

· 临床指南 ·

荧光定量 PCR 技术在产前诊断中的应用专家共识

荧光定量 PCR 技术在产前诊断中的应用协作组

自 2002 年起,我国启动了以唐氏综合征等常见染色体异常为主要目标疾病的产前筛查及产前诊断,染色体核型分析技术是确诊的“金标准”。染色体核型分析技术准确、可靠,但以手工操作为主,需要进行细胞培养,存在耗时长、检测通量低、需培养专业人员及实验室建设周期长等诸多问题,已难以满足日益增长的临床产前诊断需求。

近年来,分子遗传学诊断技术发展迅速,荧光定量 PCR (quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR) 技术、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术、多重连接探针扩增 (multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA) 技术、实时 (real time) 荧光 PCR 技术、染色体微阵列分析 (chromosomal microarray analysis, CMA) 技术、产前液相芯片 (BACs-on-Beads, BoBs) 技术、无创性产前基因检测 (noninvasive prenatal testing, NIPT) 等已逐渐成熟,并开始向临床转化。分子遗传学诊断技术多以遗传物质 DNA 为检测对象,不需要进行细胞培养,为传统的细胞染色体核型分析技术提供了有效的补充。

QF-PCR 技术是通过检测遗传标记短串联重复序列 (STR) 进行染色体异常的产前诊断,由 Adinolfi 等于 1995 年建立。一定人群中每个 STR 基因座有数个至数十个的等位基因,而每个个体 STR 基因座的等位基因数量与染色体数目具有对应关系。QF-PCR 基于 PCR 扩增和毛细管电泳分离技术,通过定性、定量分析 STR 的多态性,能诊断出 99.2%~100.0% 目标染色体 (21、18、13、X 和 Y 等 5 种染色体) 的非整倍体异常^[1-4];除此之外,还能检测出三倍体和母体细胞污染^[5],以及根据 STR 等位基因的个性化信息判别多余染色体的父亲或母亲来源,为临床提供更多的遗传信息。与其他分子诊断技

术相比,QF-PCR 技术可半自动化和批量检测,24~48 h 内能得到结果^[6],在高通量检测、价格低廉^[7]、质量控制等方面具有突出优势,有望解决产前诊断技术资源的“缺口”问题。

QF-PCR 技术是快速靶向分子诊断技术,主要针对 21、18、13、X 和 Y 共 5 种染色体的数目异常,不能检测出所有的染色体异常。QF-PCR 技术对高风险染色体异常 (可导致异常临床表现) 的漏诊风险是临床应用研究中关注的重点。Speevak 等^[4]发现,在所有的产前诊断适应证下,QF-PCR 技术能检测出 98.5% 的高风险染色体异常,如果把超声检查结果异常的适应证排除在外,则可以检测出 99.92% 的高风险染色体异常。

2004 年,英国国家筛查委员会 (UK National Screening Committee, UKNSC) 建议,在产前诊断中可用 QF-PCR 或 FISH 技术取代染色体核型分析技术;2005 年 4 月,英国临床细胞遗传学和临床分子遗传学协会 (Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society, ACC-CMGS) 发布了第 1 版的 QF-PCR 应用指南^[8],2012 年又推出了新版^[8]。近年来,世界其他地区的实验室也陆续进行了 QF-PCR 技术产前诊断的研究,并基本达成共识:在明确诊断适应证的情况下,即当胎儿超声检查未显示结构异常、且孕妇无染色体异常家族史时,QF-PCR 技术能可靠地用于常见染色体异常的产前诊断,有助于降低染色体核型分析检测量、减少产前诊断费用、缓解孕妇及家属的等待焦虑^[9-11]。

QF-PCR 技术在国外已有较广泛的应用,但目前尚未在国内产前诊断临床中普遍开展。为规范使用 QF-PCR 技术,由国家卫生和计划生育委员会召集、中国医学科学院北京协和医院产前诊断中心主办的“全国产前筛查与诊断技术管理规范编制研讨会”于 2015 年 11 月 14 日在成都召开,会议就 QF-PCR 等快速产前诊断技术的临床应用进展及其在国内应用中存在的具体问题进行了深入而广泛

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2016.05.001

通信作者:吕时铭,310006 杭州,浙江大学医学院附属妇产科医院检验科,Email:hzlsm@126.com

的探讨,并形成了 QF-PCR 技术在产前诊断中的应用专家共识。

一、QF-PCR 技术临床应用的适应证

1. QF-PCR 技术单独用于产前诊断的指征:

(1)常规产前筛查提示染色体非整倍体高风险的孕妇或高龄孕妇(需告知局限性):有常见染色体非整倍体产前诊断需求,无既往不良孕产史,超声筛查胎儿结构未发现明显异常。(2)NIPT 高风险孕妇:已采用针对 21 三体、18 三体、13 三体等常见染色体非整倍体的 NIPT 筛查,提示高风险,需要明确诊断者。

2. QF-PCR 与其他细胞遗传学分子诊断技术联合应用的指征:(1)QF-PCR 与染色体核型分析技术联合应用于染色体异常的产前诊断:染色体核型分析技术通常需要 2~3 周的时间发出报告。QF-PCR 与染色体核型分析技术联合应用,有助于早期诊断常见染色体异常,使临床能早期处理异常胎儿,并有助于缓解孕妇及家属的等待焦虑。适用的产前诊断指征包括:产前筛查高风险,高龄孕妇,超声检查示胎儿异常且提示为 13、18、21、X、Y 等染色体数目异常等。

(2)QF-PCR 与其他细胞遗传学分子诊断技术同时应用:QF-PCR 技术检测的是样本 DNA 而不是活体细胞,所需样本量少,方便应用。在临床应用其他细胞遗传学分子诊断技术时,可同时应用 QF-PCR 技术获得 13、18、21、X、Y 等染色体数目的信息,有助于排除常见染色体异常情况,辨别是否存在母体细胞污染,或其他分子诊断技术的检测结果进行验证等。其指征包括:①在进行单基因遗传病分子诊断时,应用 QF-PCR 技术检测常见 5 种染色体的数目异常;②在产前诊断操作中疑有母体细胞污染时,利用 QF-PCR 技术检测的 STR 多态性信息辨别采集的胎儿标本中是否混有母体组织细胞;③当其他用于常见染色体数目异常诊断的分子诊断技术(如 FISH)的结果异常或不明确时,可采用 QF-PCR 技术进行验证。

二、QF-PCR 技术在产前诊断应用中的相关问题

1. 不同的标本类型及处理建议:QF-PCR 技术检测可采用各种类型的产前标本。所需要的标本量为羊水 1~5 ml,或绒毛 0.2~2.0 mg,或脐血 0.2~2.0 ml。需注意的是,(1)羊水标本离心后如肉眼可见红色血液污染,则需将羊水标本同孕妇外周血标本同时检测,判断有无母体细胞污染;(2)所有的绒

毛标本均需将胎儿标本同孕妇外周血标本同时检测,以排除母体细胞污染;(3)由于局限性胎盘嵌合现象的存在,绒毛标本的细胞可能嵌合有正常及异常核型的细胞,采用绒毛标本提取 DNA 时应尽可能使用多条绒毛的混合细胞提取核酸;(4)如果绒毛标本经 QF-PCR 技术检测出染色体三体,而胎儿又无其他临床征象提示异常则建议对绒毛标本进行染色体核型分析,或抽取羊水进行 QF-PCR 技术检测。

2. 关于 QF-PCR 技术检测试剂:建议采用已注册的商品化试剂盒进行 QF-PCR 技术检测,按试剂盒说明书进行染色体非整倍体异常的诊断。参考 ACC-CMGS 指南^[8],试剂盒所采用的 STR 基因座应在所应用的人群中具有高度的异质性和多态性。其中,常染色体和 X 染色体的检测基因座应至少有 4 个,Y 染色体特异性检测基因座至少两个(建议包含 SRY 基因座),同时应包含能反映 X 染色体、Y 染色体数量比例的基因座(如 AMEL 基因座);建议加用 1 个 X 染色体计数基因座,如 TAF9b 基因座(同时位于 3 号染色体短臂和 X 染色体长臂上),当 Y 染色体缺如时可以对 X 染色体计数。

3. 特殊染色体数目异常的诊断:(1)关于 X 单体的诊断:如 Y 染色体特异性检测基因座(如 SRY)未出现基因型,并且其余性别基因座均显示为单倍基因型,可初步考虑 X 单体高风险;确诊需要结合 X 染色体计数基因座(如 TAF9b)的检测。需注意:性染色体的多态性检测(即 STR 检测)对单体而言只是筛查不是诊断,特别是当 STR 使用数量较少或家族具有同族血缘关系时假阳性风险更高。确诊必须采用 X 染色体计数基因座,如果没有,则需应用其他产前诊断技术进行确诊或在出具的报告内说明局限性。

(2)关于染色体三体的诊断提示:超过两条染色体的 STR 出现三等位基因型,其他染色体的 STR 检测无与之矛盾的结果,提示可能存在染色体三体,可采用其他产前诊断技术进一步验证。

(3)关于三体嵌合体的诊断:当某染色体上有单个或多个 STR 出现多余等位基因(三体最多出现 3 个等位基因),应注意观察是否存在嵌合体。QF-PCR 技术一般可检测出嵌合比例在 20% 及以上的三体嵌合体。

4. QF-PCR 技术检测结果的应用:QF-PCR 技术检测结果异常,可单独出具诊断报告,以便临床早期处理异常胎儿;QF-PCR 技术检测结果未显示异

常,不排除存在目标染色体以外的其他染色体异常,应在报告中告知 QF-PCR 检测的局限性和存在其他染色体异常风险等情况。

三、产前遗传咨询的相关问题

QF-PCR 技术的优势在于快速、高通量检测、适用于多种标本类型,在产前诊断领域有广泛的适用性。但 QF-PCR 技术为目标靶向检测,存在技术固有的局限性。表现在:(1)不能检测出目标范围外的其他染色体异常;(2)无法可靠地检测出低于 20% 的嵌合体。在进行 QF-PCR 技术检测前应告知孕妇 QF-PCR 技术的优势与局限性,并签署知情同意书,在检测后应结合孕妇的临床情况(如胎儿超声检查情况)进行遗传咨询。

四、QF-PCR 技术在产前诊断中的规范化应用

1. 产前诊断技术资质:QF-PCR 技术临床检测项目应在有产前诊断资质的医疗机构中开展。项目申请的要求参照我国卫生行业标准《胎儿染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准》(WS 322.2-2010)。申请 QF-PCR 技术检测的医师应是经过产前诊断专业培训的、有资质的医师。

2. 产前遗传咨询资质:在进行产前 QF-PCR 检测前和检测后,必须对孕妇及家属进行相关的产前遗传咨询。根据 2002 年颁发的《产前诊断技术管理办法》的有关规定,从事产前诊断技术的卫生专业技术人员,必须经过系统的产前诊断技术专业培

训,通过省级卫生行政部门的考核并获得从事产前诊断技术的“母婴保健技术考核合格证书”。

3. 签署知情同意书:在进行产前 QF-PCR 技术检测之前,必须与孕妇有充分的知情谈话,需说明 QF-PCR 技术检测的内容、风险和技术局限性,并签署相关的知情同意书。

4. 标本采集:参照卫生行业标准《胎儿染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准》(WS 322.2-2010)进行标本采集。

5. QF-PCR 技术的实验室检测:QF-PCR 技术检测应在获得体外基因扩增检测资质的 PCR 实验室中进行。实验室应配备毛细管电泳仪、PCR 扩增仪等相应的实验设备,并建有实验操作技术文件;实验室操作人员应经过体外基因扩增检验实验室技术的专业培训并获得许可资质;出具诊断报告的人员应是具备产前诊断资质的医师,并经过 QF-PCR 技术的相关培训。

6. QF-PCR 技术检测报告的应用:出具 QF-PCR 技术检测报告时,应在报告中明确说明检测结果的

提示意义与局限性。

QF-PCR 技术虽然不能检测完整核型,但对 21 三体、18 三体、13 三体及性染色体的数目异常而言,是 1 项性价比较高的产前分子遗传学诊断技术,有良好的应用前景。在产前筛查蓬勃发展,而国内产前细胞染色体核型分析诊断资源不足的情况下,规范应用 QF-PCR 技术有助于缓解细胞染色体核型分析供不应求的矛盾,也有助于加强我国染色体异常出生缺陷二级预防的力量,完成常见染色体非整倍体异常的产前诊断,希望在降低严重缺陷儿出生率、提高出生人口素质等方面发挥出积极的社会意义和经济意义。

荧光定量 PCR 技术在产前诊断中的应用协作组专家成员:边旭明(中国医学科学院北京协和医院)、王和(四川大学华西第二医院)、郭玲仟(中南大学医学遗传学国家重点实验室)、胡娅莉(南京大学医学院附属鼓楼医院)、廖世秀(河南省人民医院)、刘俊涛(中国医学科学院北京协和医院)、廖灿(广州市妇女儿童医疗中心)、朱宝生(云南省第一人民医院)、吕时铭(浙江大学医学院附属妇产科医院)、王华(湖南省妇幼保健院)、许争峰(南京市妇幼保健院)、杨慧霞(北京大学第一医院)、徐两蒲(福建省妇幼保健院)、王治国(国家卫生计生委临床检验中心)、蔡艳(济南市妇幼保健院)、戚庆炜(中国医学科学院北京协和医院)、朱宇宁(浙江大学医学院附属妇产科医院)、尹爱华(广东省妇幼保健院)

本共识执笔专家:朱宇宁(浙江大学医学院附属妇产科医院)、吕时铭(浙江大学医学院附属妇产科医院)

参 考 文 献

- [1] Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(10):1001-1006.
- [2] Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, et al. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing[J]. BJOG, 2005, 112(10):1369-1375. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2005.00695.x.
- [3] Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, et al. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075:288-298. DOI: 10.1196/annals.1368.039.
- [4] Speevak MD, McGowan-Jordan J, Chun K. The detection of chromosome anomalies by QF-PCR and residual risks as compared to G-banded analysis[J]. Prenat Diagn, 2011, 31(5): 454-458. DOI: 10.1002/pd.2716.
- [5] Mann K, Ogilvie CM. QF-PCR: application, overview and review of the literature[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(4):309-314. DOI: 10.1002/pd.2945.
- [6] Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR) [J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(3):285-288. DOI: 10.1369/jhc.4B6409.2005.

- [7] Gekas J, van den Berg DG, Durand A, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities[J]. Eur J Hum Genet, 2011,19(1): 3-9. DOI: 10.1038/ejhg.2010.138.
- [8] Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines (2012) v3.01[EB/OL]. [2016-01-15]. http://www.devysr.com/Download.ashx?download=40&file=QF-PCR_Best_practice_guidelines.pdf.
- [9] Ogilvie CM, Yaron Y, Beaudet AL. Current controversies in prenatal diagnosis 3: For prenatal diagnosis, should we offer less or more than metaphase karyotyping?[J]. Prenat Diagn, 2009,29(1):11-14. DOI: 10.1002/pd.2107.
- [10] Hills A, Donaghue C, Waters J, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region[J]. Prenat Diagn, 2010,30(6): 509-517. DOI: 10.1002/pd.2503.
- [11] Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(1):40-49. DOI: 10.1002/pd.2192.

(收稿日期:2016-01-25)

(本文编辑:沈平虎)

《中华妇产科杂志》第十二届编辑委员会名单

顾问:边旭明 陈贵安 范光升 黄醒华 林其德 潘伟 彭芝兰 石一复 孙建衡 夏恩兰
 名誉总编辑:曹泽毅
 总编辑:郎景和
 副总编辑:魏丽惠 沈铿 孔北华 张为远 狄文 陈子江 杨冬梓 杨慧霞 张震宇 朱兰
 编辑委员:(以下按姓氏汉语拼音字母顺序排列)

陈春林	陈敦金*	陈倩	程利南	崔恒	崔满华
崔竹梅*	丁岩	段华	段涛	范玲	丰有吉
古航	郭丽娜	郝敏	贺晶*	胡小良	胡娅莉
华克勤	黄荷凤	黄薇*	黄向华	孔为民	冷金花
李斌*	李广太	李力	李佩玲	李小平	李笑天*
李旭	梁德杨*(中国香港)		梁志清	林建华	林金芳
林兆强(中国香港)		凌斌	刘彩霞*	刘继红	刘俊涛*
刘兴会	刘朝晖*	卢彦平	鲁永鲜	马丁	马玉燕
漆洪波	乔杰	沈丹华	盛修贵	宋磊	宋岩峰
陶光实*	童晓文	万小平	汪希鹏	王波*	王和
王建六	王少为	王谢桐	王益夫(中国香港)		王泽华
温宏武	吴令英	吴瑞芳	吴尚纯	吴小华	向阳
谢幸	徐丛剑	薛凤霞	颜婉嫦(中国香港)		杨孜
姚元庆	郁琦	余艳红	张国楠	张建平	张淑兰
张廷彰*(中国台湾)		张晓薇	赵一鸣	郑博仁*(中国台湾)	
周灿权	周先荣	周应芳	Felix Wong(澳大利亚)		
Jinsong Liu(美国)		Wenxin Zheng(美国)*			

注:*为现任编委

《中华妇产科杂志》第十二届编辑委员会通讯编委名单

(以下按姓氏汉语拼音字母顺序排列)

崔保霞	金力	吕卫国	马润玫	任慕兰	时春艳	隋龙
田秦杰	王子莲	薛华丹	杨佳欣	姚书忠	叶元华	张福泉
张信美	赵爱民	赵丽君	邹丽	邹燕		