

# 8606 例中孕期妇女血清学三联筛查及产前诊断结果分析

朱翔<sup>1</sup> 许芳<sup>1</sup> 王玉萍<sup>1</sup> 付夏<sup>1</sup> 李书勤<sup>2</sup> 李莉<sup>3</sup> 浦春<sup>1</sup> 武其文<sup>1</sup>

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1. 检验科; 2. 妇产科; 3. 产前诊断中心, 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 探讨血清学三联指标联合产前筛查及产前诊断在临床上的应用价值。方法: 应用时间分辨免疫荧光法对 8606 例孕中期妇女进行血清甲胎蛋白( AFP)、游离 β-人绒毛膜促性腺激素( free-βHCG) 和非耦联雌三醇( uE3) 三联指标检测。将检测结果结合孕妇的年龄、孕周、体质量等因素输入中国南方人群数据库为基础的产前筛查风险评估软件计算出风险值。对染色体非整倍体病高风险者建议进行羊水穿刺细胞培养或荧光原位杂交试验进行产前诊断。低风险及拒绝进行羊水穿刺的高风险孕妇进行电话随访。结果: ①8606 例孕妇 21-三体综合征( DS)、18-三体综合征( ES) 和开放性神经管缺陷( ONTD) 的筛查高风险阳性率分别为 6.47%( 557/8606)、0.17%( 15/8606) 和 0.56%( 48/8606)。②羊水细胞培养产前诊断共检出 21-三体综合征 8 例, 18-三体综合征 2 例。此外羊水细胞染色体核型分析还检出特纳综合征 3 例, 克氏征 1 例以及染色体结构变异 2 例。③随访结果表明血清学三联法对 21-三体综合征的检出率为 84.62%, 假阳性率为 6.34%, 假阴性率为 0.02%。结论: 孕中期妇女血清学三联指标联合产前筛查和羊水穿刺进行产前诊断对预防常见染色体综合征具有重要作用。

**【关键词】**产前筛查; 产前诊断; 21-三体综合征; 荧光原位杂交

**【中图分类号】**R 714.5 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.017

## Analysis of the serological screening index and prenatal diagnosis findings in 8606 women in the second trimester

ZHU Xiang, XU Fang, WANG Yuping, FU Xia, LI Shuqin, LI Li, PU Chun, WU Qiwen

Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To assess the clinical value of prenatal diagnosis and serological screening indicators for accurate predication of trisomy 21 syndrome. **Methods:** Serological screening tests pertaining to α-fetoprotein( AFP), β-human chorionic gonadotrophin( β-HCG) and free estriol( uE3) were performed with time-resolved fluorescence immunoassay in 8606 women during their second trimester. The risk values were estimated with the risk assessment software for prenatal screening data based on women in south China by consideration of risk factors associated with age, pregnant weeks and body weight of pregnant women. Karyotype analysis for amniotic fluid and fluorescence in situ hybridization were offered to the women at high risks, and telephone interview was done to the women at low risks and those at high risks refusing prenatal diagnosis. **Results:** ①Screened positive rates for Down's syndrome( DS), Edward's syndrome( ES) and opening neural tube defects( ONTD) were 6.47%( 557/8606), 0.17%( 15/8606) and 0.56%( 48/8606) in 8606 women; ②Prenatal diagnosis by amniotic cell culturing revealed DS in 8 cases and ES in 2. Besides, chromosome karyotype determination of the amniotic cells revealed Turner syndrome in 3 cases, Klinefelter syndrome in 1 and chromosomal abnormalities in 2; ③Telephone interview showed that serological indicators had screened 84.62% of DS in prenatal diagnosis, though false positive rate( 6.34%) and false negative rate( 0.02%) occurred. **Conclusion:** Second trimester serological screening plus amniocentesis may be valuable role in prevention of common chromosome syndromes.

**【Key words】** prenatal screening; prenatal diagnosis; Down's syndrome; fluorescence in situ hybridization

出生缺陷是指胚胎或胎儿发育过程中由于遗传或环境等多种因素所导致的形态结构、生理功能以及代谢等方面的异常。我国是出生缺陷高发国家, 据统计我国每年大约新增 80 万~120 万例出生缺陷

患儿, 不仅给患者家庭和社会带来巨大压力, 也严重影响我国的出生人口素质。因此, 对孕期妇女进行产前筛查及诊断, 以此来预防出生缺陷儿的出生显得尤为重要。本研究对 2012 年 6 月~2014 年 10

基金项目: 弋矶山医院人才引进项目( YR200904); 弋矶山医院三新项目( Y1457)

收稿日期: 2016-01-21

作者简介: 朱翔( 1991-), 男, 2014 级硕士研究生, ( 电话) 15905538529, ( 电子信箱) xiaozhuhanzi@163.com;

武其文, 男, 副主任医师, ( 电子信箱) yjslab@163.com, 通信作者。

月于弋矶山医院产前诊断门诊就诊的 8606 例中孕期孕妇进行血清学三联指标( AFP、free-βHCG 和 uE3) 产前筛查,并对染色体非整倍体高风险的孕妇进行产前诊断,现对结果作一回顾性分析,报道如下。

### 1 资料与方法

1.1 研究对象 2012 年 6 月~2014 年 10 月于弋矶山医院产前诊断门诊就诊且孕周在 14~21<sup>+6</sup>周的孕妇 8606 例,年龄 17~42 岁,均来自安徽地区。月经周期规律者按末次月经时间计算孕周,月经周期不规律者按 B 超检查结果来确定孕周。

1.2 仪器和试剂 泰莱-II 型时间分辨荧光免疫分析仪为广州丰华生物公司产品,血清 AFP、free-βHCG 和 uE3 时间分辨检测试剂盒及其质控品来自广州丰华生物公司。产前筛查风险评估软件为广州丰华生物公司的 PRsoft 2.0。羊水细胞培养基为美国欧文产品。Anuvysion 荧光原位杂交检测试剂盒为美国生命科技有限公司产品。BX 51 型荧光显微镜为日本 Olympus 产品,染色体核型分析系统为以色列 ASI 公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 三联指标血清学产前筛查 中孕期妇女签署产前筛查知情同意后,空腹采集静脉血 2~3 mL,4000 r/min 离心 10 min,吸取血清置于-20℃保存。采用时间分辨免疫荧光法检测孕妇血清中 AFP、free-βHCG 和 uE3 的浓度。检测步骤严格按照试剂盒操作说明书进行。检测结果结合孕妇年龄、体质量、孕周等因素,通过 PRsoft 2.0 产前筛查风险评估软件计算疾病发病风险。设定唐氏综合征高风险的 cut-off 值为 1/270, >1/270 为高风险;18-三体综合征高风险的 cut-off 值为 1/350, >1/350 为高风险;根据 AFP 检测值中位数倍数(MOM 值)判断神经管畸形风险,>2.5 倍 MOM 值设为高风险。对 21-三体和 18-三体筛查结果为高风险的孕妇,在告知孕妇相应风险后,根据自愿原则行胎儿羊水细胞染色体核型分析或荧光原位杂交实验,以此来确诊。对低风险孕妇及未接受羊水穿刺的孕妇进行电话随访。

1.3.2 羊水穿刺产前诊断 在 B 超引导下行羊膜腔穿刺,弃去最初抽出的 2 mL 羊水,然后抽取羊水 20 mL 进行细胞培养。将羊水注入 2 只 15 mL 无菌离心管中,每只 10 mL,1000 r/min 离心 10 min,弃去

上清,留 0.5 mL,混匀后接种于 2 个细胞培养瓶中,每瓶加入 4 mL 羊水培养基,轻轻混匀,静置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,温度 37℃,培养 6~7 d 后更换培养液,继续培养 1~2 d,此时镜下可见较大而亮圆的分裂期细胞,可终止培养。每瓶加入秋水仙素 4 滴,37℃继续培养 1 h。用吸管将培养瓶中的细胞转移到离心管中,1000 r/min 离心 10 min,弃去上清,保留细胞沉淀,经低渗、预固定、固定、再固定、次固定、滴片、烤片及显带等一系列处理后,在显微镜下观察结果。正常核型计数 20 个,分析 5 个,存取照片两张,异常核型计数 40 个。

1.3.3 间期羊水细胞荧光原位杂交实验 对于部分 21-三体或 18-三体高风险要求进行快速产前诊断的孕妇,利用 Anuvysion 荧光原位杂交试剂盒进行 13、18、21 号染色体的非整倍体检测。具体方法:①羊水标本的处理:标本离心,胶原酶消化 28 min,老化(50℃ 4 h 或室温过夜),RNA 酶消化 15 min,2×SSC 漂洗,胃蛋白酶消化 5 min,2×SSC 漂洗,梯度脱水(70%、85%、100%乙醇,-20℃),室温干燥。②变性及杂交:70% 甲酰胺 73℃ 变性 5 min,-20℃ 乙醇梯度脱水,加入已变性的探针杂交,封片,42℃ 湿盒内避光孵育 10~12 h。杂交后洗片,DAPI 染色 15 min,镜检。③FISH 信号观察:每个杂交区随机计数至少 50 个杂交细胞。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件对本研究的数据进行统计学分析,计数资料的比较采用卡方检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

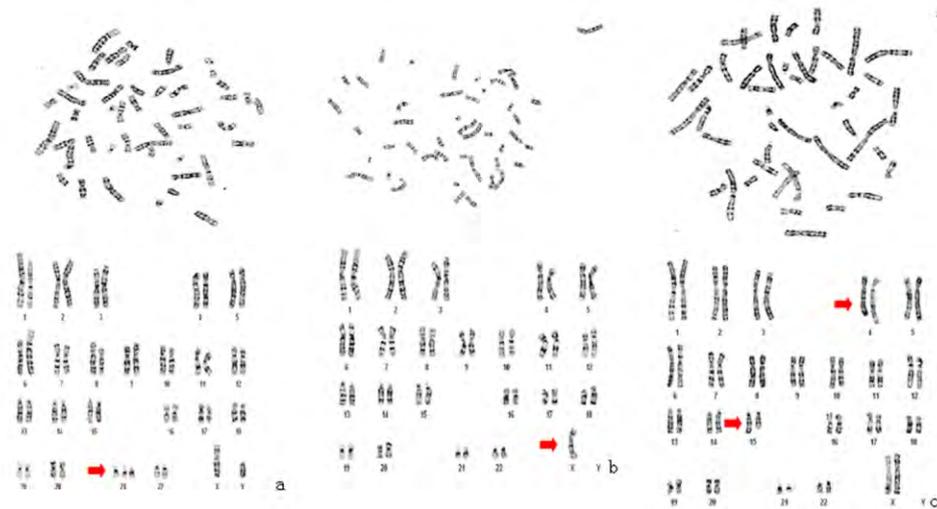
## 2 结果

2.1 血清学产前筛查结果 8606 例孕妇血清学筛查结果见表 1。

表 1 8606 例孕中期妇女血清学三联筛查结果

| 疾病类别     | 阳性切割值 | 阳性例数 | 阳性率% |
|----------|-------|------|------|
| 唐氏综合征    | 1/270 | 557  | 6.47 |
| 18-三体综合征 | 1/350 | 15   | 0.17 |
| 开放性神经管缺陷 | 2.5   | 48   | 0.56 |
| 合计       | /     | 620  | 7.20 |

2.2 羊水细胞培养染色核型分析 共 284 例高风险孕妇接受羊水穿刺进行产前诊断,其中 260 例进行了羊水细胞培养染色体核型分析。结果见表 2、图 1a~c。



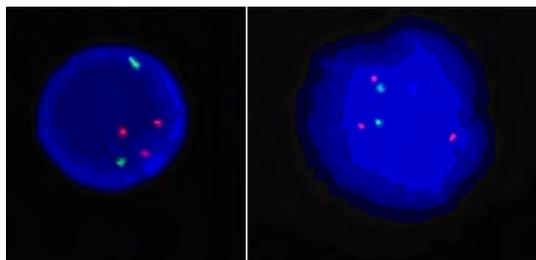
a.21-三体综合征 核型分析结果: 47 ,XY ,+21 ,10×100; b.特纳综合征 核型分析结果: 45 ,X ,10×100; c.4 号和 15 号染色体易位 核型分析结果: 46 ,XX t( 4 ,15) ,10×100。

图 1 异常染色体核型分析图

表 2 异常羊水细胞培养染色体核型分析结果

| 异常类型      | 异常核型             | 例数 |
|-----------|------------------|----|
| 21-三体综合征  | 47 ,XY ,+21      | 6  |
| 18-三体综合征  | 47 ,XX ,+18      | 2  |
| 特纳综合征     | 45 ,X            | 2  |
| 克氏征       | 47 ,XXY          | 1  |
| 其他染色体结构畸变 | 46 ,XX t( 4 ,15) | 1  |
|           | 46 ,X t( X ,17)  | 1  |

2.3 未培养羊水细胞直接荧光原位杂交试验 本研究接受羊水穿刺的 284 例高风险孕妇有 24 例接受荧光原位杂交技术进行快速产前诊断 ,并同时进行了羊水细胞培养染色体核型分析。荧光原位杂交结果共检出 21-三体综合征 2 例。随后核型分析验证结果符合率达 100%。结果见图 2。



细胞红色信号为 21 号染色体。  
图 2 2 例 21-三体综合征羊水细胞荧光原位杂交结果

2.4 随访结果 共有 7986 例产前筛查阴性及 288 例未接受羊水穿刺的高风险孕妇 ,共有 8191 例成功获得随访 ,随访率达 99%。随访结果表明产前筛查 21-三体低风险孕妇有 2 例出生了 21-三体患儿。有 3 例未接受产前诊断的孕高风险孕妇出生了 21-三

体患儿。结合随访结果 ,计算本实验室利用血清学三联指标产前筛查对 21-三体诊断的总检出率为 84.62% ,假阳性率 6.34% ,假阴性率为 0.02%。

2.5 孕妇年龄与产前筛查的关系 本研究以 35 岁为分界点 ,将 8606 例孕妇分为两组 ,高龄组( ≥35 岁) 共 106 例 ,筛查唐氏综合征阳性者 30 例 ,阳性率为 28.3%; 低龄组( <35 岁) 共 8506 例 ,筛查阳性者 527 例 ,阳性率为 6.19%。高龄组阳性率明显高于低龄组 ,差异有统计学意义(  $\chi^2 = 84.58 ,P < 0.01$ ) 。见表 3。

表 3 高龄组和低龄组孕妇唐氏综合征高风险率比较

| 预产年龄/岁 | n    | 阳性例数 | 阳性率/% |
|--------|------|------|-------|
| <35    | 8506 | 527  | 6.2   |
| ≥35    | 106  | 30   | 28.3* |

### 3 讨论

唐氏综合征是新生儿中发病率较高的一种染色体疾病 ,发病率约为 1/800~1/600<sup>[1]</sup> ,是导致孕妇流产、死胎以及新生儿出生缺陷的常见原因之一。患者主要表现为严重的智力发育障碍 特殊面容 ,生长发育迟缓等。有文献报道 ,孕中期 AFP、free-βHCG 二联法筛查唐氏综合征的检出率为 68%~86% ,假阳性率为 5% ,而加入了 uE3 的三联法筛查可进一步降低假阳性率<sup>[2-4]</sup>。雌三醇是由胎儿肾上腺皮质和肝脏提供前体物质 ,最后由胎盘合成的一种甾体激素 ,以游离形式直接由胎盘分泌进入母体血循环。

Muller<sup>[5]</sup>和 Canick<sup>[6]</sup>均发现 uE3 在怀有唐氏综合征胎儿的孕妇血清中的浓度较正常孕妇偏低,所以测定孕妇血清 uE3 水平对唐氏综合征的筛查具有一定意义。我院采用 AFP、free-βHCG、uE3 的三联法检测孕中期妇女血清中的 AFP、free-βHCG、uE3 的浓度,筛查出唐氏综合征的高风险率为 6.47%,与近几年国内报道的 5.67% 相比<sup>[7-8]</sup>,差异无统计学意义。

本研究发现高龄组孕妇(≥35 岁)唐氏综合征高风险率明显高于低龄组孕妇(<35 岁),因此,年龄因素是引起唐氏综合征的高危因素之一。虽然唐氏综合征的高风险率与孕妇年龄的递增之间存在一定关联,但不能认为只有高龄孕妇才会孕育唐氏患儿。有关资料显示,大部分唐氏综合征患儿还是发生于低龄孕妇,所以不能仅仅对高龄孕妇进行产前筛查,而必须对所有孕妇进行筛查,以防漏筛。同时重点关注高龄孕妇,从而有效预防唐氏患儿的出生。

对筛查结果为高风险的孕妇,在告知孕妇相应风险后,本着自愿的原则进行羊水细胞染色体核型分析及 FISH 检测,以进一步确诊是否孕育染色体异常的胎儿。虽然羊水细胞染色体核型分析是产前诊断的金标准,但细胞培养周期较长,大约需要 5~7 d 加之后续的一系列操作,一般要 2~3 周才可报告结果,并且操作过程中对操作人员的技术要求和操作环境的无菌要求都较高,稍有不慎,都会造成标本的污染。相比于传统的羊水细胞染色体核型分析而言,FISH 检测具有诊断快速、结果直观等优势,一般 24 h 甚至更短时间便可报告结果,且可靠性达到 99.8% 以上,大大缩短了孕妇等待结果的时间,减轻了孕妇的心理压力。

羊水细胞染色体核型分析和 FISH 检测都属于侵入性实验,在对孕妇进行羊膜腔穿刺抽取羊水的过程中存在一定的风险。据报道,羊水穿刺会使流产的风险率提高 0.5%~1%<sup>[9]</sup>,并且绝大多数高危孕妇羊水细胞染色体核型分析结果正常<sup>[10]</sup>。因此,探寻一种操作安全且结果准确的无创产前检测技术已成为必然。

1997 年,Lo 等<sup>[11]</sup>研究发现在孕妇的血浆中存在胎儿游离 DNA (cell free fetal DNA,cff-DNA),这一重大发现为无创产前检测技术的研究开辟了新的领域。伴随着新一代高通量测序技术的迅猛发展,无创 DNA 产前检测技术应运而生。无创 DNA 产前检测技术是通过孕妇外周血中胎儿游离 DNA 进

行高通量测序,并将测序结果进行生物信息学分析,从而得出胎儿发生染色体非整倍体的风险率。该技术具有准确率高、周期短等优点,据有关文献报道,准确率可高达 99%<sup>[12]</sup>。虽然现阶段该技术成本较高,尚未得到广泛应用,但随着技术的发展,检测成本的下降,这一技术必将为大众所接受,从而最大限度地减少侵入式产前诊断给孕妇带来的风险。

对孕中期妇女进行产前筛查与产前诊断,能够有效预防出生缺陷儿的出生,提高我国的出生人口素质,具有重要的临床应用价值。血清三联法筛查相比于以往的二联法,具有更高的检出率,应在临床上大力推广。

### 【参考文献】

- [1] 董源芬,阮译燕.唐氏综合征的产前筛查进展[J].中国妇幼保健,2004,19(14):120-121.
- [2] 张方芳,徐永莲,张光艳,等.孕中期产前筛查/产前诊断在减少出生缺陷中的价值[J].中国妇幼保健,2013,28(28):4711-4713.
- [3] LO YM,TEIN M SC,LAU TK,et al.Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J].The American Journal of Human Genetics,1998,62(4):768-775.
- [4] 郭辉,卓坚臻,霍梅,等.非结合雌三醇在孕中期产前筛查中的应用价值分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(7):819-821.
- [5] MULLER F,FORESTIER F,DINGEON B,et al.Second trimester trisomy 21 maternal serum marker screening results of a country-wide study of 854 902 patients[J].Prenat Diagn,2002,22:925.
- [6] MALONE FD,CANICK JA,BALL RH,et al.First-trimester or second-trimester screening or both for Down syndrome[J].N Engl J Med,2005,303:2001.
- [7] 王靖,陈汉平.母体外周血中游离胎儿核酸物质在无创性产前诊断中的研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2010,18(11):3-5.
- [8] 边旭明,戚庆伟.染色体异常产前筛查和产前诊断工作任重而道远[J].实用妇科与产科杂志,2010,26(12):889-890.
- [9] 迟洪滨,程利南,李岩,等.孕妇血浆中胎儿游离 DNA 检测在唐氏综合征产前诊断中的应用[J].中华妇产科杂志,2006,41(4):276-277.
- [10] 梁雄,朱峰,朱兰芳,等.3195 例孕中期唐氏综合征的血清筛查和产前诊断临床分析[J].中国现代医学杂志,2005,15(20):3079-3084.
- [11] LO YM,CORBETTA N,CHAMBERLAIN PF,et al.Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J].The Lancet,1997,350(9076):485-487.
- [12] 刘福民.无创性产前诊断胎儿染色体非整倍体的研究进展[J].中华临床医师杂志,2010,4(5):547-551.