

• 论 著 •

甘肃地区孕妇孕中期干血斑产前筛查结果分析

刘芙蓉,郝胜菊[△],王 兴,郑 雷,闫有圣

(甘肃省妇幼保健院医学遗传学中心,兰州 730050)

摘要:目的 通过检测孕妇的干血斑甲胎蛋白(AFP DBS)、干血斑游离绒毛膜促性腺激素- β 亚基(free- β hCG DBS)浓度,对孕中期胎儿患唐氏综合征(DS)、18-三体综合征(ES)和神经管畸形(ONTD)的风险进行评估。方法 运用时间分辨荧光法定量测定孕妇干血斑中 AFP DBS、Free- β hCG DBS 浓度,采用 Life cycle 3.2 软件计算风险。结果 5 001 例孕妇中高龄 65 例,占总筛查人数的 1.3%,其中 DS、ES 和 ONTD 的阳性筛查率分别为 3.7%(185/5 001)、0.4%(20/5 001)和 4.3%(215/5 001)。确诊阳性病例 8 例,其中高龄 5 例。结论 孕妇孕中期干血斑 DS 产前筛查对实现质控统一管理,提高筛查覆盖度,降低出生缺陷有重要意义。

关键词:孕中期; 唐氏综合征; 干血斑产前筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3426-04

Analysis on results of middle pregnancy dried blood spots prenatal screening among pregnant women in Gansu area

LIU Furong, HAO Shengju[△], WANG Xing, ZHENG Lei, YAN Yousheng

(Medical Genetic Center, Gansu Provincial Maternity and Child Health Care Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the risk of Down's syndrome(DS), Edward's syndrome(ES) and open neural tube defect(ONTD) at the second-trimester by detecting the concentrations of AFP and free- β hCG in dried blood spots(DBS). **Methods** The concentrations of AFP and free- β hCG in DBS were quantitatively determined by using time-resolved fluorescence method. The risk was calculated by adopting the Life cycle 3.2 software. **Results** Among 5 001 screened pregnant women, 65 cases were advanced age pregnant women, accounting for 1.3%. The positive screening rates of DS, ES and ONTD were 3.7%(185/5 001), 0.4%(20/5 001) and 4.3%(215/5 001) respectively. Eight cases were confirmed positive, in which 5 cases were advanced age pregnancies. **Conclusion** Second-trimester DBS for screening DS has an important significance in realizing the uniform management of quality control, increasing the screening coverage degree and reducing birth defects.

Key words: second-trimester; Down syndrome; dried blood spots prenatal screening

唐氏综合征(DS)产前筛查是采用简单、方便、易行、无创的检测方法,在广大孕妇人群中筛查出怀有某些先天缺陷的高危胎儿的高危个体。DS是先天缺陷的主要疾病之一,目前尚无有效治疗手段,唯一可行的干预措施是通过产前筛查和产前诊断尽早发现,及时终止妊娠,有效预防和减少DS患儿出生,降低出生缺陷,提高人口素质。目前,我国DS产前筛查的主要模式为孕中期孕妇血清二联或三联筛查,但覆盖率不高,偏远贫困地区仍无法开展DS筛查。据统计,我国发达地区筛查率可达50%,筛查覆盖率全国平均仅为13%,明显落后发达国家^[1-2]。同时,血样转运困难,筛查中心分散,质控管理难度大、成本高。DS干血斑产前筛查技术由于其具有标本采集简单、转运成本低廉、标本稳定性增强、实验统一性提高、便于质控管理等优势,适合偏远不发达地区提高产筛覆盖率。本研究通过对2015年1~6月甘肃地区孕妇孕中期干血斑产前筛查的结果进行分析,阐明其在产前筛查中的优势及局限。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2015年1~6月甘肃省妇幼保健院产前诊断中心进行孕中期干血斑产前筛查的孕妇5 001例。孕妇知情同意并填写产前筛查申请单,孕周15~20周⁺,其中65例年龄大于35岁,平均年龄28.65岁。月经规律者根据末次月经推算孕周,月经不规律者以B超测得胎儿双顶径(BPD)推算孕周。

1.2 标本采集 制作滤纸干血片标本,参照2010年《新生儿

筛查技术规范》要求制作保存血膜,滤纸采用贵州里定生物科技有限公司生产的血标本采集卡,血斑制作采用可控式点血器法(DIFF-SAFE)^[3],制备直径大于10 mm的滤纸血斑3个,于室温下干燥后,密封于4℃冰箱中保存待检。

1.3 试剂与方法 仪器采用芬兰Wallac公司生产的DELFLA-1235型全自动时间分辨免疫荧光分析仪进行测定。检测试剂盒运用苏州新波生物技术有限公司生产的干血斑甲胎蛋白与游离人绒毛膜促性腺激素- β 亚基(AFP/Free- β -HCG DBS)双标试剂盒。

1.4 检测方法 用直径为3.2 mm的打孔器在血斑半径1/2处打下待检血斑1个于反应微孔中,其中将标准品和质控品各2个(复孔)于相应反应微孔中,上机选择相应AFP/Free- β -HCG β DBS程序进行检测。

1.5 风险评估 采用PE公司提供的Life cycle3.2软件结合孕妇年龄、体质量、孕周、是否吸烟及相关病史等因素,将血斑测定值换算成中位数倍数(MOM值),计算胎儿患DS、18-三体综合征(ES)及神经管畸形(ONTD)的风险率。DS风险截断值为1/270;ES风险截断值为1/350,ONTD风险截断值为MOM $\geq$ 2.5。对筛查出的高危妊娠孕妇,在本人知情同意的情况下,建议接受羊膜腔穿刺,进行羊水细胞培养及染色体核型分析,对筛查对象追踪随访至胎儿出生。

2 结果

2.1 筛查结果 本中心共接收5 001例进行DS孕中期产前

筛查的干血斑,其中筛出 DS 高风险 185 例,ES 高风险 20 例,ONTD 高风险 215 例。其中年龄大于 35 岁的孕妇共 65 例,占筛查人群的 1.3%。DS 的初筛阳性率为 3.7%(185/5 001),ES 的初筛阳性率为 0.4%(20/5 001),ONTD 的初筛阳性率为 4.3%(215/5 001),总阳性筛查率为 8.4%(470/5 001)。见表 1。

表 1 各年龄组 DS 阳性筛查率

年龄(岁)	<i>n</i>	高风险病(<i>n</i>)	筛查阳性率(%)
<20	65	2	3.08
20~<25	838	42	5.01
25~<30	2 727	222	8.14
30~<35	1 221	132	10.81
35~40	135	15	11.11
>40	15	7	46.67

2.2 各孕周不同标记物的中位数浓度及 MOM 值 本研究中所有待检孕妇的孕周均介于 15~20 周⁺⁶,干血斑甲胎蛋白(AFP DBS)与干血斑游离绒毛膜促性腺激素-β 亚基(free-βhCG DBS)两种标记物在各孕周均有差异,其中 AFP DBS 随孕周的增加而逐渐增高,妊娠 15 周的中位数浓度为 24.16 mU/L,妊娠 20 周升高至 43.25 mU/L;free-βhCG DBS 随孕周的增加中位数浓度逐渐降低,妊娠 15 周的中位数浓度为 36.53 ng/mL,妊娠 20 周下降至 15.75 ng/mL。见表 2。

表 2 各孕周不同标记物的中位数浓度及 MOM 值

孕周(周)	<i>n</i>	AFP DBS 的中位数浓度(mU/L)	AFP DBS 的 MOM 值	free-βhCG 的中位数浓度(ng/mL)	free-βhCG 的 MOM 值
15	336	24.16	1.55	36.53	1.0
16	1 324	22.27	1.31	31.85	1.16
17	1 303	24.57	1.24	23.82	1.06
18	1 030	27.70	1.17	18.47	0.96
19	546	29.32	1.16	15.54	0.93
20	462	43.25	1.46	15.75	1.03

2.3 阳性确诊病例结果分析 初筛阳性患者在本院产前诊断中心接受羊膜腔穿刺,进行羊水细胞培养及染色体核型分析,妊娠结局是确诊阳性患者 8 例,其中高龄 5 例,确诊 21-三体胎儿 5 例,18-三体胎儿 1 例,超雌胎儿 1 例,克氏综合征 1 例。筛查低风险孕妇中至今无 DS、ES 及 ONTD 患儿出生。其染色体核型分析结果见表 3。

表 3 染色体异常儿的筛查结果

编号	年龄	筛查孕周	产筛风险值	胎儿染色体核型
1	39	—	年龄高风险	21-三体
2	40	—	年龄高风险	21-三体
3	30	17 周 ⁺⁵	21-三体高风险 1/70	21-三体
4	37	—	年龄高风险	21-三体
5	32	18 周 ⁺¹	21-三体高风险 1/205	21-三体
6	28	16 周 ⁺⁴	18-三体高风险 1/140	18-三体

续表 3 染色体异常儿的筛查结果

编号	年龄	筛查孕周	产筛风险值	胎儿染色体核型
7	35	—	年龄高风险	超雌,47,XXX
8	36	—	年龄高风险	克氏综合征,47,XXY

注:—表示无数据。

3 讨论

3.1 实施产前筛查在我国普及难度大,而以滤纸干血斑作为母血载体进行 DS 产前筛查经济简便^[4],成为目前的研究热点之一。干血斑 DS 产前筛查结果显示,生育患儿风险随年龄增长而增长。Wald 等^[5]报道,仅通过年龄对 DS 产前筛查检出率可达 30%。据文献统计,所有出生的 DS 患儿中 35 岁以前妇女娩出的占 30%,35 岁以后的妇女娩出 70%^[6]。Merkatz 等^[7]将血清甲胎蛋白(AFP)应用于 DS 产前筛查,结合年龄因素可将检出率提高 20%。将不同标志物的拟然比相乘,再乘以孕妇年龄特异性风险得到孕妇 DS 风险值,若评估风险等于或高于截断值 1/270,为筛查高风险,需行羊水穿刺;若风险介于 1/270~1/1 000,为临界风险,需行羊水穿刺或无创产前筛查;若风险低于 1/1 000,则为低风险,需后续观察,做好妊娠随访。

AFP 主要来源于胎儿肝脏和卵黄囊,由胎肝细胞合成,胎儿血中 AFP 通过被动传递方式进入母血和羊水。母血中 AFP 在妊娠 15 周开始上升,孕 32~34 周达到高峰。若胎儿神经管发育异常,致使更多 AFP 进入羊水,则 AFP 异常升高。DS 胎儿由于肝脏发育不成熟,AFP 合成减少,所以母血中含量相应下降。本研究将 AFP DBS 作为干血斑产前筛查的指标之一,其原理与血清学相同^[8]。

绒毛膜促性腺激素(hCG)由 α 和 β 两个亚基构成,检测 β 亚基可避免交叉反应,能更好地反映胎盘功能及胎儿状况。大约 1%的 β 亚基以游离形式存在。hCG 受精后进入母血并快速增殖至孕 8 周,随后浓度逐渐降低至孕 18~20 周并保持稳定。据报道,总 hCG 在产前筛查应用中检出率低于 free-βhCG^[9]。DS 患儿的成熟度较正常胎儿晚,虽然妊娠已进入中期,hCG 及 free-βhCG β 仍处于高浓度水平,同时胎盘滋养叶中的巨噬细胞分泌的水解酶将 hCG 裂解成 α、β 亚基,DS 患儿或胎盘恶性肿瘤母体的水解酶活性增加,使 free-βhCG β 浓度更高^[10]。本研究将 free-βhCG DBS 作为干血斑产前筛查的指标之一,其原理与血清学相同。

3.2 1963 年有研究者首次将干血斑法应用于新生儿先天性代谢性疾病的筛查,此后干血斑法由于其优势及可行性广泛应用于其他领域,如药物代谢、病毒快速诊断等大规模筛查,是一项应用较为成熟的方法^[11-13]。近年来,由于 PCR 等微量扩增及检测技术的进步,干血斑的应用更取得了长足进步。

干血斑 DS 产前筛查的优势如下:(1)标本采集简便。血斑法采用 DIFF-SAFE 将血斑均匀滴注至血片,自然晾干,采血量少,简化了血清学离心、血清分离等步骤,减少了血清处理过程中病毒感染传播的风险^[14]。据报道,人类免疫缺陷病毒(HIV)-1、HIV-2、丙型肝炎病毒等在血斑自然干燥过程中已丧失传染性,但某些高滴度病毒(如 HBV)即使在干血斑中也能存活 7 d^[15];(2)经济学优势。干血斑血液采集简便,转运仅需密封袋密闭或邮寄,降低了血清学方法冷链运输的费用,适于偏远地区普及筛查度;(3)干血斑有利于检测物质保存。如 AFP DBS 血斑可在 37 ℃ 密封保存 1 个月,4 ℃ 保存半年。

free- β hCG DBS 血斑可在 4℃ 保存 1 d, -20℃ 保存 131 年。但高温过高稳定性下降, 据报道若温度高于 30℃, 则 AFP DBS 的保存不超过 24 h。free- β hCG DBS 于 20℃ 可保存 87.3 h, 30℃ 以上保存不超过 6 h^[16-20]。

MOM 值是该指标实际测定的浓度值与同孕周健康人群中位数之比, 体现了测定值偏离正常值的程度和方向。若系统长期保持稳定, 中位数设置准确合理, MOM 值应趋于 1.0 左右波动, 假阳性率和检出率波动不大; 若系统发生调整, 中位数设置不准确, 则 MOM 值将逐渐偏离 1.0, 降低筛查效率。本研究中, MOM 的正常参考范围分别为 AFP DBS 介于 0.7~2.5 MOM, free- β hCG DBS 介于 0.25~2.5 MOM。当 AFP DBS ≥ 2.5 MOM 时, 筛查结果为 ONTD 高风险; 当 free- β hCG DBS ≥ 2.5 MOM 时, 筛查结果为 DS 高风险; 当 free- β hCG DBS < 0.25 时, 常导致 ES 高风险。表 2 中各孕周 free- β hCG DBS 的 MOM 值稳定在 1.0 左右波动, 而 AFP DBS 的 MOM 值较 1.0 偏大, 检查筛查过程, 彻底清洁打孔钳, 充分晾干后, 于血斑中心至边缘 1/2 处打孔, 消除新生儿 AFP 暂时性增高, 不同打孔部位血斑浓度差异等因素的影响。积累大量数据后, 调整各项指标 MOM 值, 建立甘肃地区正常孕妇干血斑中孕期浓度的平均水平, 合理修正中位数曲线标准, 优化实验流程, 提高检出率和筛查效率。同时, 绘制实验室室内质控, 每批实验 free- β hCG DBS 的变异系数 (CV) 值均低于 5%, AFP DBS 的 CV 值均低于 10%, 符合“新生儿筛查技术规范”中要求的 CV 值低于 10%, 证明实验稳定性强, free- β hCG DBS 指标的稳定性优于 AFP DBS。

3.3 目前我国城市居民产前筛查的覆盖率仅为 30%, 而中小城市及偏远地区未能实现 DS 产前筛查的普及。因此, 寻找一种方便快捷、切实可行的筛查方法, 对降低我国出生缺陷势在必行。本研究中干血斑 DS 产前筛查的总阳性筛查率为 8.4%, 假阳性率较高。经妊娠随访后, 确诊 8 例阳性, 其中 5 例为年龄高风险, 与高龄是 DS 发病的主要因素相吻合。同时, 筛查结果为高风险孕妇中确诊 21-三体胎儿 5 例, 18-三体胎儿 1 例, 超雌胎儿 1 例, 克氏综合征 1 例; 筛查低风险孕妇中至今无 DS、ES 及 ONTD 患儿出生。由于 Life Cycle 软件自带的中位数值来自于高加索人群干血斑浓度, 与本研究人群存在地域及人种等方面的差异, 且本研究的样本量不大, 可能产生 MOM 值偏移。据此, 在今后的研究中应扩大样本量, 获取大样本的本地中位数值, 使 MOM 值分布为中值和众数均接近 1 的单峰分布, 从而找出最佳中位数的拟合曲线, 建立更适合本地人群的风险截断值, 优化干血斑产前筛查体系, 加大产前筛查在我国的普及力度。

参考文献

- [1] Massé J, Summers A, Cherian G, et al. Transportation of maternal serum specimens for screening for chromosomal aneuploidies: effect of seasonal variations, distance, and freezing on the stability of the biological markers[J]. Clin Biochem, 2000, 33(4): 273-277.
- [2] De Souza E, Alberman E, Morris JK. Down's syndrome: screening and antenatal diagnosis regionally in England and Wales 1989-2008[J]. J Med Screen, 2010, 17(4): 170-175.
- [3] 成艳, 武雅俐, 刘郁明, 等. 产前筛查干血片三种采集方法检测结果的应用研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(9): 67.
- [4] Mizejewski GJ, Bellisario R, Beblowski DW, et al. Commercial radioimmunoassay kit for measurement of alpha-fetoprotein adapted for use with dried blood specimens from newborns[J]. Clin Chem, 1982, 28(5): 1207-1210.
- [5] Wald NJ, Denham JW, George L, et al. Inhibin-A in Down's syndrome pregnancies: revised estimate of standard deviation[J]. Prenat Diagn, 1997, 17(3): 285-290.
- [6] Newberger DS. Down syndrome: prenatal risk assessment and diagnosis[J]. Am Fam Physician, 2000, 62(4): 825-832.
- [7] 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.
- [8] 刘霞, 张莉, 周玉霞. 唐氏综合症产前筛查的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(6): 859-863.
- [9] Stevenson HP, Leslie H, Sheridan B. Serum free beta-human chorionic gonadotrophin concentrations increase in unseparated blood specimens [J]. Ann Clin Biochem, 1993, 30(1): 99-100.
- [10] George JK. HCG and the free P-subunit as screening tests for down syndrome[J]. Prenat Diagn, 1998, 18(2): 235-245.
- [11] Heam TL, Hannon WH. Interlaboratory surveys of the quantitation of thyroxine and thyrotropin in dried blood-spot specimens[J]. Clin Chem, 1982, 28(2): 2022-2025.
- [12] Hoffillan BR, Yu H, Diamandis EP. Assay of prostate-specific antigen from whole blood spotted on filter paper and application to prostate cancer screening [J]. Clin Chem, 1996, 42(4): 536-544.
- [13] Castro AC, Borges LG, Souza RS, et al. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008, 50(3): 151-156.
- [14] Hoffman BR, Yu H, Diamandis EP. Assay of prostate-specific antigen from whole blood spotted on filter paper and application to prostate cancer screening [J]. Clin Chem, 1996, 42(4): 536-544.
- [15] Castro AC, Borges LG, Souza RS, et al. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008, 50(3): 151-156.
- [16] Gerald JM, Ronald B, Diane WB, et al. Commercial Radioimmunoassay Kit for Measurement of Alpha-Fetoprotein Adapted for Use with Dried Blood Specimens from Newborns[J]. Clin Chem, 1982, 28(5): 1207-1210.
- [17] Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids Profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry[J]. Pediatr Res, 1995, 38(3): 324-331.
- [18] Wu JT, Knight JA. In-vitro stability of human alpha-fetoprotein[J]. Clin Chem, 1985, 31(10): 1692-1697.
- [19] Spencer K, Macri JN, Carpenter P, et al. (下转第 3431 页)