

• 综 述 •

唐氏综合征产前筛查及诊断的研究进展*

陈 瑶 综述, 张 波[△] 审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学专科中心, 重庆 400038)

关键词: 唐氏综合症; 产前筛查; 产前诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0835-03

唐氏综合征(Down's syndrome, DS) 又称 21-三体综合征或先天愚型, 是最为常见的由常染色体畸变所导致中至重度智力障碍的出生缺陷类疾病。DS 由英国 Lang Down 于 1886 年首先作了描述, 在 1959 年由 Lejune 证明该病是由于多出一条 21 号染色体所致。在我国其发生率占出生人数的 1/600~1/800, 占受孕人数的 1/150。目前, DS 尚无有效的治疗手段, 只能通过 DS 患儿的产前筛查和诊断, 杜绝该类患者的出生。因此, DS 的产前筛查对降低该病发生率具有非常重要的意义^[1]。临床用于 DS 产前筛查的筛查指标越来越多, 组合筛查方案不断更新, 本文就 DS 的产前筛查及诊断进展作一综述。

1 产前筛查

1.1 孕妇年龄的筛查 DS 的发病率与孕妇的年龄呈正相关, 年龄在 35 岁以上的孕妇被认为是妊娠 DS 患儿风险最大的人群。美国于 70 年代开始对年龄在 35 岁以上的孕妇进行产前诊断, 结果仅检出了 20%~30% 的 DS 妊娠。显然仅以年龄作为筛查指标, 虽然在 35 岁以上的孕妇中检出 DS 的概率可达 100%, 但事实上, 低龄孕妇也有可能生出 DS 患儿且其占分娩孕妇总数的绝大部分。因此, 仅在 35 岁以上孕妇中进行产前诊断, 仍然会有近 70% 的唐氏妊娠孕妇被漏诊^[2]。所以现在已不单独使用孕妇年龄筛查法, 而是将其作为综合筛查方案中的一项指标来提高筛查的检出效率。

1.2 超声筛查 1985 年, Benacerraf 和 Frigoletto^[3] 等首先报道, 妊娠中期的 21-三体综合征患儿超声检查显示, 患儿颈后皮肤及软组织增厚。这是最早用图像确认染色体病的开始, 随后 21-三体综合征胎儿的超声特征逐渐被描述。目前, 常用的超声筛查标志主要有以下几种。

1.2.1 胎儿颈部透明层厚度(NT) NT 是覆盖胎儿颈部脊柱软组织和皮肤之间的半透明软组织的最大厚度, 是目前最常见且最有效的一项超声筛查指标^[4]。目前认为, 妊娠 10~14 周时, 如超声显示胎儿颈部透明带厚度超过 3 mm 则被划为 DS 高危妊娠。利用这个方法可以在早孕时测到 84% 的 DS 患儿。

1.2.2 胎儿股骨长度与肱骨长度 身体短小是 DS 另一被广泛认识的特征, 胎儿长骨的测量对于产前超声诊断具有重要的临床意义。在孕早期由超声波检查对辨别骨骼发育不良并不敏感, 诊断率低, 所以长骨的测量适用于孕中期进行。股骨短小在 21-三体综合征胎儿中的发生率为 45%, 肱骨短小在 21-三体综合征胎儿中平均发生率为 41%。当肱骨长度的测量值与预期值之比为 0.9 时, 可能具有 21-三体综合征的危险, 类同于 35 岁高龄孕妇的危险性。对这些孕妇应进行染色体

分析, 做进一步确诊。

1.2.3 胎儿鼻骨(NB)发育不良 在胎儿的各种器官中, 鼻子是最早形成的, Down 早在 1867 年就报道 DS 患儿的鼻发育小。Odibo 等^[5] 认为, DS 胎儿与正常胎儿之间鼻骨缺失的发生率存在极其明显的差别, DS 胎儿鼻骨缺失发生率为 73%, 正常胎儿鼻骨缺失发生率为 0.5%。NB 与 NT 联合使用, DS 妊娠检出率可提高至 93% (假阳性率为 5%)。

1.3 胎儿母体血清学的筛查 母体血清学的筛查是对怀孕 14~21 周(孕早期和孕中期)的孕妇外周血血清中某些特异生化指标进行定量检测, 结合孕妇的年龄、孕周等参数, 运用筛查软件计算出 DS 妊娠发生的概率值, 以评估胎儿患病风险。目前, 常见的孕妇血清标志物主要包括: 甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、游离雌三醇(uE3)、妊娠相关血浆蛋白 A(PAPP-A)、妊娠抑制素-A(inhibin A)、CA-125 和 SP-1 等标记物。

1.3.1 甲胎蛋白(AFP) AFP 是最早用于 DS 筛查的血清标志物, 主要来源于肝脏和卵黄囊, 由胎肝细胞合成, 通过胎儿泌尿系统排泄到羊水中。1984 年, Merkatz 等^[6] 报道妊娠 DS 胎儿的孕妇, 母体血清 AFP 水平比正常妊娠明显降低。目前, 多数学者认为 AFP 为妊娠中期 DS 筛查的有效标志物。有研究表明, 根据 N-连接寡糖的不同, AFP 可分为多种变异体, 其中以小扁豆凝集素(LCA) 最常见, 根据亲和力可将 LCA 分为三种(LCA-1、LCA-2、LCA-3)。而不同的甲胎蛋白变异体在胎儿中的含量随孕周的发展呈动态变化。最新研究表明, AFP-L3 与 DS 密切相关。DS 孕妇血清中, AFP-L3 的含量明显高于正常孕妇^[7]。

1.3.2 人绒毛膜促性腺激素(HCG) HCG 由胎盘合体滋养细胞产生, 在妊娠的前 8 周迅速增高, 此后逐渐下降, 约在 20 周时达到相对稳定。由于 DS 患儿较正常胎儿成熟晚, 妊娠进入中期时, HCG 及游离 β -HCG 水平仍处于高水平, 因此, HCG、尤其是游离 β -HCG 是目前早、中妊娠期产前筛查必选的临床筛查指标, 其最佳检测时间是孕 8~13 周。

1.3.3 游离雌三醇(uE3) uE3 是由胎儿肾上腺皮质、肝脏和胎盘合成, 以游离形式分泌进入母体和胎儿血液循环。uE3 主要用于妊娠中期 DS 的筛查。早期研究人员发现妊娠 DS 儿的母体血清游离 uE3 的水平比正常妊娠水平低 25%。近年来, uE3 颇具争论性, 但大多数学者对此筛查指标持肯定态度, 将其作为妊娠中期常用的联合筛查指标之一。

1.3.4 妊娠相关血浆蛋白 A(PAPP-A) PAPP-A 是由胎盘滋养层合体细胞分泌的一种巨球蛋白。PAPP-A 从妊娠 6 周

* 基金项目: 第三军医大学回国人员启动基金(SWH2011LC022); 重庆市攻关课题(CSTC2012gg-yyjs10046); 西南医院临床创新基金(SWH2012LC12)。 作者简介: 陈瑶, 女, 检验技师, 主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zbcq@yahoo.com.cn。

起明显升高,但在 DS 和 18 号染色体三体患儿的孕妇血中 PAPP-A 浓度却明显降低,原因可能是患儿染色体异常,导致胎盘合成的 PAPP-A 减少,导致妊娠早期孕妇血中 PAPP-A 低值。但妊娠中期,患儿母体血中的 PAPP-A 接近正常水平。因此,PAPP-A 只能作为早期妊娠而非中期妊娠的筛查指标^[8]。

1.3.5 妊娠抑制素-A 抑制素可分为抑制素 A 和抑制素 B 两种,抑制素 A 是一种由合体滋养层细胞产生的一种异二聚体糖蛋白。抑制素 A 在孕 10~12 周时升高并达到高峰,在孕 15-25 周后下降形成一个稳定平台,期间无孕期差别。在 DS 患儿母体血清中,抑制素 A 为正常对照的 1.62 MoM 值,孕中期抑制素 A 对 DS 的检出率可达 36%,假阳性率 5%,与现存的其他血清标志物相结合,可提高妊娠中期 DS 检出率的 6%~20%,但对孕早期筛查意义不大^[9]。

1.3.6 CA-125 和 SP-1 CA-125 是一种大分子量糖蛋白,CA-125 对于孕中期 DS 筛查的阳性率可达 22%,最佳测试时间在 14~21 周,多应用于多项标记物的联合筛查。CA-125 目前尚有较大争议性,因而该标志物在 DS 母体血清筛查中未被广泛应用。SP-1 是胎盘滋养层合体细胞产生的一种糖蛋白,是早期检测 DS 胎儿的又一个血清标志物。妊娠 6~12 周时,妊娠 DS 患儿的母体血 SP-1 值明显高于正常孕妇,SP-1 目前使用频率较低。

1.4 联合筛查方案 从上述 DS 筛查母体血清标志物的临床应用特征可以看出,在 DS 的产前筛查中,如单独使用某种血清标记筛查 DS 的检出阳性率低,假阳性高;如测试多项血清标记物会有助于提高检出率,但同时会增加测试费用,从而给筛查的普及增加难度。目前临床使用最为广泛的是两联筛查、三联筛查及四联筛查。

1.4.1 二联筛查 指以孕中期(14~20 周)血清 AFP 和 HCG 或游离 β -HCG (AFP+HCG/游离 β -HCG) 为标志物,结合孕妇年龄、孕周、体质量等参数计算胎儿罹患 DS 风险的联合筛查方案。其 DS 胎儿的检出率可达 65%,假阳性率为 5%。

1.4.2 三联筛查 孕中期组合 AFP、hCG / β -HCG、uE3 是最先被使用的组合方案。1994 年美国妇产科学院曾向全美孕妇正式推荐这一组合。目前在世界范围内被广泛应用。这一组合标记的胎儿 DS 综合征的阳性检出率约为 69%~77%,用于高龄孕妇的阳性检出率更高,主要筛查敏感期为孕 15~22 周。

1.4.3 四联筛查 指以孕中期(14~20 周)血清 AFP+HCG (或游离 β -HCG)+uE3+抑制素 A 为指标,结合专门的筛查软件和孕妇的体检信息计算胎儿罹患 DS 风险的联合筛查方案。其检出率比三种标记物的方法提高 8%,可达 80%,而假阳性率下降 30%~60%。随着组合项目的增多,检测成本也大大增加。目前在国内应用较少。

2 产前诊断

2.1 传统方法 传统产前诊断方法一般采用绒毛穿刺(孕 9~11 周)、羊膜腔穿刺(孕 18~20 周)或脐静脉穿刺(孕 20 周左右)等侵入式方法,通过采集绒毛、羊水或脐血的细胞进行培养,然后对分裂中期细胞的核型进行分析。这些方法虽然检测结果准确,被誉为目前产前诊断的“金标准”,但具有创伤性、检测费用高,有感染、出血甚至流产、死胎的可能,且检测耗时长,培养过程中易因污染或操作技能等原因导致失败而无法分析。长久以来,人们试图利用孕妇外周血中胎儿有核细胞进行无创性产前诊断,虽取得了一定进步,但由于母体外周血中胎儿有核细胞极少(1~2 个/毫升),其分离、富集方法繁琐复杂,价格

昂贵,因此其在临床的应用至今未能推广。

2.2 新进展

2.2.1 荧光原位杂交技术(FISH) 1974 年 Evans 首次将染色体显带技术和染色体原位杂交联合应用,提高了定位的准确性。20 世纪 70 年代后期人们开始探讨荧光标记的原位杂交,即 FISH 技术。FISH 是由细胞遗传学、分子遗传学及免疫学技术相结合而产生的一种新技术。该技术不仅可用于中期分裂象,还可在间期细胞显示杂交信号,现在 FISH 技术已经广泛应用于染色体数目的快速检测,尤其是针对难以培养成功的羊水细胞的检测,并且大大缩短了产前诊断的时间。在国外,FISH 技术已经广泛用于产前遗传性疾病的临床检测,成为一种常见的检测手段,在欧美等发达国家应用 FISH 产前诊断检测染色体异常已占 30%~40%。Christel 等^[10]采用 DSCR 探针,在 21q22 位点进行杂交,检测染色体的数目异常,实验结果不仅证实了 FISH 技术具有高度的靶向特异性和灵敏性。FISH 技术的应用不仅省去了细胞培养时间,缩短了诊断周期,又以快速、准确、灵敏度高、特异性强的突出特点弥补了长期以来仅依靠细胞遗传学产前诊断的不足和局限性,是一种应用前景非常好的产前诊断技术。

2.2.2 孕妇血浆中游离胎儿 DNA 及 RNA 的检测 1997 年有研究等发现母体外周血浆中存在胎儿游离 DNA,这一发现为无创性产前诊断和筛查带来了新希望。胎儿游离 DNA 与细胞 DNA 不同,是由较短的 DNA 片段组成,80%的 DNA 片段分子质量小于 193 bp^[11]。从理论上讲,怀孕的第 4 周起,就能检测到胎儿的 DNA,但实际上要到第 7 周才能准确的检测到,且浓度随孕龄的增加而升高,在怀孕的最后 8 周内达到峰值,且分娩后很快被清除,不会受前次妊娠的影响。研究表明,妊娠 21 三体胎儿的孕妇血浆中游离 DNA 含量增多,通过检测游离 DNA 即可对胎儿非整倍体疾病进行筛查,尤其在与其他血清生化标志物联合检测时的意义更大^[12-13]。Farina 等^[14]单独用孕妇血浆游离胎儿 DNA 进行 DS 筛查,检出率为 21%,与单独用 AFP 进行筛查的结果相似。若将游离胎儿 DNA 与目前临床常用血清标志物一起进行检测,结果发现,DS 胎儿检出率由 81%上升到 86%。但由于母体背景来源的 DNA 在血浆中占绝对优势,因此母体血浆中游离胎儿 DNA 在检测胎儿染色体拷贝数量具有挑战性,需要选择超灵敏的新一代分子生物学技术才可以对胎儿游离 DNA 的各种遗传状态做出准确判断。目前胎儿游离 DNA 的检测面临着一个难以解决的问题,即胎儿游离 DNA 的识别多数必须依靠 Y 染色体特异性序列作为胎儿 DNA 标志物。因此,这样就使 50%妊娠女胎的妇女不能有效地得到无创性产前诊断,故临床迫切需要一种非性别依赖的胎儿核酸标志物进行非创伤性的产前诊断^[15]。

胎儿游离 DNA 在母体血浆中水平低,而胎儿游离 RNA 能排除母体背景的干扰,检测方便。因此胎儿游离 RNA 更易于大规模、高通量检测等。胎盘特异基因表达不仅随孕龄呈现比较平稳的增长,还可较早地检测出,不受孕龄限制。因此认为,血浆胎盘基因 mRNA 作为无创性产前诊断的胎儿标志物具有可行性。由于胎盘基因来源于胎儿,因此多选取胎盘基因 RNA 作为候选基因。但对胎儿游离 RNA 的研究刚起步,尚需深入研究^[16]。

总之,目前国内外有很多 DS 的筛查方案,较常应用的是孕早期和孕中期联合筛查方案,但这些方法都存在检出率低,假阳性高的问题。建立高检出率、低侵入性、低成本的检测方法是 DS 产前筛查和诊断领域发展的方向之一。因此,寻找特

异、灵敏的 DS 产前筛查和诊断新标志物,建立简便、廉价、无创的产前筛查和诊断新技术、新方法已成为产前筛查领域的研究热点。

参考文献

[1] 杨华. 孕中期唐氏综合征产前筛查结果分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(17): 1886-1887.

[2] Rosen T, D'Alton ME. Down Syndrome Screening in the First and Second Trimesters: What Do the Data Show[J]. Semin Perinatol, 2005, 29(6): 367-375.

[3] Benacerraf BR, Frigoletto FD. Soft tissue nuchal fold in the second trimester fetus: standards for normal measurements compared with those in down syndrome[J]. Am J Obstet gynecol, 1987, 157: 1146-1149.

[4] Wald NJ, Bestwick JP, Huttly WJ. Effect of interrupting prenatal Down syndrome screening due to a large nuchal translucency[J]. Prenat Diagn. 2012, 32(7): 655-661.

[5] Odibo AO, Schoenborn JA, Haas K, et al. Does the combination of fronto-maxillary facial angle and nasal bone evaluation improve the detection of Down syndrome in the second trimester[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(10): 947-951.

[6] Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, et al. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities[J]. Am J Obstet Gynecol, 1984, 148(7): 886-894.

[7] 伍红, 张育森, 吴晓霞, 等. 甲胎蛋白异质体在唐氏综合征筛查中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(2): 56-57.

[8] Ghaffari SR, Tahmasebpour AR, Jamal A, et al. First-trimester screening for chromosomal abnormalities by integrated application of nuchal translucency, nasal bone, tricuspid regurgitation and ductus venosus flow combined with maternal serum free β -hCG and PAPP-A: a 5-year prospective study[J]. Ultrasound Obstet

Gynecol. 2012, 39(5): 528-534.

[9] Spencer K, Liao AW, Ong CY, et al. Maternal serum levels of dimeric inhibin A in pregnancies affected by trisomy 21 in the first trimester[J]. Prenat Design, 2001, 21(6): 441-444.

[10] Christel E-S, Stefan G, Inga N, et al. Conflicting results of prenatal FISH with different probes for Down's Syndrome critical regions associated with mosaicism for a de novo del(21)(q22) characterised by molecular karyotyping: Case report[J]. Molecular Cytogenetics, 2010, 3(16): 1-5.

[11] Davanos N, Spathas DH. Relative quantitation of cell-free fetal DNA in maternal plasma using autosomal DNA markers[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17/18): 1539-1543.

[12] Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, et al. Refined fluorescent STR quantification of cell-free fetal DNA during pregnancy in physiological and Down syndrome fetuses[J]. Prenat Diagn. 2008, 28(5): 425-433.

[13] Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, et al. Quantitation of DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe[J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12: 587-591.

[14] Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, et al. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy[J]. Clin Chem, 2003, 49(2): 239-242.

[15] Liao GJ, Chan KC, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA[J]. PLo S One. 2012(5): e38154.

[16] 徐爱群, 边旭明. 胎儿游离 RNA 在产前诊断中的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2010, 37(2): 84-89.

(收稿日期: 2012-12-09)

• 综 述 •

艰难梭菌相关性腹泻的实验室诊断

何 英 综述, 陆学东[△]审校
(深圳市福田区人民医院检验医学部, 广东深圳 518033)

关键词: 梭菌, 难辨; 腹泻; 综述
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 07. 039 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2013)07-0837-04

艰难梭菌(*C. Diff*)是导致抗菌药物相关性腹泻、医院性腹泻及假膜性肠炎的主要病原菌^[1-2]。近年来, *C. Diff* 在美国国家蔓延较快, 特别是高致病性菌株的出现, 临床症状严重程度、复发率及死亡率明显上升, 引起医学界越来越多的关注^[2], 对 *C. Diff* 感染的临床诊断和治疗也提出了新的挑战。国内对 *C. Diff* 感染研究不多, 开展 *C. Diff* 培养、检测的实验室也很少。本文就 *C. Diff* 感染致病机理及实验室诊断方法、临床应用优缺点进行了较为全面的综述。

1 感染致病机制

C. Diff 是具有芽孢结构的革兰阳性专性厌氧杆菌, 环境耐受性强, 只有具有新陈代谢活力的营养细胞形式才可能产生毒素^[1-2]。*C. Diff* 主要以孢子形式寄居于小肠, 在菌群失调

或免疫能力下降等条件下, 孢子萌发, 产生并释放毒素, 引起腹泻、结肠炎甚至致死性伪膜性肠炎, 统称为 *C. Diff* 感染(CDI), 由 *C. Diff* 引起的腹泻称为 *C. Diff* 相关性腹泻(CDAD)。

C. Diff 致病性与其产生的毒素 A、B 密切相关, 大多数产毒性 *C. Diff* 产生毒素 A 和毒素 B, 不产生毒素的 *C. Diff* 无致病性^[3]。较早研究认为, 单纯的毒素 B 无致病性, 只有在毒素 A 的共同作用下或者在肠黏膜已经受损的情况下, 毒素 B 才具有致病性。近年研究表明, 毒素 B 的毒性远强于毒素 A, 且具有独立致病性, 临床分离到的毒素 A 阴性但毒素 B 阳性的致病性 *C. Diff* 越来越多; 只产毒素 A 的 *C. Diff* 极少见, 其独立致病性尚未明确^[3-4]。