

颈项透明层联合母血游离胎儿 DNA 在高龄单胎非整倍体中的应用

翟敬芳* 吴杰斌 张蓓 沙静 张晶波

(徐州医科大学徐州临床学院、徐州市中心医院 产前诊断中心,江苏 徐州 221004)

【摘要】 目的 探讨胎儿颈项透明层(nuchal translucency,NT)联合母血中游离胎儿 DNA(cell free fetal DNA,cffDNA)进行无创产前检查(noninvasive prenatal testing,NIPT)在高龄单胎孕妇胎儿非整倍体管理中的应用价值。**方法** 2015年7月至2018年6月徐州市中心医院产前诊断中心接受NT检查并接受随访有完整资料的高龄单胎孕妇1525例为研究对象,根据NT是否 $\geq$ 第95%百分位或 ≥ 3.0 mm分为NT正常组1489例和NT异常组36例,异常组均接受有创产前诊断;NT正常组中有1161例接受NIPT为无创组,328例接受有创产前诊断为有创组,所有孕妇均接受后续中孕期超声检查,对其临床资料及妊娠结局进行统计分析。**结果** ①NT正常组中确诊胎儿非整倍体3例(无创组1例,有创组2例),而NT异常组确诊7例,10例中期结构超声有异常改变的有9例;无创组筛查3例胎儿非整倍体(21-三体高风险1例,45,XO 1例,47,XXX 1例),NIPT对常染色体阳性预测率为100%,性染色体阳性预测率为0%;NT异常联合NIPT对胎儿非整倍体阳性预测率为20.51%(8/39),NIPT阴性对胎儿非整倍体阴性预测率为99.74%(1158/1161)。②NT正常组胎儿非整倍体确诊率0.20%(3/1489)明显低于NT异常组19.44%(7/36),中期超声结构改变的发生率NT正常组2.69%(40/1489)明显低于NT异常组38.89%(14/36),差异均具有统计学意义($P<0.05$)。③超声结构改变的胎儿NT正常组非整倍体确诊率5.00%(2/40)与NT异常组50.00%(7/14)相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** NT联合母血 cffDNA NIPT 在高龄单胎孕妇胎儿非整倍体管理中具有很高的预测价值,应重视后续中期胎儿结构异常对胎儿非整倍体的临床筛查。

【关键词】 胎儿颈项透明层;无创产前检查;非整倍体;游离胎儿DNA;高龄妊娠妇女

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

The application of nuchal translucency combined with maternal blood cell free fetal DNA noninvasive prenatal test in the chromosome aneuploidy screening in the elderly single-fetus pregnant women

Zhai Jingfang^{*1}, Wu Jiebin¹, Zhang Bei², Shajing², Zhang Jingbo²

(Xuzhou Clinical School of Xuzhou Medical University, Xuzhou Center Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

Corresponding author: Zhai Jingfang, E-mail: zjf730801@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the application value of nuchal translucency (NT) combined with maternal blood cell free fetal DNA (cffDNA) noninvasive prenatal test (NIPT) in the chromosome aneuploidy screening management in the elderly single-fetus pregnant women. **Methods** 1525 cases of the elderly single-fetus pregnant women with complete data detected by NT examination from Prenatal Diagnosis Center of Xuzhou Center Hospital were enrolled and the pregnancy endings were followed-up in

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.02.008

基金项目:徐州市科学技术局重点研发计划(社会发展)课题(KC18182)

* 通信作者:翟敬芳, E-mail: zjf730801@126.com

this study from July 2015 to June 2018. All pregnant women were divided into NT abnormal group ($n=36$) and NT normal group ($n=1489$) according to whether $NT>95\%$ or $NT\ thickness\geq 3.0mm$. All the cases in the NT abnormal group accepted prenatal invasive diagnosis. While among the NT normal group, 1161 cases were detected by NIPT as the noninvasive group, while the other 328 cases received invasive prenatal diagnosis as the invasive group. All pregnant women received follow-up ultrasound examination during the second trimester and their clinical data and pregnancy outcomes were statistically analyzed.

Results ① 3 cases aneuploidy fetuses were diagnosed in the NT normal group (1 case in the noninvasive group and 2 case in the invasive group), while seven cases aneuploidy were diagnosed in NT abnormal group. Among the 10 cases, 9 cases had abnormal ultrasound structure changes during the second trimester. 3 cases of possible aneuploidy fetuses were founded tested by NIPT in the noninvasive group (1 case of trisomy 0. 21 syndrome and 1 case of Turner's syndrome and 1 case of 47,XXX), autosomal positive predictive rate was 100% while sex chromosome positive prediction rate was 0% by NIPT; The positive prediction rate of abnormal NT combined with cffDNA NIPT for aneuploidy in fetuses was 20. 51% (8/39) while the negative prediction rate of NIPT negative for fetuses aneuploidy was 99. 74% (1158/1161). ② The diagnosis rate of fetal aneuploidy 0. 20% (3/1489) in NT normal group was significantly lower than that 19. 44% (7/36) in NT abnormal group, the incidence of ultrasonic structure changes 2. 69% (40/1489) in NT normal group during the second trimester was significantly lower than that 38. 89% (14/36) in NT abnormal group. All the differences above were statistically significant ($P<0.05$). ③ The diagnostic rate of fetal aneuploidy in the NT normal group was 5. 00% (2/40), compared with 50. 00% (7/14) in the NT abnormal group and the difference was statistically significant ($P<0.05$).

Conclusion NT combined with maternal blood cffDNA NIPT may provide a high prediction value in the management of fetal aneuploidy in elderly singleton pregnant women. And we should pay more attention to the clinical screening of abnormal ultrasound structure changes for fetal aneuploidy in the follow-up second trimester ultrasound.

【Key words】 Nuchal translucency; Noninvasive prenatal testing; Aneuploidy; Cell free fetal DNA; Elderly pregnant women

胎儿颈项透明层(nuchal translucency,NT)作为超声一项软指标,可用来筛查胎儿染色体异常^[1-3],新一代高通量测序技术(next generation sequencing,NGS)对母血中游离胎儿DNA(cell free fetal DNA,cffDNA)进行无创产前检测(noninvasive prenatal testing,NIPT)得出胎儿13、18及21号染色体三体的风险率,其在高危孕妇胎儿非整倍体中的筛查价值日益得到临床工作者的认可^[4,5],但国家卫生健康委员会发布的NIPT技术规范([2016]45号文件)中规定高龄孕妇(预产年龄 ≥ 35 岁)胎儿染色体检查仍在产前诊断之列,但有创性产前诊断需要投入更多的人力、物力,如何应对近年二孩政策下的高龄单胎孕妇胎儿染色体非整倍体筛查和诊断,成为各地产前诊断中心致力此类人群的研究方向。本院自2015年7月至2018年6月采

用NT联合NIPT在高龄单胎孕妇胎儿染色体非整倍体筛查中的应用进行总结如下。

1 资料与方法

1.1 基本资料 追踪2015年7月至2018年6月徐州市中心医院产前诊断中心接受NT检查并具有完整资料的1525例高龄单胎孕妇作为研究对象,年龄35~45岁,因一部分孕妇要求NIPT,在入组前排除了自身恶性肿瘤、染色体异常、干细胞移植手术史,根据 $NT>$ 第95%百分位或 $\geq 3.0mm$,分为NT异常组36例和NT正常组1489例,NT异常组均接受产前诊断;两组年龄及孕周均无统计学差异($P>0.05$)。NT正常组有1161例接受NIPT为无创组,其余328例接受有创产前诊断为有创组(302例行羊水穿刺检查,26例行脐血检查),NT异常组中

有 2 例绒毛活检染色体检查结果正常(后续于孕 18 周进行了羊水穿刺检查胎儿核型正常),32 例行羊水穿刺检查,2 例行脐血穿刺检查,所有孕妇均接受超声检查,对其临床资料及妊娠结局进行统计分析。所有的孕妇均充分知情告知并签署知情同意书。本研究已经过医院医学伦理委员会批准(批号: XZXY-LJ-20161121-012)。

1.2 超声检查 应用 GE Voluson E8 彩色多普勒超声诊断仪,采用凸阵探头,探头频率 3.0~5.0MHz。按照国际妇产科超声学会颁布的早孕期胎儿超声指南^[6],NT 在妊娠 11~13⁺₆周且胎儿顶臀径 45~84mm 时进行,并按照标准切面要求,由接受规范培训的超声医师对胎儿颈部皮肤与软组织间半透明组织间的最大厚度值重复测量 3 次,取最大值为 NT 值,同时进行早孕期系统结构彩超的检查。妊娠 11~13⁺₆周 NT>第 95%百分位或≥3.0mm 为异常。对所有胎儿行染色体检测时同步进行 18~24 周胎儿系统彩超检查。

1.3 母血 cfDNA NIPT 充分知情告知,对 NT 正常自愿行 NIPT 检查的孕妇于孕 13~22⁺₆周内抽取 10ml 外周血 EDTA 抗凝,进行分离血浆、抽提 DNA、制备测序文库,采用 Proton 进行测序,将每个样本测序的序列与人类参考基因组进行比对,最终得出胎儿患染色体非整倍性风险。

1.4 染色体核型检查及分子遗传学分析 对 NIPT 高风险及 NT 异常的孕妇进行遗传咨询,知情同意后行羊水穿刺(16~23 周)或脐血穿刺(23~28 周)进行胎儿细胞培养、收获并经 G 显带染色体核型分析。在实验过程中为了留取胎儿细胞以便后续分子检测,6~7 天后含细胞的羊水悬液继续培养后冻存,多培养一瓶脐血细胞予以冻存,对于 NT 异常要求分子遗传学检查的孕妇知情同意后行染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis,CMA)。

1.5 随访 所有孕妇进一步跟踪胎儿系统超声结果,随访至胎儿出生,并由儿科医生对所有新生儿进行常规的体格检查。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料用数值(率)表示,组间比较采用 χ^2

检验或 Fisher 确切概率,计量资料经正态性分布验证后两组间采用两独立样本的 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NT 正常组与异常组胎儿染色体非整倍体的比较 NT 正常组中确诊胎儿非整倍体 3 例(无创组 1 例、有创组 2 例),而 NT 异常组确诊 7 例。无创组 NIPT 筛查出非整倍体 3 例(21-三体高风险 1 例,45,XO 1 例,47,XXX 1 例),确诊 1 例 21-三体胎儿,其余为假阳性,NIPT 对常染色体阳性预测率为 100%,性染色体阳性预测率为 0%。NT 异常组中 7 例胎儿染色体非整体是:3 例 21-三体、2 例 18-三体及 47,XYY 和 45,XO 各 1 例,NT 正常组胎儿非整倍体确诊率 0.20%(3/1489)明显低于 NT 异常组 19.44%(7/36),差异均具有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。NT 异常组中 12 例羊水核型检查同时进行羊水细胞 CMA 结果示:与羊水培养核型结果一致,其中 2 例 47,XN,+21,1 例 47,XYY,余 9 例正常。

2.2 NT 正常组与异常组胎儿超声结构上的比较 NT 正常组超提示胎儿结构异常 40 例,异常组 14 例有超声结构改变,两组胎儿非整倍体及超声结构改变比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。NT 正常无创组中 1 例 21-三体超声提示胎儿有鼻骨缺失改变,2 例核型正常胎儿无超声结构改变;NT 正常有创组中 1 例 18-三体胎儿系法洛四联症,另 1 例 21-三体无超声结构上改变。

表 1 NT 正常组与异常组胎儿非整倍体与超声异常

例数比较(例)			
组别	例数	胎儿非整倍体例数	超声异常
NT 正常组	1489	3	40
NT 异常组	36	7	14
$\chi^2_a;P_a$		$\chi^2=166.932$ $P_a<0.001$	/
$\chi^2_b;P_b$		/	$\chi^2=94.452$ $P_b<0.001$

注:a 代表 NT 正常组与异常组非整倍体的比较;b 代表两组超声异常的比较

2.2 10 例确诊非整倍体胎儿超声结构表现 仅 1 例 21-三体胎儿无超声结构改变外,9 例均在中孕期 18~24 周胎儿结构彩超检查时发现胎儿异常,临床

资料见表 2,同时发现 7 例 NT 异常同时染色体异常胎儿有 3 例合并先天性心脏病,构成比为 42.9%(3/7)。

表 2 10 例胎儿非整倍体临床资料

临床病例	预产年龄(岁)	染色体核型结果	CMA 检查	胎儿超声异常
C1	41	47,XN,+21	否	无
C2	43	47,XN,+21	否	鼻骨缺失
C3	35	47,XN,+21	否	法洛四联症
C4	42	47,XN,+21	否	NT 增厚 7mm,颈部淋巴水囊瘤
C5	35	46,XN,rob(13,21),+21	是	NT4.5mm 合并胎儿法洛四联症
C6	35	47,XN,+21	是	NT4mm,鼻骨缺失
C7	37	47,XN,+18	否	NT4.5mm 合并心室缺陷 4mm
C8	39	47,XN,+18	否	NT4mm 合并复杂左心功能不全
C9	36	45,X	否	NT3.5mm 合并胸腹水
C10	37	47,XYY	是	NT3mm,左肾盂分离 8mm

2.3 超声结构改变的胎儿染色体非整倍体确诊率在 NT 正常组与异常组间的比较 NT 正常组 40 例超声异常,胎儿非整倍体例数前者 2 例,而 NT 异常组超声异常 14 例,胎儿非整倍体例数 7 例,超声结构改变的胎儿 NT 正常组与异常组相比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),详见表 3。

表 3 正常组与异常组胎儿超声结构异常染色体非整倍体比较(例)

组别	例数	胎儿非整倍体例数	χ^2	P
NT 正常组	40	2	15.12	<0.001
NT 异常组	14	7		

2.4 随访结局 共有 23 例引产,其中 9 例胎儿染色体非整倍体引产(8 例胎儿超声异常),14 例胎儿超声异常但 NIPT 提示胎儿非整倍体低风险或胎儿核型正常引产,包括复杂先天性心脏病 6 例、重度脑积水 3 例、严重水肿 3 例、膈疝 2 例,1493 例足月分娩,8 例早产,另 1 例在孕 22 周胎膜早破流产。新生儿随访未发现染色体非整倍体病例。

3 讨论

胎儿染色体疾病主要表现为数目异常,如 21、18、13 及性染色体数目异常,Syngelaki 等^[7]基于对 14 684 例绒毛活检染色体核型分析显示 2030 例(13.8%)染色体核型异常大多数为三体型,其中 79.2%为 21-三体、18-三体或 13-三体,8.4%为性染色体异常。高龄孕妇胎儿染色体异常以染色体数目异常为主,其中 21-三体发生率最高^[8],我们对高龄

单胎孕妇人群染色体和 CMA 分析临床研究结果与此一致,相关研究发现生殖细胞非整倍体发生与母亲年龄密切相关^[9],随着妊娠年龄的增加,卵母细胞减数分裂过程中纺锤体形成障碍,染色体不分离的机率增高导致胚胎染色体非整倍体呈增高的趋势^[10]。因此,要注重对高龄孕妇胎儿非整倍体的排查。

胎儿染色体非整倍体异常与 NT 增厚相关^[11],产科医生对于 NT 异常的胎儿要进行胎儿染色体非整倍体的筛查。本研究结果显示,NT 异常组确诊 7 例胎儿染色体非整体,明显高于 NT 正常组($P<0.05$),同样证实 NT 在胎儿染色体非整倍体异常筛查中的有效性。NT 异常往往合并胎儿结构异常^[12],NT 异常对于及早发现胎儿心脏畸形及与评估染色体异常均有重要提示作用^[13],本次研究发现 7 例 NT 异常且染色体异常合并胎儿先天性心脏病的比率为 42.9%(3/7),故对 NT 异常的胎儿,孕期应行超声心动图对胎儿心脏结构的排查。

孕妇血浆 cfDNA NIPT 在高危孕妇人群中对胎儿非整倍体筛查的有效性已得到临床证实^[14],并且能够大大降低短期内产前诊断的孕妇人数^[15]。对超声发现异常的病例,传统的染色体核型分析仍是有效的手段,而不是通过 CMA 检测^[16,17],我们 CMA 结果对此也有同样的验证,但上述观点与 2014 年染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识^[18]胎儿结构异常是进行 CMA 检查的适应证观点不一致,有待于临床积累大量本的证据进一步积累胎儿结构异常遗传学检测手段如何选择。

NIPT 技术是否可替代染色体核型分析用于高龄孕妇的胎儿非整体的筛查? Norton 等^[19]对 3228 例血清学筛查高风险的孕妇在进行绒毛或羊水穿刺行染色体核型分析的同时采用 NIPT 技术检测,结果表明 NIPT 技术在 21-三体及 18-三体的诊断价值与介入性产前诊断价值相当。段红蕾等^[20]对不同指征介入性产前诊断异常染色体检出率研究发现,单纯以年龄 ≥ 35 岁无胎儿结构异常的孕妇为穿刺指征的 318 例胎儿核型分析,未检出有临床意义的染色体异常。我们此次对 1161 例接受 NIPT 统计,筛查发现非整倍体 3 例(21-三体高风险 1 例,45,XO 1 例、47,XXX 1 例),核型确诊 21-三体 1 例且胎儿彩超有鼻骨缺失改变,其余 2 例核型正常且胎儿超声无结构改变,因此对于 NIPT 检测后孕妇均

需接受后续的胎儿系统结构彩超检查,一旦超声发现胎儿结构或胎儿超声软指标异常,结合该超声软指标的似然比及孕妇病史进行综合评估,不管是高风险还是低风险,均要接受规范的遗传咨询及进一步产前诊断方案。Petersen 等^[21]对35岁及以上的高龄孕妇,NT $\geq$ 3.5 mm或超声发现胎儿结构异常研究发现,NIPT技术会漏检“非典型”的核型异常,因此不主张胎儿结构异常的高龄孕妇进行NIPT筛查。反之,我们本次研究发现,对于高龄孕妇即使NIPT低风险,中孕期胎儿结构彩超提示异常应接受有创的产前诊断进行胎儿遗传学检查。

综上所述,NT联合母血cffDNA NIPT在高龄单胎孕妇胎儿非整倍体管理中具有很高的筛查价值,能够在短期内大大减少有创产前诊断的例数,胎儿中期系统结构彩超作为两者筛查后仍是对胎儿非整倍体筛查的一种有效手段,对胎儿结构异常的孕妇均要接受规范的遗传咨询及进一步产前诊断方案。

参 考 文 献

- [1] SCHOLL J, CHASEN S. The use of ultrasound as a potential adjunct to cell-free fetal DNA screening for aneuploidy at Weill Cornell Medical College, New York, USA[J]. Surg J (N Y), 2018, 4(1):e1-e6.
- [2] 李载红,洪燕,覃伶俐,等. 超声检查颈项透明层增厚在胎儿染色体异常诊断中的应用价值[J]. 实用医学杂志,2016,32(3):402-405.
- [3] 王挺,郭莉,陈汉彪,等. 早期产前筛查中胎儿颈项透明层厚度与绒毛染色体异常的相关性研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(2):264-265.
- [4] MCCULLOUGH RM, ALMASRI EA, GUAN X J, et al. Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing-clinical experience: 100,000 clinical samples[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e109173.
- [5] 周燕. 探讨无创产前基因检测胎儿染色体非整倍体技术的应用[J]. 疾病监测与控制杂志,2015,8(4):247-250.
- [6] SALOMON LJ, ALFIREVIC Z, BILARDO CM, et al. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 41(1):102-113.
- [7] SYNGELAKI A, PERGAMENT E, HOMFRAY T, et al. Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities[J]. Fetal Diagn Ther, 2014, 35(3): 174-184.
- [8] 陈慧,冯谦谨,苏年华. 1172例高龄孕妇妊娠中期羊水染色体核型分析[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(9):1246-1247.
- [9] DEATSMAN S, VASILOPOULOS T, RHOTON-VLASAK A. Age and fertility: a study on patient awareness[J]. JBRA Assist Reprod, 2016,20(3): 99-106.
- [10] 陈雯,胡娟,刘群,等. 女性年龄对卵母细胞纺锤体和染色体构型的影响[J]. 中华医学遗传学杂志,2015,32(1):120-122.
- [11] TORELLA M, TORMETTINO B, ZURZOLO V, et al. Screening for trisomy 21 by maternal age fetal nuchal translucency thickness and maternal serum sample [J]. Minerva Ginecol, 2013, 65(6):653-659.
- [12] GOLDSTEIN I, WEIZMAN B, NIZAR K, et al. The nuchal translucency examination leading to early diagnosis of structural fetal anomalies[J]. Early Hum Dev, 2014, 90(2): 87-91.
- [13] 曾秀梅,梁元豪,杜志成,等. 胎儿先天性心脏病的早孕期超声筛查及产前诊断结果分析[J]. 中华围产医学杂志,2018,21(11):737-744.
- [14] ZHANG H, GAO Y, JIANG F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(5):530-538.
- [15] LARION S, WARSOF SL, ROMARY L, et al. Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center [J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 211(6):651. e1-7.
- [16] ONEDA B, BALDINGER R, REISSMANN R, et al. High-resolution chromosomal microarrays in prenatal diagnosis significantly increase diagnostic power [J]. Prenat Diagn, 2014, 34(6):525-533.
- [17] WAPNER RJ, MARTIN CL, LEVY B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(23):2175-2184.
- [18] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志,2014,49(8):570-572.
- [19] NORTON ME, BRAR H, WEISS J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18[J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(2):131-137.
- [20] 段红蕾,胡娅莉,李洁,等. 从胎儿染色体核型异常分布推测无创性产前检测的临床适应证[J]. 中华围产医学杂志,2014,17(1):42-44.
- [21] Petersen OB, Vogel I, Ekelund C, et al. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2014,43(3):265-271.

(收稿日期:2019-07-15)

编辑:宋文颖