

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.05.005

孕妇外周血无创基因检测在产前诊断中的应用*

纪利 马莉 许海燕 曹亚莉 王娜 韩英杰[△]

(济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011)

摘要 **目的** 通过评估孕妇外周血无创基因检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)的检测结果阳性预测值,评价 NIPT 在产前诊断应用中的利弊。**方法** 选自 2016 年 1 月-2019 年 12 月在济宁医学院附属济宁市第一人民医院行 NIPT 孕妇资料进行回顾性分析,对 NIPT 高风险结果经羊水穿刺进一步验证,并对所有行 NIPT 孕妇进行随访。**结果** 孕妇外周血 NIPT 结果提示 21 三体阳性预测值为 73.7%(28/38),18 三体阳性预测值为 58.3%(7/12),13 三体阳性预测值为 20.0%(1/5),性染色体阳性预测值为 30.4%(17/56)。**结论** NIPT 对 21 三体阳性预测值最高,其次 18 三体,13 三体最低。对于 NIPT 筛查高风险孕妇和高龄孕妇仍建议侵入性产前诊断进一步确诊。

关键词 无创产前基因检测;侵入性产前诊断技术;羊水穿刺;阳性预测值;假阳性

中图分类号:R714.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2021)10-323-04

Application of noninvasive prenatal testing in maternal peripheral blood in prenatal diagnosis

Ji Li, MA Li, XU Haiyan, CAO Yali, WANG Na, HAN Yingjie[△]

(Jining NO. 1 Peoples' Hospital & The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical indications and positive predictive value of noninvasive prenatal testing (NIPT) in maternal peripheral blood of prenatal diagnosis center of Jining first people's Hospital from 2016 to 2019, and evaluate the advantages and disadvantages of NIPT in prenatal diagnosis. **Methods** The data of pregnant women who underwent NIPT in Jining first people's Hospital from January 2016 to December 2019 were retrospectively analyzed. The positive results of NIPT were further verified by amniocentesis. All NIPT pregnant women were followed up. **Results** The results of NIPT showed that the positive predictive value of trisomy 21 was 73.7% (28/38), that of trisomy 18 was 58.3% (7/12), that of trisomy 13 was 20.0% (1/5), and that of sex chromosome was 30.4% (17/56). **Conclusion** There are false positive and false negative in NIPT. Invasive prenatal diagnosis is still recommended for high-risk pregnant women in NIPT and elderly pregnant women.

Keywords: Noninvasive prenatal testing (NIPT); Invasive prenatal diagnosis techniques; Amniocentesis; positive predictive value; false positive

无创产前基因检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)是通过采集孕妇外周血(5ml),提取游离 DNA,采用新一代高通量测序技术,结合生物信息分析,得出胎儿患染色体非整倍性疾病(21 三体又称唐氏综合征,18 三体,13 三体)风险率的技术。此技术最早是 1997 年香港中文大学卢煜明教

授在怀有男性胎儿的孕妇外周血中扩增到了 Y 染色体的片段,正常女性体内不含有 Y 染色体,从而证明了孕妇外周血中存在胎儿游离 DNA,开启了探索 NIPT 新技术的思路^[1]。NIPT 技术以安全、简单、实用等特点在临床得到广泛应用。NIPT 临床应用指征和阳性预测值评价尚不完善。本文通过本中心的研究数据,对 NIPT 阳性预测值和假阳性等进行比较分析,从而探讨 NIPT 在胎儿染色体

[△][通信作者]韩英杰, E-mail:hyjkh@126.com

非整倍体的诊断中应用价值,为该技术在产前诊断中的合理应用提供良好的临床依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本中心收集 2016 年 1 月-2019 年 12 月在济宁市第一人民医院行 NIPT 孕妇共 8828 例,其中高龄孕妇选择 NIPT 4200 例,血清学筛查高风险 643 例,血清学筛查临界风险 2200 例,超声软指标异常 338 例,双胎/IVF-ET 634 例,错过唐筛选择 NIPT 替代 108 例,拒绝唐筛要求 NIPT 610 例,其他 95 例。见表 1。本研究获本院伦理委员会批准。

表 1 2016-2019 年孕妇行 NIPT 的临床因素分析(n)

项目	2016 年	2017 年	2018 年	2019 年	合计
高龄(≥35 岁)	1082	1150	970	998	4200
血清学筛查高风险	182	197	128	136	643
血清学筛查临界风险	584	606	490	520	2200
超声软指标异常	19	58	110	151	338
双胎/IVF-ET	111	117	187	219	634
错过唐筛选择 NIPT 替代	0	15	31	62	108
拒绝唐筛要求	71	82	170	287	610
其他	0	8	38	49	95
合计	2049	2233	2124	2422	8828

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 无创 DNA 的试剂盒采用贝瑞和康试剂盒,采用贝瑞和康 NextSeq CN500 测序平台。羊水穿刺采用 Thermo 培养箱,芯片采用 Human CytoSNP-12 芯片。羊水培养基采用白云山细胞培养基。

1.2.2 NIPT 检测 抽取孕妇外周血 5ml 用 EDTA 抗凝,提取血浆游离 DNA,采用 NextSeq CN500 高通量测序仪检测,结果进行高通量分析,并通过生物信息学分析计算 Z 值,正常值为 Z 值介于-3~3 之间,当 Z 值>3,三体高风险,当 Z 值<-3,单体高

风险。NIPT 高风险孕妇行羊水穿刺验证结果,判断有无假阳性。NIPT 低风险孕妇进行产前、产后电话追踪随访,判断有无假阴性。

1)核型染色体制备。受检者妊娠孕周均在 18~32 周,B 超定位经腹部羊水穿刺取样,每次取羊水量 20~30ml,将新鲜羊水移入 20ml 离心管,室温,1700~1800r/min 离心 10min,吸去上清液,留约 0.5ml,分别接种于两个培养瓶中,采用 G 显带法,进行羊水细胞染色体核型分析。

2)基因芯片技术。采集羊水 10ml 并提取 gDNA(QIAGEN)。扩增产物 DNA 取 4μl 进行第 2 轮扩增,两轮扩增后的产物继续按照说明书(Infinium@ HD Assay Super, Manual Protoc01)操作,经过一系列的酶终止,变性后与 Human CytoSNP-12 芯片(Illumina,美国)杂交,再经过染色、信号放大后进行芯片扫描,用 Karyostudio(version1.4.3 Illumina)软件进行数据分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件进行统计分析,计数资料用 n 表示。NIPT 高风险结果与羊水穿刺结果进行比对,统计阳性和假阳性例数。

2 结果

2.1 2016-2019 年 NIPT 高风险结果与羊水穿刺结果分析

2016-2019 年 NIPT 高风险 123 例,其中 21 三体高风险 38 例、18 三体高风险 12 例、13 三体高风险 5 例、性染色体高风险和其他染色体高风险 56 例和 12 例。通过羊水穿刺介入性产前诊断确诊 21 三体 28 例,假阳性例数 10 例;18 三体 7 例,假阳性例数 5 例;13 三体 1 例,假阳性例数 1 例;性染色体异常 17 例,假阳性例数 39 例;其他染色体异常 4 例,假阳性例数 8 例。阳性预测值分别为 73.7%、58.3%、20.0%、30.4%、33.3%。见表 2、3。

表 2 2016-2019 年 NIPT 高风险例数、羊水穿刺确诊例数以及阳性预测值分析(n)

	2016 年		2017 年		2018 年		2019 年		总数		阳性预测值/%
	高风险	确诊	高风险	确诊	高风险	确诊	高风险	确诊	高风险	确诊	
21 三体	5	4	12	10	9	8	12	6	38	28	73.7
18 三体	5	3	2	1	0	0	5	3	12	7	58.3
13 三体	1	0	0	0	3	1	1	0	5	1	20.0
性染色体	13	3	9	2	15	3	19	9	56	17	30.4
其他	1	1	0	0	3	1	8	2	12	4	33.3

表 3 NIPT 高风险结果和羊水穿刺确诊结果分析

NIPT 结果	21 三体		18 三体		13 三体		性染色体高风险		其他	
	确诊	未患	确诊	未患	确诊	未患	确诊	未患	确诊	未患
高风险	28	10	7	5	1	4	17	39	4	8

2.3 随访结果

所有 NIPT 孕妇进行电话随访。NIPT 高风险孕妇 123 例,行羊水穿刺 104 例,确诊染色体异常 57 例,其中引产 55 例,1 例胎儿性染色体 47 (XYY),羊水穿刺确诊后,要求继续妊娠,分娩后随访新生儿出生后 6 个月未发现异常;1 例胎儿性染色体 47 (XXY),羊水穿刺确诊后,要求继续妊娠,分娩后随访新生儿出生后 6 个月未发现异常。未行羊水穿刺 19 例,4 例 21 三体高风险胎儿超声异常引产;2 例 18 三体高风险,超声胎儿多发畸形引产;1 例 13 三体高风险,超声 NT 4.0mm 引产;4 例性染色体高风险拒绝羊水穿刺分娩后随访新生儿正常;有 8 例失访病历。NIPT 低风险孕妇行电话随访未发现新生儿发育异常。

3 讨论

我国出生缺陷发生率高达 5.6%^[2],国家推行出生缺陷三级预防策略中,产前诊断是降低出生缺陷率重要的二级预防。侵入性产前诊断可导致流产、胎膜早破、感染等并发症,传统的产前诊断技术如羊水穿刺等,约 0.5%~0.86% 胎儿丢失率^[3]。因此外周血 NIPT 以无创性和相对较高的准确性在临床上获得了较广泛的应用。

在 NIPT 检测技术的临床评价中,包含两方面:一是 NIPT 选择的临床应用指征,是否适用;二、NIPT 的阳性预测值、假阳性和假阴性结果的比较。通过对 NIPT 的临床应用指征统计分析,临床中选择做 NIPT 的孕妇以高龄孕妇为主 (4200/8828)。国家卫计委发布的《高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范(试行)》,指出高龄 (≥ 35 岁)为 NIPT 的慎用人群。高龄孕妇选择做 NIPT 的比例最高,一方面是我国国情所致,2016 年二胎政策放开后大量的高龄孕产妇的出现^[4],使得高龄孕妇占妊娠总数的比例明显增高。另一方面,高龄孕妇对侵入性产前诊断流产、感染等风险接受较差。一项大型病例队列研究发现 ≥ 35 岁孕产妇在人群中的自然流产率 $\geq 25\%$ ^[5]。从既往地统计学数据显示,高龄孕妇引起胎儿染色体疾病的比例显著增加。以最常见的唐氏综合征为例,发

生率约为妊娠的 1/500 与出生儿的 1/(800~1000),而在 35 岁以上的高龄孕妇,唐氏综合征的发生率增加至 1/(200~270)^[5],所以在临床咨询中一定要注意 NIPT 和侵入性产前诊断的指征选择,尤其是高龄孕妇。对于 21、18 和 13 三体综合征产前筛查来说,NIPT 是目前最敏感的检测技术手段^[6]。但是我们也要有一个明确的认识,NIPT 只能算一个深度筛查技术,并不是传统意义上诊断的“金标准”,故 NIPT 的慎用人群首选侵入性产前诊断,且 NIPT 高风险人群需要进一步侵入性产前诊断如羊水穿刺进行确诊^[2]。

通过表 2、表 3 的统计数据可以对 NIPT 高风险阳性预测值、假阳性结果进行评价。2016-2019 年 NIPT 共发现非整倍体及其他染色体高风险病例 123 例,其中 21 三体 38 例,18 三体 12 例,13 三体 5 例,性染色体 56 例,21 三体的阳性预测值为 73.7%(28/38),18 三体的阳性预测值为 58.3%(7/12),13 三体的阳性预测值为 20.0%(1/5),性染色体的阳性预测值为 30.4%(17/56),其中以 21 三体的阳性预测值最高,13 三体的阳性预测值最低,检测技术中每个染色体异常均存在假阳性例数。根据文献报道,NIPT 对于 21 三体的检出率为 94.4%~100%,平均 99.7%^[7],本文 21 三体阳性预测值为 73.7%,数值偏低可能由于部分高风险孕妇,因为超声异常直接选择了引产术,而未行羊水穿刺进一步确诊。13 三体阳性预测值最低,有研究表明可能是由于 13 号染色体的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸和胞嘧啶脱氧核糖核苷酸含量较低,导致测序时出现误差,或由于 13 三体孕妇的胎盘较小,释放入母血的游离胎儿 DNA 数量相对减少造成的^[8]。对于 NIPT 低风险病人,虽然没有羊水穿刺进一步确诊,但是我院通过分娩后随访未发现假阴性结果。

综上所述,孕妇外周血无创产前基因检测技术虽然无创,但是也存在假阳性及假阴性结果^[9-10],所以 NIPT 高风险孕妇需要进行侵入性产前诊断。NIPT 低风险,仅仅说明胎儿罹患 21、18、13 三体综合征的风险较低,并不能说明其他染色体异常的风险也较低,同时也不除外出现假阴性结果的可能

性。对于 NIPT 低风险孕妇,一定要建议定期产检,严格进行排畸超声检查。NIPT 技术对 21 三体综合征具有较高的准确率,又因无创操作,故单纯高龄孕妇选择较多。NIPT 可作为筛查手段,而对于高风险孕妇,需要临床咨询人员明确告知 NIPT 的利弊,仍然建议首选羊水穿刺等侵入性产前诊断技术^[11-12]。

当然,随着检测技术进一步的提高,我们期待 NIPT 技术更好的发展,有更宽的检测范围和更高的准确率,以降低侵入性产前诊断技术带来的风险。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350 (9076): 485-487. DOI: 10. 1016 / S0140-6736 (97)02174-0.
- [2] Kim SM, Kim HH, Han YJ, et al. Change in rates of prenatal tests for chromosomal abnormality over a 12-year period in women of advanced maternal age [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2018, 61 (4): 453-460. DOI: 10. 5468/ogs. 2018. 61. 4. 453.
- [3] 刘慧, 方慧琴, 陈薇, 等. 羊水穿刺在产前筛查无创高风险病例中染色体异常的产前诊断价值 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12 (10): 1311-1318.
- [4] Shi Y, Ma J, Xue Y, et al. The assessment of combined karyotype analysis and chromosomal microarray in pregnant women of advanced maternal age: a multicenter study [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7 (14): 318-319. DOI: 10. 21037 /atm. 2019. 06. 63.
- [5] 蒋宇林, 刘俊涛. 高龄妊娠的产前咨询 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36 (9): 811-814. DOI: 10. 19538/j. fk2020090106
- [6] Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics [J]. *Genet Med*, 2016, 18 (10): 1056-1065. DOI: 10. 1038/gim. 2016. 97.
- [7] 戚庆伟. 无创产前检测临床应用相关指南解读 [J]. *发育医学电子杂志*, 2019, 7 (3): 161-167.
- [8] 燕凤, 燕飞, 姚念玲, 等. 孕妇外周血无创 DNA 检测技术在产前诊断中的应用 [J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34 (1): 17-21.
- [9] Gil MM, Quezada MS, Revello R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45 (3): 249-266. DOI: 10. 1002/uog. 14791.
- [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. DOI: 10. 1002/uog. 17484.
- [11] 马志慧. 研究无创产前 DNA 诊断高龄孕妇异常核型的价值 [J]. *河北医学*, 2020, 26 (10): 1733-1738.
- [12] 杨树法, 庄太凤. 接受无创游离 DNA 检测的唐氏筛查高危孕妇染色体畸形潜在漏诊风险分析 [J]. *山东医药*, 2019, 59 (26): 42-44.

(收稿日期 2021-01-12)

(本文编辑:甘慧敏)

(上接第 322 页)

- [8] Bora E, Binnur AB, Alptekin K. Neurocognitive impairment in deficit and nondeficit schizophrenia: a meta-analysis [J]. *Psychol Med*, 2017, 47 (14): 2401-2413. DOI: 10. 1017/S0033291717000952.
- [9] Yu M, Tang X, Wang X, et al. Neurocognitive impairments in deficit and nondeficit schizophrenia and their relationships with symptom dimensions and other clinical variables [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9): e0138357. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0138357.
- [10] 高炬, 唐小伟, 于森, 等. 缺陷型精神分裂症患者静息态局部一致性 with 注意功能的相关分析 [J]. *中华精神科杂志*, 2018, 51 (1): 20-27.
- [11] Bentz M, JRM J, Kjaersdam TG, et al. Neurocognitive functions and social functioning in young females with recent-onset anorexia nervosa and recovered individuals [J]. *J Eat Disord*, 2017, 5: 5. DOI: 10. 1186/s40337-017-0137-3.
- [12] Kanchanatawan B, Sriswasdi S, Thika S, et al. Deficit schizophrenia is a discrete diagnostic category defined by neuro-immune and neurocognitive features: results of supervised machine learning [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33 (4): 1053-1067. DOI: 10. 1007/s11011-018-0208-4.

(收稿日期 2021-03-25)

(本文编辑:甘慧敏)