DOI:10.16016/j.1000-5404.201506018

胎儿染色体非整倍体无创基因检测试剂盒的临床验证

付有晴[1],娄季武[2],赵 颖[2],蔡婉芳[2],颜妙丽[3],瞿京辉[3],徐婉芳[2],何 怡[2],林洋洋[2],叶苑华[2],周光纪[2],刘彦慧[2] [523000 广东 东莞,广东医学院医学检验系[1];523000 广东 东莞,广东省东莞市妇幼保健院产前诊断中心[2];518000 广东 深圳,华大基因生物科技(深圳)有限公司[3]]

[摘要] **目的** 验证胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)基因检测试剂盒(联合探针锚定连接测序法)在临床检测上的准确性和有效性。**方法** 选择广东省东莞市妇幼保健院的孕妇外周血样本,采用胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)基因检测试剂盒通过联合探针锚定连接测序法检测,并将结果与临床诊断金标准染色体核型分析结果或出生随访结果作对比。对灵敏度、特异性、总符合率和一致性系数 Kappa 值进行评价,以验证该试剂盒在临床检测上的准确性和有效性。**结果** 共完成有效样本 389 例,测序法检出 T21 阳性 6 例,T18 和 T13 均未检出阳性,与染色体核型分析结果相符,检测为阴性共 383 例,经电话随访至出生未发现非整倍体胎儿。统计分析结果显示,测序法与核型分析法总符合率为 100%,Kappa=1(≥0.8),其中检测 T21 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值均为 100%;检测 T18 和 T13 的特异性、阴性预测值均为 100%。**结论** 采用试剂盒通过联合探针锚定连接测序法检测 T21、T18、T13 的结果准确度高且方法安全,可以在临床上推广使用。

[关键词] 试剂盒;非整倍体;联合探针锚定连接测序法;胎儿游离 DNA;产前诊断
[中图法分类号] R714.55 [文献标志码] A

Clinical validation of noninvasive genetic testing kit of fetal chromosomal aneuploidy

Fu Youqing[1], Lou Jiwu[2], Zhao Ying[2], Cai Wanfang[2], Yan Miaoli[3], Qu Jinghui[3], Xu Wanfang[2], He Yi[2], Lin Yangyang[2], Ye Wanhua[2], Zhou Guangji[2], Liu Yanhui[2] ([1]Faculty of Medical Laboratory Sciences, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong Province, 523000; [2]Center of Prenatal Diagnosis, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan, Guangdong Province, 523000; [3]Biological Technology of BGI, Shenzhen, Guangdong Province, 518000, China)

[**Abstract**] **Objective** To verify the accuracy and effectiveness of a genetic detection kit for noninvasive fetal trisomy (T21, T18 and T13, based on combinatorial probe-anchor ligation sequencing, a product of BGI Biotechnology Limited Co.) in clinical practice. **Methods** Pregnant women who underwent prenatal diagnosis in our hospital were recruited in this study. Maternal peripheral blood samples were collected from each participant, and then processed in accordance with the kit instructions followed by combinatorial probe-anchor ligation sequencing. The results were compared with the results from prenatal karyotyping confirmation and baby born. The sensitivity, specificity, overall compliance rate and consistency coefficient Kappa values were evaluated to verify the accuracy and validity of the kit in the clinical testing. **Results** A total of 389 valid samples was tested using this genetic testing kit. Six pregnant women were found carrying trisomy 21 fetuses by sequencing, and none of them carrying trisomy 18 or 13 fetus, which consistent with the results of karyotyping. The other 383 women were negative, which was further validated by

[基金项目] 东莞市医学重点资助项目(2013108101021);广东省省级科技计划项目(2013B022000003)
[通信作者] 刘彦慧,E-mail:liuliang71215@163.com
周光纪,E-mail:50059583@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.011.html(2015-11-24)

telephone follow-up after baby born. Statistical analysis showed that the total coincidence rate of our sequencing and karyotyping was 100% and the Kappa = 1 (≥0.8), indicating that the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of trisomy 21 were 100%, and the specificity, negative predictive value of trisomy 18 and trisomy 13 were 100%. **Conclusion** This genetic detection kit for noninvasive fetal trisomy is of high accuracy and security, and should be worth of extensive application in clinic.

[**Key words**] testing kits; aneuploidy; combinatorial probe anchor attachment sequencing; cell free DNA; prenatal diagnosis

Supported by the Key Project of Medical Research of Dongguan (2013108101021) and the Project of Science and Technology Plan of Guangdong Province (2013B022000003). Corresponding author: Liu Yanhui, E-mail: liuliang71215@163.com; Zhou Guangji, E-mail:50059583@qq.com

染色体非整倍体胎儿发生率高,对人类危害大,是我国长期重点防治的先天缺陷之一[1-2]。由于无有效治疗措施,通过产前诊断来阻止患儿出生是目前公认有效的方法。但目前的产前诊断是通过羊膜腔穿刺等创伤性技术实现的,存在流产等风险[3-6]。通过高通量基因测序技术对母体血中胎儿游离 DNA 进行大规模 DNA 序列分析,可实现对胎儿无创伤性的染色体检测。2011 年,该技术已成为广东省临床服务的试行项目,并于 2013 年经广东省卫生厅批复(粤卫函[2013]53 号)正式在临床上推广应用。由于该技术的优越性,备受妇产科医生和孕产妇的青睐。为进一步加强该技术在临床上的应用管理,2014 年 2 月国家食品药品监督管理总局与国家卫计委办公厅紧急叫停基因测序相关产品和技术在临床医学上的使用,并启动全国多中心的大样本临床验证工作。根据课题组安排,本研究作为东莞地区独立研究中心收集样本,采用由深圳华大基因提供的胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(联合探针锚定连接测序法)进行临床验证,评估试剂盒检测的有效性及可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究的样本包括:前瞻性样本,即《产前诊断技术管理办法》中规定的具有细胞遗传学产前诊断指征的孕妇[7],妊娠 12 周以上;既往样本,即样本库中已有核型分析结果或出生随访结果的高危孕妇血浆样本。排除标准:孕妇自身为染色体异常携带者;有双胎或者多胎的孕妇;孕妇接受过移植手术、干细胞治疗、孕妇在 4 周之内接受过引入外源 DNA 的免疫治疗及在 1 年之内输注过异体血制品者。剔除标准:标本收集或保存不当不能进行检测的样本;数据记录不规范的样本;无临床跟踪结果的样本。

1.2 主要试剂和设备

胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(联合探针锚定连接测序法),包括专用试管和人外周血基因组 DNA 提取纯化试剂盒(磁珠法)等,由华大基因生物科技(深圳)有限公司提供;羊水细胞培养基,由广州达晖生物技术有限公司提供。LongGene PCR 仪;基因测序仪(BGISEQ-1000)。

1.3 孕妇外周血采集与处理

1.3.1 前瞻性样本 患者签署知情同意书后,在羊膜腔穿刺之前无菌抽取孕妇外周静脉血 5 mL,EDTA 抗凝,轻微颠倒采血管 4 次并及时将采血管放入 4 ℃冰箱中暂存,样本于 8 h 内在 2~8 ℃条件下 1 600 × *g* 离心 10 min,在冰盒上将上清液分装到多个 2.0 mL 离心管中;分离得到的上清液在 2~8 ℃条件下 16 000 × *g* 再次离心 10 min,在冰盒上将所得上清液转入新的 2.0 mL 离心管中,每个离心管转入 600 μL 血浆,所得上清液即为血浆样本,分离后的血浆样本保存于 -80 ℃条件下,并在 60 d 内进行试验。

1.3.2 既往样本 在样本库中已有染色体核型分析结果或出生随访结果的高危孕妇血浆样本;血浆样本使用普通 EDTA 抗凝管采集,按照要求进行血浆分离,分离后的血浆样本保存于 -80 ℃条件下不大于 2 年。

1.4 无创性非整倍体检测方法

使用人外周血基因组 DNA 提取纯化试剂盒(磁珠法)提取血浆游离 DNA,进行末端修复后,在 DNA 片段的末端加上特定的接头,使用 LongGene PCR 仪扩增两端带有接头的 DNA 片段,进行环化反应后最终获得对应样本的 DNA 文库,将所得样本的 DNA 文库进行质量检测后,在基因测序仪(BGISEQ-1000)上进行测序,将测序数据比对到人参考基因组(NCBI build36),统计 21、18、13 号染色体的有效数据量用于胎儿染色体非整倍体疾病 21-三体综合征、18-三体综合征和 13-三体综合征的判断。

1.5 胎儿染色体核型分析

常规采集孕妇羊水 20 mL,通过细胞培养行 G 显

带染色体核型分析,并按照人类细胞遗传学国际命名体制标准进行核型分析诊断。

1.6 随访方法

前瞻性病例在预产期后第 56 天开始电话出生随访,对既往病例进行电话随访,具体内容包括:婴儿出生体质量、妊娠结局、体检结果、新生儿疾病筛查结果等。

1.7 数据统计和分析

对收集的孕妇外周血标本进行随机排列并编号,采用试剂盒检测后再揭盲,检测结果与染色体核型分析结果对比。收集数据录入 Excel 2003,采用 SPSS 13.0 统计软件进行一致性 Kappa 检验,评价试剂盒的灵敏性、特异性、总符合率和一致性。

2 结果

2.1 研究病例

共收集东莞市妇幼保健院孕妇样本 391 例,剔除 2 例(1 例无核型报告,无临床跟踪结果;1 例样本保存不当,经过建库 QC 检测不合格)。有效样本 389 例(已达到东莞地区要求的样本量),其中前瞻性样本 133 例,为 2014 年 2 - 5 月期间具有产前诊断指征的孕妇,既往样本 256 例。

2.2 试剂盒检测结果

389 例孕妇均成功通过胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)基因检测试剂盒(联合探针锚定连接测序法)检测,通过测序及比对分析,包括阳性检测结果 6 例,均为 T21 高风险,异常风险率达 1.54%;阴性检测结果 383 例(98.46%)。

2.3 试剂盒检测结果与染色体核型分析结果比较

389 份临床样本均成功进行了羊水穿刺染色体检查,检出 T21 阳性 6 例,核型为 47,XN, +21,而 T18 和 T13 均未检出阳性。对比结果分析显示,经试剂盒检测 T21 的灵敏度、特异性、总符合率均为 100%(>98%),Kappa = 1(≥0.8);检测 T18 及 T13 的特异性和总符合率均为 100%(>98%),由于无 T18 及 T13 阳性,故不统计 T18、T13 的灵敏度和 Kappa 值。

2.4 出生后随访结果

在 389 例孕妇中,检测为阴性共 383 例,经电话随访至出生未发现非整倍体胎儿。

3 讨论

目前,对于大多数出生缺陷尚无有效的治疗方法,及时、准确的产前诊断是唯一有效预防畸形儿出生的技术手段。传统的超声筛查和各种孕妇血清生化指标分析主要是检测 T21 和一定范围的 T18,由于是通过检测与染色体非整倍体的相关因素来评估胎儿染色体的风险值,具有较高的假阳性率。已报道的检出率仅 75% ~96%,而假阳性率高达 5% ~10%[8-18],且受孕周影响较大。此外,对于筛查阳性的病例,需行绒毛膜或羊膜腔穿刺等有创性检查进行最终确诊,可能给孕妇和胎儿造成不可逆的伤害。因此,急需一种更安全、准确、快捷的检测方法来满足目前临床的这种迫切需求。Lo 等[19]首次发现母体外周血存在胎儿游离 DNA 片段,为无创产前基因检测开辟了道路。

无创产前基因检测相对于传统的超声筛查和各种孕妇血清生化指标分析,检出率高且假阳性率更低。2015 年由华大基因主导的对 146 958 例样本基于大规模并行测序的无创产前基因检测结果显示,对 T21、T18、T13 检测的灵敏度分别为 99.1%、98.2%、100%;特异性分别为 99.95%、99.95%、99.96%。T21 的假阳性率为 0.05%,阳性预测值为 92.19%;T18 的假阳性率为 0.05%,阳性预测值为 76.6%;T13 的假阳性率为 0.04%,阳性预测值为 32.84%[20]。由于该技术具有对胎儿无创伤、敏感性和特异性高等优点,是一种高准确性的胎儿染色体筛查技术,备受医疗界和广大孕产妇的关注,发展较快。但随之而来的问题也凸显出来:测序策略多,包括鸟枪法测序、靶向大规模并行测序等;设备类型多,包括 Illumina 高通量测序平台、Life 公司的 Ion Torrent 测序平台以及华大基因的 BGISEQ 测序平台等;每种技术的适应证不一致,使遗传咨询复杂化;试剂耗材各异,不同公司推出的技术所使用的试剂耗材各异;其他包括由于技术和市场竞争等出现的一系列相关问题。由于这些问题已使临床上发生一些医疗纠纷,提示我们必须进行质量控制和加强管理,以促进该技术的健康发展。为此,2014 年 2 月国家食品药品监督管理总局与国家卫计委办公厅紧急叫停基因测序相关产品和技术在临床医学上的使用,要求对技术进行规范审批。

本研究采用胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)基因检测试剂盒,利用联合探针锚定连接测序法通过对血浆中游离 DNA 进行末端修复、接头连接、PCR 反应、环化反应后进行 DNA 测序,将测序数据与人类参考基因组进行比对。共检测有效样本 389 例,剔除样本 2 例(1 例因无核型报告及临床跟踪结果;1 例因样本保存不当,建库 QC 检测不合格)。成功检测出 6 例染色体非整倍体异常,均为 T21 高风险,异常风险率为 1.54%,最后均经过金标准核型分析确诊为 T21,与核型结果有较好的一致性;检测结果阴性者 383 例,经电话随访至出生均未发现非整倍体患儿。本研究所采用

的试剂盒对 T21 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值均为 100%;对 T18 及 T13 的特异性、阴性预测值均为 100%;检测结果具有较高的准确性,可在临床推广应用。由于本研究临床样本检测中无 T18 及 T13 阳性者,因此对 T18、T13 的检测还需要更多的临床样本进行进一步的验证。

综上所述,无创产前基因检测技术在非整倍体筛查上具有其他筛查技术无可比拟的优越性,虽然该技术的大规模推广还受制于价格限制,但随着高通量测序的不断发展,其作为普通的筛查技术在临床应用只是时间问题。

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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2011.09.002

[2] Nicopoullos J D, Gilling-Smith C, Almeida P A, *et al*. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? [J]. Hum Reprod, 2008, 23(2): 240 - 250. DOI: 10.1093/humrep/dem395

[3] 王斌, 陈英耀, 石琦, 等. 我国唐氏综合征的疾病经济负担研究[J]. 中国卫生经济, 2006, 25(3): 24 - 26. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0743.2006.03.008

[4] Williams E S, Cornforth M N, Goodwin E H, *et al*. CO-FISH, COD-FISH, ReD-FISH, SKY-FISH[J]. Methods Mol Biol, 2011, 735: 113 - 124. DOI: 10.1007/978-1-61779-092-8_11

[5] Leung T Y, Voqel I, Lau T K, *et al*. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2011, 38(3): 314 - 319. DOI: 10.1002/uog.8988

[6] Vermeesch J R, Fiegler H, de-Leeuw N, *et al*. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis [J]. Eur J Hum Genet, 2007, 15(11): 1105 - 1114.

[7] 中华人民共和国卫生部. 产前诊断技术管理办法[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(2): 68 - 77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-878X.2003.02.001

[8] ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities [J]. Obstet Gynecol, 2007, 109(1): 217 - 227.

[9] Driscoll D A, Gross S J, Professional Practice Guidelines Committee. Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects[J]. Genet Med, 2009, 11(11): 818 - 821. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181bb267b

[10] Benn P A, Fang M, Egan J F, *et al*. Incorporation of inhibin-A in second-trimester screening for Down syndrome[J]. Obstet Gynecol, 2003, 101(3): 451 - 454.

[11] Malone F D, Canick J A, Ball R H, *et al*. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome [J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 2001 - 2011.

[12] Nicolaides K H. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities[J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 191(1): 45 - 67.

[13] Platt L D, Greene N, Johnson A, *et al*. Sequential pathways of testing after first-trimester screening for trisomy 21[J]. Obstet Gynecol, 2004, 104(4): 661-666. DOI: 10.1097/01.AOG.0000153257.08966.f9

[14] Spencer K, Spencer C E, Power M, *et al*. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years prospective experience[J]. BJOG, 2003, 110(3): 281 - 286.

[15] Wald N J, Rodeck C, Hackshaw A K, *et al*. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS)[J]. J Med Screen, 2003, 10(2): 56 - 104.

[16] Wald N J, Watt H C, Hackshaw A K. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters[J]. N Engl J Med, 1999, 341(7): 461 - 467. DOI: 10.1056/NEJM199908123410701

[17] Wapner R, Thom E, Simpson J L, *et al*. First-trimester screening for trisomies 21 and 18[J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1405 - 1413. DOI: 10.1056/NEJMoa025273

[18] Wright D, Bradbury I, Benn P, *et al*. Contingent screening for Down syndrome is an efficient alternative to non-disclosure sequential screening[J]. Prenat Diagn, 2004, 24(10): 762 - 766. DOI: 10.1002/pd.974

[19] Lo Y M, Chiu R W. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(1): 71 - 77. DOI: 10.1038/nrg1982

[20] 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.

(**收稿**: 2015-06-04;**修回**: 2015-06-25)

(编辑 汪勤俭)