

## • 短篇论著 •

86 例无创 DNA 产前检测假阳性病例原因分析<sup>\*</sup>谢润桂, 何 怡<sup>△</sup>, 魏顺娣, 张晓燕

(东莞市妇幼保健院产前诊断中心, 广东东莞 523107)

**摘要:**目的 探讨无创 DNA 产前检测(NIPT)在诊断染色体异常中出现假阳性的原因。方法 选择 2016 年 10 月至 2018 年 7 月, 在东莞市妇幼保健院产前诊断中心做羊水核型分析和染色体微阵列分析技术(CMA)检测确定胎儿染色体正常而 NIPT 提示染色体异常的假阳性标本 86 例, 在胎儿出生后同时取胎盘组织和母血进行高通量 DNA 测序分析。结果 86 例 NIPT 假阳性结果中 64 例胎盘检测结果与 NIPT 结果相符, 母血结果正常, NIPT 假阳性来源于胎盘; 12 例母血检测结果与 NIPT 结果相符, 胎盘结果正常, NIPT 假阳性来源于母体; 10 例胎盘与母血结果均正常, NIPT 假阳性来源不明。NIPT 检测提示常染色体异常的病例中 3.2% NIPT 假阳性病例来源于母血, 而性染色体异常病例中 43.5% NIPT 假阳性病例来源于母血。结论 胎盘和母血中异常游离 DNA 释放入母血是 NIPT 假阳性的主要原因。对 NIPT 结果为性染色体异常病例, 应排除性染色体异常源自母血的可能性。NIPT 能够准确检测母血总游离 DNA 的剂量变化, 但无法分辨游离 DNA 剂量变化的来源。

**关键词:**无创 DNA 产前检测; 假阳性; 高通量测序

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.027

**文章编号:**1673-4130(2019)21-2671-03

**中图法分类号:**R714.15

**文献标识码:**B

胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测(NIPT)是利用大规模平行测序技术对母体外周血中的胎儿游离 DNA 片段(包含胎儿游离 DNA)进行深度测序, 并将结果进行生物信息分享, 可以从中获得胎儿的遗传信息<sup>[1]</sup>。目前 NIPT 已广泛用于产前筛查, 13-三体、18-三体和 21-三体灵敏度和特异度<sup>[2]</sup>的检测, 但是, 同任何筛查方法一样, 假阳性和假阴性时常发生。通过临床实践与案例研究发现 NIPT 结果与实际胎儿核型之间存在差异, 其发生率在 0.1%~0.3%。该现象的生物学原因主要包括限制性胎盘嵌合、双胎一胎凋亡、母亲染色体异常、DNA 拷贝数异常、母血中胎儿 DNA 含量低以及母亲罹患肿瘤等因素<sup>[3-5]</sup>。本文通过分析在东莞市妇幼保健院 NIPT 检测发现的 86 例 NIPT 假阳性病例, 在胎儿分娩后留取的胎盘组织及母亲外周血标本, 采用高通量测序方法进行验证, 探讨 NIPT 产生假阳性的原因, 以及相应的预防措施。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2016 年 10 月至 2018 年 7 月在东莞市妇幼保健院检测出现的 NIPT 阳性而羊水穿刺核型分析和 CMA 检测验证胎儿染色体正常的假阳性病例 86 例。在胎儿分娩后留取的胎盘组织及母亲外周血标本, 采用高通量测序方法进行验证。本研究经东莞市妇幼保健院伦理委员会批准, 所有孕妇签署

知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本采集方法** 样本采集与孕妇分娩后, 采集孕妇静脉血 7~10 mL, 使用 Cell-Free DNA BCT 管, 采血后颠倒混匀 8~10 次, 24 h 后进行血浆分离。同时进行胎盘组织采样, 每个胎盘选 6 个采样点, 在胎盘的胎儿面和母体面分别间隔一定位置表层获取 3 个黄豆大小(长: 0.5~1.0 cm, 宽: 0.5~1.0 cm, 深: 0.2~0.3 cm)的胎盘组织, 用少量生理盐水洗净母血, 分别按标注置于对应的 2 mL 无菌小型离心管中, 最后将标本以-20 ℃ 储存于实验室。

**1.2.2 高通量测序检测** 基因组 DNA 提取、测序文库构建和质量控制, 用试剂盒提取基因组 DNA, 测定基因组 DNA 浓度, 然后在-20 ℃ 保存。根据晶芯胎儿染色体非整倍体 T21、T18、T13 检测试剂盒的说明进行文库构建、质量控制和汇集。使用半导体测序仪用于 DNA 测序。测序读数被过滤并与人类参考基因组(HG19)比对。

**1.2.3 NIPT 假阳性评估方法** NIPT 检测提示染色体异常, 而胎儿染色体与羊水核型分析和 CMA 正常, 则判定为 NIPT 假阳性。本研究采用高通量测序法在胎儿出生后同时检测胎盘和母亲外周血中的染色体异常情况, 将检测结果与孕期检测的 NIPT 结果对比, 如果 NIPT 结果与胎盘测定结果一致, 则判定

\* 基金项目: 东莞市社会发展科技项目(2018507150071536)。

△ 通信作者, E-mail: 2378999149@qq.com。

本文引用格式: 谢润桂, 何怡, 魏顺娣, 等. 86 例无创 DNA 产前检测假阳性病例原因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21): 2671-2673.

NIPT 假阳性来源于胎盘细胞;如果 NIPT 结果与母血测定结果一致,则判定 NIPT 假阳性来源于母体细胞。如果两者检测结果正常,无法判定 NIPT 假阳性的来源,判定为未知来源。

## 2 结 果

经高通量测序法检测验证,在 86 例 NIPT 假阳性标本中 64 例胎盘检测结果与 NIPT 相符,母血结果正常,占 74.4%,其中检测结果为性染色异常 9 例,常染色体异常 55 例;12 例母血检测结果与 NIPT 结果相符,胎盘结果正常,占 14.0%,其中检测结果为性染色异常 10 例,常染色体异常 2 例;10 例胎盘与母血结果均正常,NIPT 假阳性来源不明,占 11.6%。在 64 例胎盘来源假阳性病例中有 47 例为限制性胎盘嵌合,占 73.4%。NIPT 检测提示常染色体异常的 63 例中 2 例证实假阳性来源于母血,占 3.2%,而性染色体异常 23 病例中 10 例假阳性病例来源于母血,占 43.5%。见表 1。

表 1 86 例 NIPT 假阳性原因验证结果

NIPT 异常类型	胎盘来源	母亲来源	未知来源	合计
性染色体异常( <i>n</i> )	9	10	4	23
常染色体异常( <i>n</i> )	55	2	6	63
染色体异常 [ <i>n</i> (%)]	64(74.4)	12(14.0)	10(11.6)	86(100.0)

## 3 讨 论

孕妇外周血胎儿游离 DNA(cffDNA)的 NIPT 是应用高通量基因测序等分子遗传技术检测孕期母体外周血中胎儿游离 DNA 片段,以评估胎儿常见染色体非整倍体异常风险<sup>[6]</sup>。母体外周血中 cffDNA 片段的浓度非常低(3%~6%)<sup>[7]</sup>。cffDNA 具有独特的生理性质:(1)孕妇血浆中的 cffDNA 随着孕周的增加而增加<sup>[8]</sup>;(2)cffDNA 均有小片段形式存在,片段长度大都小于 300 bp;(3)清除速度快,cffDNA 的半衰期为 16.3 min,胎盘娩出后的 2 h 内快速消除<sup>[9]</sup>。NIPT 检测母亲外周血中的片段长度为 75~250 bp 的 cffDNA,并将游离 DNA 数量定位到染色体相应的位置上,从而得到染色体不同位置 DNA 数量的比例关系,从而推断染色体是否存在缺失、重复或数目异常。NIPT 结果阳性代表胎儿母亲外周血中的各种 cffDNA 的比例关系不正常,可能是与母亲血液系统相连通胎儿滋养层的异常核型细胞引起,也能是由母亲异常核型细胞本身引起,也可能有一部分来源于通过输血、免疫治疗、器官移植等形式输入体内的外来异常核型细胞导致。母体外周血中 cffDNA 的来源以及含量变化等生物因素,都会影响 NIPT 检测准确性,表现为 NIPT 结果、染色体核型分析及 CMA 结果三者之间存在不一致情况<sup>[10-11]</sup>。

NIPT 检测的 cffDNA 绝大部分来源于胎儿滋养层细胞,胎儿滋养层细胞与胎儿都是由同一个合子发育而来,将发育为胎盘,合子形成后,一部分细胞发育

成胎盘的细胞系,一部分细胞发育成胎儿的细胞系。正常情况,两者的遗传物质是相同的。如果胎盘细胞系的部分细胞出现有丝分裂错误,那么将会出现限制性胎盘嵌合体,即胎盘出现正常与异常的染色体嵌合体,而胎儿核型正常<sup>[12]</sup>。这种情况胎盘滋养层细胞释放 cffDNA 的分子剂量会异常,同时引起孕妇血浆中 cffDNA 的分子剂量异常,NIPT 检测结果显示为阳性,而胎儿染色体是正常的,即出现假阳性结果。本研究发现 NIPT 假阳性大部分来源于胎盘,占 74.4%,其中大部分的胎盘来源假阳性病例验证结果提示限制性胎盘嵌合体。因此胎盘来源的异常染色体是导致 NIPT 假阳性的主要原因。

母体血浆 DNA 大部分来源于母体基因组,cffDNA 约占 10%~20%<sup>[13]</sup>。虽然在高通量测序前,经过分离和纯化去除了部分的母体基因组 DNA,但是如果母血中存在异常 DNA,仍会影响 cffDNA 的测定,出现假阳性结果。性染色体异常在母血中最常见,其中性染色体嵌合是最常见的母体染色体嵌合异常,其发生率 1/400<sup>[14]</sup>。由于女性拥有两条 X 染色体,而且存在剂量补偿和“选择性失活”现象,女性的 X 染色体异常通常不会引起严重表型,其中 X 三体、嵌合型的 X 单体或 X 染色体的结构异常女性一般都有生育能力<sup>[15]</sup>。而对于常染色体异常,数目异常者除 21-三体外通常不能存活,也没有生育能力,只有小片段的缺失或者重复携带者才能存活和生育,因此性染色体异常在母体中最常见,性染色体异常携带者比例高是导致母血来源的 NIPT 假阳性的主要原因。本研究中 12 例母体来源假阳性有 10 例是 X 染色体异常,说明 X 染色体异常在孕妇中携带率最高。所以 NIPT 检测时如果性染色体异常,很可能来源于母血,应同时对母体白细胞进行染色体检测,以排除母体来源的可能,将会提高 NIPT 对性染色体检测结果的准确性,避免病人妊娠期间不必要的紧张和压力。

本研究还有 10 例假阳性病例同时检测了胎盘组织和母血均正常,NIPT 假阳性来源不明。NIPT 检测一般在孕早中期距离分娩有 6、7 个月时间,引起 NIPT 假阳性的异常 cffDNA 可能已经消失了,因此,本方法无法找到引起 NIPT 假阳性原因。对游离 DNA 剂量变化的来源检测还需要进一步提高现有检测技术。

高通量测序法验证发现胎盘和母血中异常游离 DNA 释放入母血是 NIPT 假阳性的主要原因。对 NIPT 结果为性染色体异常病例,应排除性染色体异常源自母血的可能性。NIPT 能够准确检测母血总游离 DNA 的剂量变化,但无法分辨游离 DNA 剂量变化的来源。

## 参 考 文 献

- [1] 边旭明. 胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测[J].

- 实用妇产科杂志,2013,29(5):330-333.
- [2] BIANCHI D W, RAVA R P, SEHNERT A J. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening [J]. N Engl J Med, 2014, 371(6):887-888.
- [3] BIANCHI D W. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results [J]. Genet Med, 2017, 20(9):910-917.
- [4] BRISON N, VAN D B K, et al. Accuracy and clinical value of maternal incidental findings during noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies [J]. Genet Med, 2017, 17(8):469-470.
- [5] CURNOW K J, WILKINS-HAUG L, RYAN A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(1):1-9.
- [6] 刘俊涛. 无创产前检测国际指南与中国规范 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017(6):16-19.
- [7] LO Y M, TEIN S C, 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, 62(4):768-775.
- [8] CHUI D H K, CUNNINGHAM M J, LUO H, et al. Screening and counseling for thalassemia [J]. Blood, 2006, 107(4):1735-1737.
- [9] NICOLAIDES K H, SYNGELAKI A, ASHOOR G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routine clinical setting [J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 208(4):342-348.
- 短篇论著 •
- tinely screened first-trimester population [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(5):1-6.
- [10] BIANCHI D W, WILKINS-HAUG L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road [J]. Clin Chem, 2014, 60(1):78-87.
- [11] WANG J C, SAHOO T, SCHONBERG S, et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases [J]. Genet Med, 2015, 17(3):234-236.
- [12] LESTOU V S, KALOUSEK D K. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1998, 79(3):223-226.
- [13] ACO G. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee opinion No. 640 [J]. Obstet Gynecol, 2015, 126(3):691-692.
- [14] GRATI F R, BARLOCCO A, GRIMI B, et al. Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal imbalances associated with relevant clinical phenotypes [J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A(6):1434-1442.
- [15] 朱蔚云, 谢天炽, 李佩琼, 等. 人类 X 染色体失活与基因的剂量补偿效应 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2017(11):61-63.

(收稿日期: 2019-03-10 修回日期: 2019-05-22)

## 1 203 例不育患者的精子 DFI 与精液质量参数的相关性分析<sup>\*</sup>

李清琴, 董荔红<sup>△</sup>, 吴丹梅, 钟福春, 张 朵

(联勤保障部队第九〇〇医院临床遗传与实验医学科, 福建福州 350025)

**摘要:**目的 分析不育患者精液质量、年龄与精子 DNA 断裂指数 (DFI) 的关系, 探讨精子 DNA 损伤的机制。方法 回顾性分析 1 203 例不育患者的精子 DFI、精子浓度、活力和年龄等指标。按少、弱精子症进行分组, 并进行精子 DFI 与精子浓度、活力的相关性分析。结果 精子 DFI 与精子浓度无相关性, 而与精子活力呈负相关 ( $r = -0.457, P < 0.05$ )。少、弱精子症组的 DFI 较正常组高, 各组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。年龄与精子 DFI 呈正相关 ( $r = 0.172, P < 0.05$ ), 在弱精子症组中, 不同年龄组 DFI 值比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 精子 DFI 在弱精子症患者中明显升高, 其升高水平与精子活力下降的程度有明显相关性。年龄与精子 DFI 呈正相关。

**关键词:** 精子 DNA 断裂指数; 不育; 精子活力; 年龄

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.028

**文章编号:** 1673-4130(2019)21-2673-04

**中图法分类号:** R698+.2

**文献标识码:** B

据统计中国育龄夫妇中受不育不孕困扰的大约有 10%~15%, 其中男性因素约占 50%<sup>[1]</sup>。精子核

DNA 完整性, 是父源性遗传信息能否准确传递给后代的关键。约 20% 的特发性不育症存在精子 DNA

\* 基金项目: 第九〇〇医院临床应用研究专项基金(2017L01)。

△ 通信作者, E-mail: 77841892@qq.com。

本文引用格式: 李清琴, 董荔红, 吴丹梅, 等. 1 203 例不育患者的精子 DFI 与精液质量参数的相关性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21):2673-2676.