%。NIPT 提示高风险共 74 例,阳性率为 0.60%(74/12 342)。其中 <35 岁组检出 56 例,检出率 0.56%(56/10 043); ≥35 岁组检出 18 例,检出率 0.78%(18/2299),具体分布情况见表 1。

表 1 不同年龄组的分布情况

年龄组	血清学临界风险(例)	NIPT 高风险 [例(%)]	产前诊断阳性(例)					真阳性总计(例)
			T21	T18	T13	SCA*	缺失/重复	
<35 岁	10 043	56(0.56)	14	0	4	5	3	26
≥35 岁	2299	18(0.78)	6	1	0	0	1	8
合计	12 342	74(0.60)	20	1	4	5	4	34

注:* 性染色体非整倍体

3.2 NIPT 高风险孕妇核型结果分析 74 例 NIPT 高风险孕妇,经知情同意,签署知情同意书,均进行介入性产前诊断,其中 21-三体高风险 28 例,确诊 20 例,阳性预测值为 71.43%; 18-三体高风险 3 例,确诊 1 例,阳性预测值为 33.33%; 13-三体高风险 10 例,确诊 4 例,阳性预测值 40.00%。性染

色体异常 22 例,确诊 5 例,阳性预测 22.73%。缺失/重复共 11 例,确诊 4 例,阳性预测值 36.36%。高风险结果以 21-三体高风险占较大,占 37.84%(28/74),NIPT 检测结果低风险孕妇通过电话或者病例查询随访至新生儿出生,均未发现阳性结果。NIPT 对血清学临界风险孕妇的检测效能见表 2。

表 2 NIPT 对血清学临界风险的检测效能

产前诊断阳性	NIPT 高风险(例)	核型异常(例)	核型正常(例)	PPV (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	假阳性率 (%)
21-三体	28	20	8	71.43	100	99.94	0.06
18-三体	3	1	2	33.33	100	99.98	0.02
13-三体	10	4	6	40.00	100	99.95	0.05
SCA*	22	5	17	22.73	100	99.86	0.14
缺失/重复	11	4	7	36.36	100	99.94	0.06
合计	74	34	40	45.95	100	99.68	0.32

注:* 性染色体非整倍体

4 讨论

随着经济发展医疗教育水平的提高,人们对于预防出生缺陷,优生优育的意识也越来越强。常见的21-三体、18-三体、13-三体染色体非整倍体是导致新生儿出生缺陷的重要原因之一^[1]。而目前临床上缺乏有效治疗手段,需要及时通过产前筛查和产前诊断的检测,避免缺陷儿的出生。

随着技术的发展革新,基于胎儿游离DNA的高通量测序技术因其是一种无创、快捷、安全有效的筛查方法而倍受孕妇关注。经过近十年的数据积累,国际上对NIPT检测21-三体、18-三体及13-三体综合征的准确性和特异性在临床应用中的价值已获得高度认可^[6,7]。传统血清学筛查的准确率只有60%~70%^[8],极易错筛漏筛。介入性产前诊断虽准确度高,但国内外文献显示,行有创产前诊断的孕妇约2%被确诊胎儿染色体异常,可因羊水穿刺或绒毛取样造成的胎儿相关并发症却高达0.5%~1.0%^[9],因此会引起部分孕妇的抵触心理,对于有流产、传染病和感染风险等孕妇也不适用有创产前诊断。此外,随着二孩政策的开放,孕妇数量增加,侵入性产前诊断技术因检测时间长,技术要求高,检测通量低,已远远不能满足临床的需求,因此NIPT的问世,弥补了目前临床筛查的部分缺陷,为孕妇提供了多一个选择。

本研究中,12 342例血清学临界风险病例中,年龄<35岁共10 043例,占了81.37%,26例确诊为胎儿染色体异常。在NIPT问世之前,血清学筛查临界风险孕妇需做有创性产前诊断明确是否染色体异常,而本组人群中只有26例为染色体异常者,因此无创基因检测的出现大大降低了穿刺率。另外一组年龄≥35岁以上共2299例,占了18.63%,8例确诊为胎儿染色体异常,若按我国母婴保健法规定,凡是年龄≥35岁的产妇都建议进行产前诊断,2299例孕妇都需要选择羊水或脐血穿刺,出现过度诊断的现象。同时因介入性产前诊断的创伤性,有可能会发生早产,宫内感染,流产等风险,致使部分孕妇产生恐惧心理,不愿检测,以致没能及时诊断,导致异常胎儿的出生,给家庭和社会带来巨大负担。

有学者研究显示血清学筛查临界风险是选择无创产前筛查最常见的指征^[4, 10],而该群体往往是染色体异常最容易漏诊的人群^[11]。故无创产前基因检测技术作为二线的筛查方法,能更准确地检测出染色体非整倍体,为血清学临界风险孕妇提供了一个很好的选择,可以减少有创产前诊断数量,缓解了她们因可能要面临介入性产前诊断而产生的心理压力。

随着NIPT在临床中的发展应用,NIPT的检测谱也在增加,但主要用于检测21-三体、18-三体、13-三体综合征。本研究中NIPT检测结果提示高风险74例,常见染色体非整倍体(21-三体、18-三体、13-三体综合征)占了55.41%(41/74),复合PPV为60.98%。NIPT诊断21-三体、18-三体、13-三体综合征的灵敏度均为100%,阳性预测值分别为71.43%、33.33%、40.00%。彭海山等^[10]研究显示,21-、18-、13-三体综合征的灵敏度为100%、91.67%、100.00%,阳性预测则为88.06%、78.57%、33.33%;罗丽双等^[11]报道了5756例孕妇NIPT的21-三体、13-三体、18-三体综合征及性染色体异常的阳性预测分别为86%、40%、25%。本研究与国内一些研究者对NIPT在常见染色体非整倍体的诊断效能评价比较,结果相近。18-三体、13-三体阳性预测较低,可能与本研究样本例数少有关,但其灵敏度均可达100%,特异度分别为99.94%、99.98%、99.95%。由此可知,NIPT对21-三体、18-三体、13-三体综合征在不同人群中都能很好的筛检出,可成为血清学临界风险人群孕检的一线筛查手段。另外本研究还分析了NIPT对性染色体异常筛查的灵敏度为100%,特异度为99.86%,PPV为22.73%;对染色体缺失/重复筛查的灵敏度为100%,特异度为99.94%,PPV为36.36%。NIPT可一定程度上检测性染色体异常和染色体缺失/重复,在非目标筛查疾病中也有一定的应用价值。

虽然NIPT的准确性高,但也存在假阳性和假阴性的局限。本研究中NIPT高风险者中有40例染色体核型分析未见异常,其合计假阳性率为0.32%,因此NIPT仅可作为高精确度的筛查方法,在临床工作中应做好NIPT检测前和检测后的咨询工作。当NIPT提示相关染色体异常时,后续需要

结合 B 超排查胎儿畸形风险,进一步行介入性产前诊断,通过染色体核型和 CMA 确诊。

综上所述,NIPT 的临床应用对于血清学筛查临界风险孕妇具有很好的检测效能,降低血清学临界风险孕妇的穿刺率,降低出生缺陷的发生。NIPT 是血清学产前检测技术的必要补充手段,在临床工作还要做好 NIPT 检测前后的咨询工作。今后,对于如何提高非目标染色体预测的准确度,是我们的研究重点。

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] 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.
- [3] 刘俊娇,郑天生,崔凤姬,等. 1696 例孕妇无创 DNA 产前筛查结果分析[J]. 中国计划生育学杂志,2017, 25(7): 484-487.
- [4] 方美仙,王燕,何德钦,等. 2912 例无创性产前基因检测的指征及结果分析[J]. 中国妇幼保健,2017, 32(22): 5665-5668.
- [5] SHAW SW, HSIAO CH, CHEN CY, et al. Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies: a multicenter prospective cohort trial in Taiwan [J]. Fetal Diagn Ther, 2014, 35(1):13-17.
- [6] SYNGELAKI A, CHELEMEN T, DAGKLIS T, et al. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks [J]. Prenat Diagn, 2011, 31(1): 90-102.
- [7] MILUNSKY A, MILUNSKY JM. Genetic disorders and the fetus:Diagnosis, prevention and treatment[M]. Chichester: Wiley,2010:771-818.
- [8] 张红利. 无创 DNA 检测在产前筛查唐氏综合征中的准确性[J]. 中国实用神经疾病杂志,2016, 19(24): 108-110.
- [9] TABOR A. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques [J]. Fetal Diagn Ther, 2010, 27(1):1-7.
- [10] 彭海山,黄华洁,杨洁霞,等. 广东地区 23852 例孕妇无创产前筛查指征及结果分析[J]. 新医学,2018, 49(12):878-883.
- [11] 罗丽双,孟繁杰,张宁,等. 5756 例孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前筛查结果分析[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018, 37(2): 103-106.

(收稿日期:2020-09-02)

编辑:宋文颖