

网络出版时间: 2018-9-25 14:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.029.html>

Ion torrent 半导体测序技术在胎儿非整倍体疾病筛查中的应用

杨媛媛^{1,2,3}, 何文竹¹, 袁静¹, 李莉¹, 尹宗智^{1,2,3}

摘要 选择行无创产前检测的孕妇共 6 064 例, 利用 Ion torrent 半导体测序技术进行孕妇外周血胎儿游离 DNA 检测, 并对阳性病例进行羊水染色体核型分析, 对所有研究病例随访新生儿结局。检测结果异常者共 49 例, 其中 21-三体综合征 27 例、18-三体综合征 18 例、13-三体综合征 4 例。其灵敏度和特异度分别为: 21-三体综合征 96.3%、95%, 18-三体综合征 100%、93.3%, 13-三体综合征 100%、100%。具有较高的灵敏度及特异度, 有较高的推广价值。同时, 该技术仍存在一定的假阳性及假阴性, 应进一步结合其他产前诊断方法做出更准确判断。

关键词 Ion torrent 半导体测序技术; 胎儿游离 DNA; 无创产前筛查

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)11-1795-03
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.029

无创 DNA 产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT) 是利用二代测序技术(next generation sequencing, NGS) 对母体血浆中游离胎儿 DNA 进行高通量测序, 可准确、安全地对胎儿染色体非整倍异常疾病进行筛查^[1-4]。Ion torrent 半导体测序技术是在二代 454 测序技术基础上, 在信号检测环节摒弃了焦磷酸偶联反应检测, 而采用先进的半导体 H 离子检测技术, 使其在保持了 454 的诸多优点(如波长长、应用范围广泛等) 基础上, 具有高通量、检测简单迅速、成本低的优势^[5-6], 该项技术的临床应用价值仍需验证和评估。该研究利用 Ion Torrent 半导体测序平台检测孕妇外周血浆中的游离 DNA, 行胎儿染色体非整倍体的无创产前检测, 以研究无创产前基因检测技术的敏感性、特异性, 从而探讨无

创 DNA 检测技术在产前诊断中的临床实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2015 年 1 月~2017 年 3 月在安徽医科大学第一附属医院接受遗传咨询并知情同意下行无创产前检测患者。

入组标准: ① 血清学筛查、影像学检查显示为常见染色体非整倍体临界风险(即 $1/1\ 000 \leq$ 唐氏综合征风险值 $< 1/270$, $1/1\ 000 \leq$ 18-三体综合征风险值 $< 1/350$) 的孕妇; ② 有介入性产前诊断禁忌证者(先兆流产、发热、有出血倾向、感染未愈等); ③ 就诊时, 患者为孕 20+6 周以上, 错过血清学筛查最佳时间, 或错过常规产前诊断时机; ④ 高龄孕妇(年龄 35 岁) 或常规血清学检查高风险孕妇, 在接受遗传咨询下要求无创产前检测。

排除标准: ① 多胞胎孕妇; ② 既往妊娠胎儿有染色体异常; ③ 夫妻双方有染色体疾病携带、遗传基因病家族史; ④ 孕妇接受过异体输血、移植手术或干细胞治疗, 或肿瘤患者等。

1.2 无创 DNA 检测方法 抽取孕妇外周血 5 ml 置于 EDTA 抗凝管内, 4℃ 保存, 在 4 h 内分离血浆提取胎儿游离 DNA, 利用 Ion Torrent 半导体测序平台测序, 通过生物信息分析得出胎儿患 21-、18-、13-三体综合征的风险率, 检测结果介于 $-3.0 \sim +3.0$ 为低风险, 对其胎儿出生后情况进行电话随访; 不在此范围内的为高风险, 孕妇需接受有创产前诊断进行确诊。

1.3 胎儿染色体核型分析 对检测结果高风险孕妇, 签署知情同意后采集羊水或者脐血, 进行 G 显带染色体核型分析。

1.4 随访 对所有纳入研究的孕妇所生胎儿进行出生后随访。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 计数资料采用率表示。

2 结果

2.1 无创 DNA 检测结果 本研究共纳入孕妇

2018-05-02 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2015A312)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

² 安徽医大学生殖健康与遗传安徽省重点实验室, 合肥 230022

³ 安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 杨媛媛, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: 2741957906@qq.com

6 064例,其中唐筛临界风险2 196例(36%),唐筛高风险且有创禁忌1 453例(24%),错过唐筛机会818例(14%),影像学检查异常123例(2%),高龄孕妇1 415例(23%),其他因素患者59例(1%)。所有行NIPT检测患者中,检测结果异常者49例,其中21-三体综合征27例,18-三体综合征18例,13-三体综合征4例。21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征的阳性率分别为4.45%、2.97%、0.66%。

2.2 胎儿染色体核型分析及随访结果 通过对49例NIPT检测提示异常的孕妇进行胎儿染色体核型分析,结果显示:27例NIPT检测提示21-三体综合征阳性者中有23例胎儿染色体核型分析为21-三体综合征阳性,1例为阴性,3例失访(2例死胎,1例因失联失访);18例NIPT检测提示18-三体综合征阳性者中有16例胎儿染色体核型分析为18-三体综合征阳性,1例为阴性,1例死胎失访;4例NIPT检测提示13-三体综合征阳性者中有3例胎儿染色体核型分析为13-三体综合征阳性,阴性者0例,1例因死胎失访。通过随访发现,NIPT检测提示无异常的6015例孕妇中,有1例婴儿经确诊为21-三体综合征患儿。通过上述数据可以得出NIPT检测的灵敏度和特异度,见表1。

表1 NIPT检测的灵敏度和特异度(%)

非整倍体疾病	灵敏度	特异度
21-三体综合征	96.3	95.0
18-三体综合征	100.0	93.3
13-三体综合征	100.0	100.0

3 讨论

临床上常见的染色体异常疾病包括21-三体综合征、18-三体综合征及13-三体综合征。此类患儿出生后,主要表现为智力低下、发育迟缓、多发畸形等,给家庭和社会带来沉重负担,目前尚无治愈方法。完善产前筛查和产前诊断方法,最大限度避免此类疾病患儿出生,是目前我国最迫切需要解决的问题。

诊断胎儿染色体疾病,国内常用的产前筛查方法为妊娠中期的血清学三联筛查,其准确率仅为65%,假阳性率高达8%^[4]。国内外常用的侵入性产前诊断方法为绒毛、羊膜腔穿刺、脐静脉穿刺行染色体核型分析。侵入性产前诊断技术被认为是产前诊断的“金标准”,但其操作复杂,技术要求高,实验周期较长,且行有创操作的孕妇流产、感染等损伤风

险增高^[5]。

Lo et al^[6]在1997年首次证实孕妇外周血液循环中有胎儿游离DNA(cell-free DNA, cf-DNA)存在。研究显示:妊娠4周开始孕妇的外周血中就能检测出胎儿游离DNA,以后随着孕周的增加cf-DNA浓度缓慢增加,cf-DNA的特点既显示其应用于无创性产前诊断的可行性,也表明NIPT检测对孕周和年龄的覆盖范围非常广泛。Chiu et al^[7]在2008年首次用大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS)技术平台检测胎儿非整倍体,使cf-DNA大规模用于临床产前诊断。Lo et al^[8]在2010年通过进一步研究表明,对孕妇外周血中的胎儿游离DNA进行全基因测序是诊断胎儿染色体疾病的一种可靠的非侵入性诊断方法。

NIPT通过对孕妇外周血中胎儿游离DNA进行直接分析,流程简便,避免了有创操作导致的流产、感染等风险,易被患者接受。本研究通过对我院2年多的研究数据统计显示,利用Ion torrent半导体测序检测技术检测21-三体综合征灵敏度为96.3%,特异度为95.0%;18-三体综合征检测灵敏度为100.0%,特异度为93.3%;13-三体综合征检测灵敏度为100.0%,特异度为100.0%,对3种最常见胎儿非整倍体疾病的检测灵敏度及特异度均较高。

由于无创产前检测原理是基于统计学方法进行风险评估而非直接量化计算,因此必然会存在一定概率的假阳性和假阴性病例,本研究中发现有2例假阳性(21-三体综合征及18-三体综合征各1例)和1例假阴性。限制性胎盘嵌合体、孕妇本人嵌合体、双胎之一胎死宫内或胚胎停育,或者孕妇本人患恶性肿瘤疾病、前期接受过异体输血、器官移植、干细胞治疗等均可影响NIPT阳性结果与染色体核型的一致^[12-14]。因此,针对NIPT检测阳性者,仍需建议患者进一步行胎儿染色体核型分析来确诊,同时产前筛查和产前诊断是体系化的医疗行为,应做好全面完善的检测前咨询、检测后咨询、高危人群的产前诊断及筛查人群的随访。

Ion torrent半导体测序技术相较于传统产前筛查及诊断技术具有高准确性、无创伤性、检测周期短、适用孕周及年龄范围大等优点。该方法目前已在临床逐渐广泛推广,由于其检测费用仍偏高,不能用于替代大规模人群筛查;而其诊断的灵敏度限制了NIPT目前仍不能替代传统的有创操作下胎儿染色体核型分析技术。

目前文献报道无创 DNA 检测技术仅限于 21-18-13 三体综合症的检测,我院目前引入无创 DNA 升级检测技术无创 DNA-Plus,检测范围由三大染色体疾病升级为 14 种,包括常见的微重复、微缺失疾病,相关数据在进一步收集及分析中,有望推进无创 DNA 检测技术更好地服务于临床工作。

参考文献

- [1] 李玉芝,任景慧,林琳华,等. 大规模并行基因组测序技术应用于无创产前诊断染色体非整倍体的研究 [J]. 华中科技大学学报:医学版,2012,41(4):475-80.
- [2] Chiu R W, Chan K C, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 105(51):20458-63.
- [3] 夏开德, 吴忠琴. 无创 DNA 产前检测高风险的羊水细胞遗传学分析及临床意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 22(11): 41-4.
- [4] Song Y, Liu C, Qi H, et al. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):700-6.
- [5] Kim S, Jung H J, Han S H, et al. Comparison of two high-throughput semiconductor chip sequencing platforms in noninvasive prenatal testing for Down syndrome in early pregnancy [J]. *BMC Medical Genomics*, 2016, 9:22.
- [6] Dheedene A, Sante T, De Smet M, et al. Implementation of non-invasive prenatal testing by semiconductor sequencing in a genetic laboratory [J]. *Prenatal Diagnosis*, 2016, (36):699-707.
- [7] 黄赛琼,宋亦军,刘俊涛. 胎儿染色体非整倍体产前筛查进展 [J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(9):769-75.
- [8] Lo Y M, Tein M S, Lau T K, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 6(4):768-75.
- [9] Lo Y M, Corbett A N, Chamberla P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-7.
- [10] Chiu R W, Chan K C, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(51):20458-63.
- [11] Lo Y M, Chan K C, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(61):61-91.
- [12] Cabick J A, Kloza E M, Lambert-Messerlian G M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32:730-4.
- [13] 王兰玲,陶华娟,王执勇,等. 346 例孕妇无创 DNA 产前检测结果分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(6):62.
- [14] Mazloom A R, Dzakula Z, Oeth P, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33:591-7.

Ion torrent semiconductor sequencing technology in the application of fetal prenatal screening of aneuploidy disease

Yang Yuanyuan^{1,2,3}, He Wenzhu¹, Yuan Jing¹, et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Province Key Laboratory of Reproductive Health and Genetics, Hefei 230022; ³Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Biopreservation and Artificial Organs, Hefei 230022)

Abstract A total of 6 064 pregnant women who performed non-invasive prenatal testing were selected. The cell free fetal DNA in maternal blood was tested by Ion torrent semiconductor sequencing. Amniocenteses were taken in patients with positive results, and for all patients the follow-up visits were carried out. 49 patients were found with positive results by Ion torrent semiconductor sequencing. After checked by amniocentesis and follow-up visit, the sensitivity and specificity of this technology for trisomy 21, 18 and 13 were 96.3%/95%, 100%/93.3%, 100%/100%, respectively. Using Ion torrent semiconductor sequencing to detect cell-free fetal DNA applied to prenatal aneuploidy screening as noninvasive has high sensitivity and specificity. However, there are still some false positives and false negatives in this technique, which should be combined with other prenatal diagnostic methods to make more accurate judgments.

Key words Ion torrent semiconductor sequencing; cell-free fetal DNA; noninvasive prenatal screening