

## 孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前检测应用价值探讨

朱赛娟 张月萍\* 伍俊萍 雷彩霞 孙海燕 吴佳龙 徐建忠 周 静

( 复旦大学附属妇产科医院集爱遗传与不育诊断中心 ,上海 200011)

**【摘要】** 目的: 研究胎儿游离 DNA 无创产前检测( NIPT) 胎儿非整倍体筛查的准确性。方法: 选取 2013 年 8 月至 2017 年 2 月于我院行羊水穿刺及胎儿染色体检查的孕妇共 800 例, 孕妇均已获得外院 NIPT 检测结果, 其中 NIPT 阳性 557 例, 包括 21 三体高风险 256 例, 18 三体高风险 85 例, 13 三体高风险 37 例, 性染色体异常 85 例, 其他染色体异常 94 例; NIPT 阴性 243 例, 包括超声畸形筛查发现胎儿结构畸形或软指标 183 例, 高龄 27 例, 上胎异常 7 例, 早孕用药 1 例, 无指征要求做羊水穿刺 25 例。NIPT 检测结果来自国内 11 家医院或检测机构。染色体检查采用核型分析和染色体芯片分析( CMA), 分析比较 800 例孕妇的有创产前诊断与 NIPT 无创产前诊断结果。结果: NIPT 对 21 三体、18 三体、13 三体和性染色体非整倍体的阳性预测值分别为 81.6%( 209/256), 68.2%( 58/85), 8.1%( 3/37) 和 41.2%( 35/85), NIPT 对 21 三体的阴性预测值为 99.6%( 242/243), 对 13 三体、18 三体和性染色体非整倍体的阴性预测值均为 100%( 243/243); NIPT 对其他染色体非整倍体的阳性预测值为 1.6%( 1/61), NIPT 对 CNV 的阳性预测值为 54.5%( 18/33)。结论: 分散在多家检测机构模式下的 NIPT 检测结果阳性预测值较低, NIPT 的临床应用需加强规范和质控。

**【关键词】** 胎儿非整倍体筛查; NIPT; 染色体核型分析; CMA 染色体芯片分析

中图分类号: R714.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7379( 2017) 12-0917-04

DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2017.12.037

**Application of non-invasive prenatal detection of fetal free DNA in peripheral blood of pregnant women.** Zhu Saijuan, Zhang Yueping, Wu Junping et al. Shanghai JIAI Genetics and IVF Institute, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200011

**【Abstract】 Objective:** To study the accuracy of non invasive prenatal testing ( NIPT) for fetal aneuploidy screening. **Methods:** From Aug.2013 to Feb.2017, 800 pregnant women with NIPT results came to do amniocentesis examination, in which 557 cases were NIPT positive, including 256 cases for high risk of trisomy 21, 85 for trisomy 18, 37 for trisomy 13, 85 for sex chromosomal aneuploidy and 94 for other chromosomal abnormalities. 243 cases were NIPT negative who require amniotic fluid puncture, including 183 cases with ultrasound screening of fetal structural abnormalities or soft markers, 27 cases of elderly mother, 7 cases with fetal abnormalities, 1 case with early pregnancy medication and 25 cases with no indications but strongly required by the pregnant women. NIPT tests were detected by 11 domestic hospitals or testing institutions. The chromosome karyotype analysis and chromosomal microarray analysis ( Chromosomal Microarray Analysis, CMA) were conducted for chromosomal analysis. Comparative analysis of invasive prenatal diagnosis and noninvasive NIPT results were made. **Results:** The positive predictive value of NIPT for trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13 and sex chromosome were 81.6%( 209/256), 68.2%( 58/85), 8.1%( 3/37) and 41.2%( 35/85). The negative predictive value turned out to be 99.6%( 242/243) for trisomy 21 and 100%( 243/243) for trisomy 13, tri-

\* 通讯作者 Email: chnypzhang@163.com

somy 18 and sex chromosome aneuploidy. The positive predictive value of NIPT for other autosomal aneuploidy was 1.6% (1/61). The positive predictive value of NIPT for CNV was 54.5% (18/33). **Conclusion:** The positive predictive value of the NIPT detection in the different hospitals and institutions is relatively low, the clinical application of NIPT should be supervised under strengthened regulations and rigorous control system.

**【Key words】** Fetal aneuploidy screening; NIPT; Karyotype analysis; CMA chromosomal microarray analysis

非整倍体是早中孕期胎儿最常见的异常核型<sup>[1]</sup>,是出生缺陷和围产儿死亡的主要原因。产前筛查和诊断是降低出生缺陷的重要手段。有创产前检查的准确率为 98%~99%,成为金标准,但术后流产、羊水渗漏、宫内感染等并发症的风险达 0.3%~1.0%<sup>[2]</sup>,一定程度上限制了其使用,尤其对有穿刺禁忌证的孕妇。产前非整倍体无创筛查的敏感性约为 70%,假阳性率较高,约 5%~8%<sup>[3]</sup>。孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前筛查(non-invasive prenatal testing, NIPT)提升了产前无创筛查的精准度,敏感性、特异性达 99%,假阳性率为 0.1%<sup>[4]</sup>。由于染色体病本身的发生率相对较低,假阳性率这一指标不能真实反映 NIPT 筛查的准确性。本资料通过回顾分析 2013 年 8 月至 2017 年 2 月获得外院 NIPT 检测结果后因各种原因来我院行羊水穿刺的 800 例孕妇的胎儿核型及染色体微阵列(Chromosomal Microarray Analysis, CMA)芯片检测结果,比较 NIPT 与有创产前检查结果的符合率,探讨 NIPT 的临床应用价值及局限性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2013 年 8 月至 2017 年 7 月已获得外院 NIPT 检测结果,因各种原因来我院遗传门诊就诊的孕妇共 800 例:NIPT 阳性 557 例,其中 21 三体高危 256 例,18 三体高危 85 例,13 三体高危 37 例,性染色体异常 85 例,其他非整倍体高风险 61 例,微缺失微重复 33 例;NIPT 阴性 243 例,其中超声畸形筛查发现胎儿结构畸形或软指标 183 例,高龄 27 例,上胎异常 7 例,早孕用药 1 例,无指征要求做羊水穿刺 25 例。孕妇年龄 17~44 岁(32±5 岁),孕龄 16~28 周(平均 20.5 周)。孕妇知情同意后,行羊膜腔穿刺并抽取羊水两份,各 8ml,一份羊水细胞原位培养后行染色体核型分析,一份抽提 DNA 进行 SNP 芯片检测。

**1.2 核型分析** 取羊水 8ml,1500r/min,离心 8min,加 2ml 培养液,吹打混匀。接种至含盖玻片的培养皿,5%CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 静置 2h。待羊水细胞贴壁完成,加培养液继续培养 8~12 天,加 5×10<sup>-4</sup>g/L 秋水仙素,2h 后常规收获制片,G 显带,分析 20 个分裂相。

**1.3 SNP 芯片检测** 取羊水 8ml,1500r/min,离心 8min。按 Blood & Tissue Kit(QIAGEN)要求抽提 DNA,测定浓度和纯

度,DNA<sub>260/280</sub>在 1.7~1.9 范围内,调整浓度约 50ng/ml。按 Illumina cyto12 SNP 芯片的要求对提取的 DNA 进行操作,通过扩增、酶切、标记、沉淀、溶解、解链过程,与 Illumina cyto12 芯片进行杂交、孵育、洗涤、染色。采用 iscan 扫描系统对数据进行采集,Karyostudio 软件对数据进行分析。

**1.4 统计学处理** 将 NIPT 结果与染色体核型分析和 SNP 芯片分析结果进行比对,统计真阳性、假阳性、真阴性、假阴性病例。阳性预测值(positive predict value, PPV) = 真阳性病例数/(真阳性病例+假阳性病例)。阴性预测值(negative predict value, NPV) = 真阴性病例数/(真阴性病例+假阴性病例)。以 PPV 和 NPV 评估 NIPT 对胎儿染色体检查的准确性。

## 2 结果

**2.1 五对常见非整倍体 NIPT 无创产前与有创产前诊断结果对比** NIPT 提示 21 三体高风险 256 例,209 例验证为 21 三体,43 例正常,4 例 CNV,分别为 dup(3)(p26.3)、dup(21)(q22.11)、del(21)(q21.3q22.1)和 del(21)(q21.2q22.12)。NIPT 提示 13 三体阳性结果 37 例,3 例验证为 13 三体,32 例正常,2 例 CNV,分别为 dup(22)(q11.1)和 dup(13)(q21.1q34)。NIPT 提示 18 三体阳性结果 85 例,58 例验证为 18 三体,23 例正常,1 例 t(3;18)(p26;q12.2),2 例 CNV,分别为 dup(18)(q11.1q12.1)和 del(18)(p11.3p11.2)。NIPT 提示性染色体异常 85 例,32 例验证为性染色体异常(XXY 11 例,XXX 10 例,XO 4 例,XYY 4 例,XXYY 1 例,XO/XX 嵌合 1 例,XO/XY 嵌合 1 例),50 例正常,1 例 t(1;11)(q21;q12),2 例 CNV 分别为 dup(X)(p22.33p11.4)和 dup(X)(p21.3q23)。

**2.2 其他非整倍体 NIPT 无创产前与有创产前诊断结果对比** NIPT 提示 13、18、21 以外常染色体非整倍体 61 例,1 例验证为 47,XX,+9[6]/46,XX[14],其余 60 例均为正常。

**2.3 NIPT 提示 CNV 与有创产前诊断结果对比** NIPT 提示 CNV 共 33 例,18 例经 CMA 染色体芯片分析验证与 NIPT 提示结果一致,15 例验证为正常病例。见表 3。

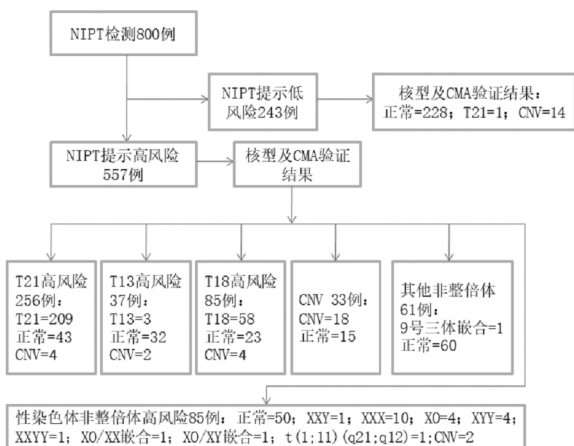


图 1 NIPT 提示结果核型及 CMA 验证情况

表 1 NIPT 高风险病例有创产前诊断结果

NIPT 结果	n	真阳性	假阳性	PPV( %)
21 三体高风险	256	209	47	81.6
18 三体高风险	85	58	27	68.2
13 三体高风险	37	3	34	8.1
性染色体非整倍体	85	35	50	41.2
其他非整倍体	61	1	60	1.6
CNV	33	18	15	54.5

注: PPV = 真阳性病例数 / 总病例数( 真阳性 + 假阳性)

表 2 NIPT 低风险病例有创产前诊断结果

NIPT 结果	n	真阴性	假阴性	NPV( %)
21 三体低风险	243	242	1	99.6
18 三体低风险	243	243	0	100
13 三体低风险	243	243	0	100
性染色体非整倍体	243	243	0	100
其他常染色体非整倍体	243	243	0	100
CNV	243	228	15	93.8

注: NPV = 真阴性病例数 / 总病例数( 真阴性 + 假阴性)

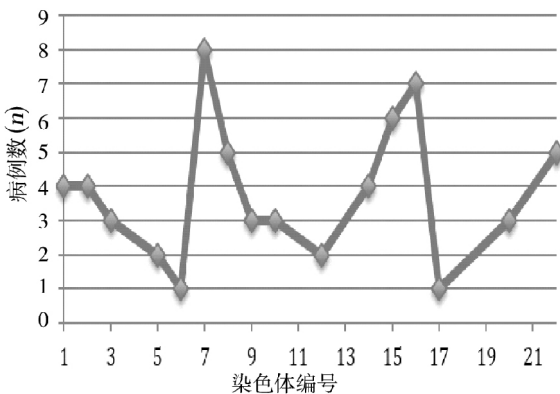


图 2 NIPT 提示非整倍体的其他染色体及其对应病例数

表 3 NIPT 提示 CNV 病例的有创产前诊断结果

NIPT 提示结果	CMA 染色体芯片分析结果	两者是否一致	NIPT 提示结果	CMA 染色体芯片分析结果	两者是否一致
del(13)(q13.3q14.1) 40Mb	arr13q13.3q14.1(39,321,442-43,296,410)x1,3,974,968bp	是	del(4)(p16.3p15.33) 9Mb	46,XN	否
del(4)(q21.23q24) 18Mb	arr4q21.23q24(85,898,741-105,231,571)x1,19,332,830bp	是	del(14)(q22.1q23.33) 54.38Mb	46,XN	否
del(4)(q34q35) 18Mb	arr4q34.1q35.2(172,112,864-190,880,409)x1,18,767,545bp	是	del(15)(q11.2q13.1) 7Mb	46,XN	否
dup(3)(p26.2p21.3) 8Mb	arr3p26.3p22.2(199,784-37,175,960)x3,36,976,176bp	是	del(7)(q21.3q31.2) 23Mb	46,XN	否
del(3)(p26.3p26.1) 8Mb	arr3p26.3p25.3(66894-8752675)x1,8,685,781bp	是	dup(9)(p24.1p13.1) 33.04Mb	46,XN	否
dup(5)(q14.3) 1.5Mb	arr5q14.3(85,337,276-86,419,364)x3,1,082,088bp	是	dup(7)(q11.22q11.23) 72Mb	46,XN	否
del(4)(q34.1q35.1) 16Mb	arr4q34.1q35.2(172440126-190880409)x1,18,440,283bp	是	del(1)(p35.2p26.3) 57Mb	46,XN	否
dup(17)(q21.33q22.4) 4.38Mb	arr17q21.33q22(49,998,938-53,298,943)x3,3,300,005bp	是	del(16)(p13.12p12.3) 5.51Mb	46,XN	否
del(7)(p14.1p11.2) 14.28Mb	arr7p14.1p11.2(41,588,619-56,038,819)x1,14,450,201bp	是	dup(13)(q12.11q12.13) 2.3Mb	46,XN	否
dup(18)(q12.2q12.3) 8Mb	arr18q12.2q12.3(35,161,400-39,823,817)x3,4,662,418bp	是	dup(4)(q21.1q21.2) 4Mb	46,XN	否
dup(12)(p13.3p11.1) 30Mb	arr12p13.3p11.1(191619-34768168)x3,34,576,549bp	是	dup(4q31.22) x3 0.8Mb	46,XN	否
del(13)(q14.3q21.1) 4Mb	arr13q14.3q21.1(53486417-57704823)x3,4,218,406bp	是	del(8)(p23.3p22) 13.07Mb	46,XN	否
del(7)(q21.11q31.1) 26.63Mb	arr7q21.11q31.1(81553317-110075577)x1,28,522,260bp	是	dup(2)(p25.3p26.2) 52.99Mb	46,XN	否
del(5)(p15.33p15.1) 18Mb	arr5p15.33p14.3(38,139-21,018,827)x1,20,980,689bp	是	del(22)(q11.23q12.1) 2Mb	46,XN	否
del(5)(p15.33p15.31) 1.9Mb	arr5p15.33p15.2(38,139-40,202,891)x1,10,164,753bp	是	dup(15)(q13.2q13.3) 1.32Mb	46,XN	否
del(8)(p23.3p22.13) 13.96Mb	LOH(8)(p23.3p22)(176,818-18,668,608)18,491,791bp	是			
dup(18)(p11.323)	arr18p11.32p11.31(12842-31817522)x3,3804681bp	是			
dup(10)(q11.21q21.1) 7.17Mb	arr10q11.22q11.23(49,479,768-52,321,378)x3,2,841,611bp	是			

3 讨论

3.1 NIPT 对五对常见染色体非整倍体筛查的准确性 我们验证了 463 例 NIPT 提示五对常见非整倍体高风险病例,得出 NIPT 对五对常见染色体非整倍体的筛查以 21 三体最为准确,阳性预测值为 81.6%(209/256),其次为 18 三体和性染色体,阳性预测值为 68.2%(58/85)和 41.2%(35/85),对 13 三体的筛查准确性最弱,阳性预测值仅为 8.1%(3/37)。可见 NIPT 对 13 三体的筛查效能低于 21 三体、18 三体和

性染色体非整倍体。关于 13 三体筛查准确性较低的原因,段红蕾等<sup>[5]</sup>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,导致测序时产生偏差,或由于 13 三体孕妇的胎盘较小,释放入母血的游离胎儿 DNA 数量相对较少造成。本研究统计的 13 三体的阳性预测值仅为 8.1%。13 三体引发胎儿严重的畸形,在 B 超检查中可见<sup>[6]</sup>,且 13 三体在人群中的发生率较低。因此,对于 NIPT 提示 13 三体高风险的病例,同时有 B

超指征建议行羊水穿刺验证。

3.2 NIPT 对 5 对常见染色体以外的其他非整倍体筛查的准确性 NIPT 对 5 对常见染色体以外的其他常染色体非整倍体的筛查准确性较差,其阳性预测值仅为 1.6%(1/61)。61 例高风险病例中,1 例验证为 9 号三体嵌合体,47,XX,+9[6]/46,XX[14],其余 60 例均为正常,可见假阳性居多。NIPT 对 CNV 的筛查准确性相对较高,阳性预测值为 54.5%(18/33),33 例筛查阳性病例中,18 例验证后完全符合,显示了 NIPT 由染色体水平向分子水平发展的检测能力。

3.3 NIPT 对染色体非整倍体筛查阴性的准确性与阳性预测值不同,NIPT 的阴性预测值较高。本研究验证的 243 例样本中,实际检出 21 三体 1 例,CNV 14 例。表明 NIPT 的假阴性率不高,其提示的阴性结果较可信。引起 NIPT 假阴性的原因主要有:(1)胎儿本身染色体异常,胎盘滋养层细胞正常。(2)胎儿游离 DNA 含量过低。由于胎儿游离 DNA 来源于胚胎滋养层细胞和限制性胎盘嵌合体的存在,使得 NIPT 的特异性无法达到 100%。NIPT 检测染色体非整倍体假阴性的发生率远低于假阳性,因而临床上对于 NIPT 提示阴性的结果往往是建议继续常规产检,而不是要求进一步的有创产前验证。

3.4 NIPT 技术的局限性 NIPT 对染色体非整倍体筛查的准确性受到多个因素的影响:(1)检测到的异常来源于母体而非胎儿。被检的胎儿游离 DNA 来源于胚胎滋养层脱落细胞,仅占母体外周血游离核苷酸的 3%~20%<sup>[7]</sup>。如果母体染色体数目异常特别是性染色体非整倍体,母体染色体片段缺失,或之前没有被发现的母体恶性肿瘤等疾病导致母血中相应染色体核苷酸片段的剂量发生变化,在无法有效分离两者的情况下,母体的染色体异常变动都可能被错误地认为是胎儿的染色体异常。(2)胎儿游离 DNA 浓度太低,也导致胎儿核酸成分占母血核酸总量的比值降低,致使检测到的结果多反映母体的染色体而非胎儿的实际情况。(3)限制性胎盘嵌合的影响。由于发育过程中胎儿滋养层细胞、胎儿细胞在有丝分裂过程中均有可能出现异常。如果滋养层细胞出现异常,而胎儿细胞正常,则检测结果将导致假阳性发生;如果滋养层细胞正常,而胎儿细胞异

常,则检测结果将导致假阴性的发生。(4)多胎妊娠。双胎妊娠过程中,一个胎儿消失或发生了胎盘镶嵌的情况,导致一部分胎盘细胞出现异常影响了检测的结果。NIPT 实际检测的是胎盘 DNA,不是胚胎本身细胞 DNA,且 NIPT 在无法有效区分胎儿游离 DNA 与母体 DNA 的情况下,依据 DNA 剂量变化推导出是否存在染色体非整倍体。因此其假阳性、假阴性的发生不仅在于技术本身,也与母体及胎盘、胎儿本身的染色体组成有关<sup>[8-9]</sup>,不能简单地根据 NIPT 筛查结果贸然决策。

NIPT 实现了由母体血样分析胎儿情况的无创检测,但是分散在各家检测机构模式下的 NIPT 检测结果阳性预测值较低,NIPT 的临床应用需加强规范和质控,所有 NIPT 提示结果需辅以后遗传咨询门诊,对其可能存在的假阳性及假阴性进行详细的告知。

#### 参 考 文 献

- [1] 张月萍,伍俊萍,李笑天,等.孕中期羊水细胞染色体核型分析及其异常核型发生率的比较[J].中华妇产科杂志,2011,46(9):644-648
- [2] 贾蓓,钟梅.高通量测序技术在无创产前检测中的应用[J].中国实用妇科与产科杂志,2015,31(9):807-810
- [3] 窦琳琳,郭远瑜,杨国绘.无创产前基因检测技术的临床应用效果分析[J].中国卫生检验杂志,2016,26(3):370-372
- [4] 刘奕平,张健,杜焕香.2888 例羊水产前诊断及无创基因检测(NIPT)的对照研究分析[J].中国优生与遗传杂志,2016,24(2):42-43
- [5] 段红蕾,胡娅莉.无创性产前检测临床应用相关问题[J].中华围产医学杂志,2015,18(10):791-793
- [6] Verweij EJ,de Boer MA,Oepkes D.Non-invasive prenatal testing for trisomy 13: more harm than good? [J].Ultrasound Obstet Gynecol,2014,44(1):112-114
- [7] 滕月,刘丹,黄谱,等.NIPT 应用于胎儿非整倍体畸形诊断的研究进展[J].中国妇幼保健研究,2016,27(2):259-261
- [8] Canick JA,Palomaki GE,Kloza EM,et al.The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies [J].Prenat Diagn,2013,33(7):667-674
- [9] Choi H,Lau TK,Jiang FM,et al.Fetal aneuploidy screening by maternal plasma DNA sequencing: 'false positive' due to confined placental mosaicism [J].Prenat Diagn,2013,33(2):198-200

(收稿日期 2017-05-21)

第一作者简介:朱赛娟(1982-),女,复旦大学附属妇产科医院集爱遗传与不育诊疗中心主管技师。主要研究方向:产前遗传学诊断。