# 快速产前诊断技术用于染色体病检测的发展趋势与挑战

魏 巍 王雷雷
（1.扬州大学 江苏 扬州 225000）
（2.连云港市妇幼保健院 江苏 连云港 225009）

【摘 要】产前诊断是出生缺陷防控的重要手段。随着分子遗传学的发展，快速产前诊断技术，如荧光原位杂交技术（FISH）、比较基因组杂交技术（CGH）、荧光定量聚合酶链反应技术（QF-PCR）、多重连接探针扩增技术（MLPA）、染色体微阵列分析技术（CMA）、数字 PCR 等逐渐成熟，已成为产前诊断常用的检测手段，尤其是对于非整倍体的检测。然而，快速产前诊断技术均存在一定的局限性，尚不能完全取代传统核型分析。此外，高通量测序技术，如拷贝数变异测序 (CNV-seq)、全基因组无细胞 DNA (cfDNA) 和全外显子组测序 (WES) 等，具有整体成本低、准确度高且可发现更多的或新的突变等，给快速产前诊断技术带来挑战，但高通量测序技术可检测出未知的突变及遗传咨询尚未成熟，可能导致孕妇焦虑和抑郁等。因此，目前快速产前诊断技术依然是重要的检测手段。

【关键词】产前诊断；快速产前诊断；高通量测序；出生缺陷；染色体病

# The development trend and challenge of rapid prenatal diagnosis in chromosome disease detection

Wei Wei Leilei Wang
(1.Yangzhou University, Yangzhou,Jiangsu,225000)
(2.Lianyungang maternal and Child Health Center, Lianyungang,Jiangsu,225009)

[Abstract]Prenatal diagnosis is an important means to prevent and control birth defects. With the development of molecular genetics, rapid prenatal diagnostic techniques, techniques such as Fluorescence in situ hybridization hybridization (FISH) , comparative genomic hybridization (CGH) , quantitative polymerase chain reaction PCR (QF-PCR) , multiplex ligation probe amplification (MLPA) , chromosome microarray analysis (CMA) and digital PCR are becoming mature, it has become a common method for prenatal diagnosis, especially for aneuploidy detection. However, rapid prenatal diagnosis has some limitations and can not completely replace traditional karyotype analysis. In addition, high-throughput sequencing techniques, such as copy number variation sequencing (CNV-SEQ) , whole genome cell-free DNA (cfDNA) and whole exome sequencing (Wes) , have been developed, the low overall cost, high accuracy and the ability to detect additional or new mutations present challenges for rapid prenatal diagnosis, but high-throughput sequencing techniques to detect unknown mutations and genetic counseling are not yet mature, may cause anxiety and depression in pregnant women. Therefore, at present, rapid prenatal diagnosis technology is still an important means of detection.

[Keywords]Prenatal diagnosis;Rapid prenatal diagnosis;High-throughput sequencing;Birth defects;Chromosomal diseases

## 前言

染色体病是因染色体数目、结构畸变所致遗传物质得失的一类遗传性疾病。13、18、21 和性染色体非整倍体异常最常见的畸变，占临床显着产前诊断染色体异常的 80% 以上[1, 2]。近年来，随着我国三胎政策的全面开放，高龄孕产妇的增加，以非整倍体为主的染色体病发病率呈上升趋势，是不容忽视的重要公共卫生问题。然而，目前染色体病治疗新技术尚未成熟，尚需要更多的临床前和临床研究评估其安全性和有效性[3]，因此产前诊断尤为重要。考虑从传统核型分析开始发展至今，已经发展多种产前诊断技术检测技术，因此遴选高灵敏度、高特异度、快速简便且符合我国国情的产前诊断技术势在必行。

## 1 快速产前诊断技术的发展趋势

几十年来，核型分析检测高度准确，羊水细胞和绒毛细胞的准确度分别为 99.4-99.8% 和 97.5%-99.6%，一直是产前诊断中检测染色体异常的金标准[4, 5]。核型分析可检测染色体异常（多倍体或非整倍体）、显微镜下可看到分辨率约为 5-10 Mb 的相对较大的结构异常、平衡或不平衡易位和倒位[5, 6]。然而，核型分析具有一定的局限性，如由于细胞培养而致的报告时间相对较长，需要熟练的技术人员进行分析，以及

无法检测亚显微染色体畸变等，不适于临床大规模的筛查。

近几十年来，随着分子生物学和生物技术的进步，分子遗传学取得了高速发展。分子遗传学技术具有快速、成本低、高通量、高准确度和高灵敏度等特点，已逐渐成为主流的产前诊断方法。尤其是快速产前诊断技术，如荧光原位杂交技术（FISH）、比较基因组杂交技术（CGH）、荧光定量聚合酶链反应技术（QF-PCR）、多重连接探针扩增技术（MLPA）、染色体微阵列分析技术（CMA）等技术，已成为产前诊断实验室最常用用的方法。

1.1 荧光原位杂交技术（FISH）

FISH 是临床应用较广泛的产前诊断技术之一，已应用临床 30 余年。它结合了细胞遗传学和分子生物学方法，是对传统核型分析的补充，目前主要用于快速检测超声提示的可疑异常、有家族史的常见染色体非整倍体和微缺失微重复综合症[7, 8]。FISH 具有高灵敏度和高准确度，具有以下优势[5, 8-10]：（1）可检测染色体结构异常，如微缺失、微小复制和移位、复杂重排和标记染色体等；（2）不需要细胞培养，能在细胞间期进行检测，可节省细胞培养和分析时间，故出报告时间短；（3）检出率与核型分析相当：绒毛样本 97.5%-99.6%，未培养的羊水细胞 99.4%-99.8%。然而，FISH 也具有一定的局限性[5, 8-10]：（1）染色体探针成本较高，操作复杂，检测规模小；（2）只能检测已知的染色体异常，不能发现少见的染色体结构和数目异常；（3）不能分辨母体细胞和胎儿 XX 细胞的混杂；（4）不能发现嵌合比例较小的拷贝数变化。

1.2 比较基因组杂交技术（CGH）

CGH 是在 FISH 基础上改进的分子遗传学技术，已用应用临床近 30 年。CGH 具有以下优势[5, 9, 11]：（1）可检测多种来源的 DNA 样本，且需要量少（＜1 μg）；（2）检测周期短，4-5 天即可完成检测；（3）具有较高的分辨率，可 1 次检测所有染色体的不平衡变化。然而，CGH 也具有一定的局限性[5, 9, 11]：（1）不能检测染色体平衡性改变及非染色体数改变的畸变、基因重排和点突变等；（2）对于缺失＜2 Mb 或扩增＜10-12 Mb 染色体改变不能准确定位；（3）图像分析系统昂贵；（4）只可进行半自动分析，需要熟练的专业技术人员进行分析。

1.3 染色体微阵列分析技术（CMA）

染色体微阵列分析（CMA）是一种高分辨率的全基因组检测方法，已被推荐作为产前诊断的一级检测[7]。CMA 又可分为微阵列比较基因组杂交技术（aCGH）和单核苷酸多态性分析技术（SNP）。CGH 具有以下优势[7, 12, 13]：（1）分辨率较高，准确地检测到大小小至 50-100 kb 的 CNV；（2）不需要细胞培养，检测周期短，通常通常在 3-5 天内可完成；（3）能发现嵌合 20-30% 正常细胞样本的拷贝数变化。然而，CMA 也具有一定的局限性[7, 12, 13]：（1）尚不能检测染色体易位和倒位；（2）可检测出尚不能明确致病性的 VUS，可能会给父母带来压力和焦虑，使他们可能需要考虑终止妊娠；（3）难以检测到低水平的嵌合体；（4）价格昂贵；（5）无法识别母体细胞污染（MCC）。

1.4 荧光定量聚合酶链反应技术（QF-PCR）

QF-PCR 是应用广泛的分子遗传学技术，已用应用临床近 30 年。QF-PCR 主要应用于非整倍体检测，具有以下优势[5, 8-10]：（1）检测速度快，可在采样后数小时内出结果；（2）具有优异的稳定性和可靠性，几乎不存在假阳性或假阴性，如一项涉及 43000 份产前样本、41019 分正常妊娠样本的 QF-PCR 检测结果显示，其与核型分析的一致性达 99.6%，未检出的 0.4% 也因染色体异常也不在 QF-PCR 检测范围内；（3）在检测羊水和绒毛细胞方面结果一致，三倍体、双三体及性染色体非嵌合型非整倍体，尚未无假阴性出现；（4）价格低廉；（5）可识别母体细胞污染。然而，QF-PCR 也具有一定的局限性[9]：对嵌合体和平衡易位患者不能在准确诊断。

1.5 多重连接探针扩增技术（MLPA）

MLPA 是本世纪初在 QF-PCR 基础上改进的分子遗传学技术，可实现在 1 个反应管中基因组 DNA 或 RNA 多达 50 个拷贝数的检测。MLPA 具有以下优势[5, 9, 11]：（1）需要的样本量小，每个反应仅需要 20 ng DNA 或 10 ng RNA；（2）较高的灵敏度与特异度，可检测单核苷酸改变；（3）较高的精准度，可检测搭配数十种控制组探针；（4）较好的重复性，变异系数仅为 3%-8%；（5）操作简便、快速及高通量。然而，MLPA 也具有一定的局限性[5, 9, 11]：（1）不能检测短串联重复序列多态性（STR）及染色体平行易位；（2）不能用于单个细胞检测，进行 3 体检测时被母亲污染的羊水标本不能准确检测。

1.6 数字 PCR

数字 PCR 使成百上千的 PCR 反应集中在 1 个反应管中或 1 张芯片上进行的分子遗传学技术。它的优点与 MLPA 相似，主要为所需样本量小、快速、准确度高、灵敏度高、特异性强等[14, 15]。然而，数字 PCR 也具有一定的局限性[14, 15]：(1)不能检测染色体结构异常，如平衡易位、插入等；（2）价格昂贵。

1.7 其它

在 FISH 的基础上发展出的光谱核型分析（PRINS）[16]、光谱核型分析（SKY）[17] 等，相比 FISH 具有操作简便、快速等特点，但对标本要求较高，反应条件不易掌握，技术难度较高。细菌人工染色体标记 - 微球鉴别分离技术 (BACs-on-Beads，BoBs) 是在液相环境中，标记 1 种荧光的待测样本 DAN，与固定在微球上的目标位点细菌人工染色体克隆杂交，通过检测杂交前后的荧光轻度来判断样本拷贝数的变化 [18]。基质辅助激光吸收离子化时间飞行质谱技术（MALDI-TOF）是用于蛋白质组分析的新技术 [19]。

**2 快速产前诊断技术面临的挑战**

近年来，高通量测序技术，也称下一代测序技术 (NGS)，如拷贝数变异测序 (CNV-seq)、全基因组无细胞 DNA (cfDNA) 和全外显子组测序 (WES) 等，在产前诊断中被开发。

2.1 拷贝数变异测序 (CNV-seq)

CNV-seq 是基于 NGS 的统一、低覆盖的基因组测序，总体成本相对较低。它似乎是评估 CNV 的有用工具，最近被建议用于产前诊断 [20, 21]。Zhang 等报道了核型分析和 CNV-seq 联用，平均测序深度为 0.08 倍，在具有正常核型、多态性、相互易位或标记染色体的 8,705 例人群中检测到额外的 63 例 (0.7%) 致病性 CNV，表明核型分析和 CNV-seq 联用显著提高胎儿致病性 CNV 的检出率 [21]。Wang H 等进行 1 项涉及 1,023 例孕妇的前瞻性研究，比较 CNV-seq 与 CMA 的检出情况，结果表明，CNV-seq 不仅识别出 CMA 在 121 例病例中检测到的所有 124 种数值异常或病原或可能病原（P / LP）CNV（11.8%，121 / 1023），但同时在 17 例病例中定义了 17 种与临床相关的 P / LP CNV（1.7%，17/1023）[22]。此外，CNV-seq 显著降低 CMA 的技术重复率，从 4.6%（47/1023）降低到 0.5%（5/1023），并且需要较少的 DNA（50 ng）[22]。因此，与 CMA 相比，CNV-seq 识别出具有增强的分辨率和更高的检测嵌合性的临床信息，具有更多的临床意义。然而，CNV-Seq 也存在读长短、不能覆盖全基因组等局限性，不能检测平衡易位、多态性、标记染色体等超出检测范围的遗传变异，不能准确检测多倍体和低水平的嵌合体 [22]。核型分析和 CNV-Seq 是两种不同的技术，在产前诊断中结合使用可以弥补彼此的不足，相互验证结果，提高产前诊断的准确性。

2.2 全基因组 cfDNA 检测

在过去十年中，无创产前检测 (NIPT) 已证实是具有高灵敏度的胎儿染色体三体筛查技术。近年来，扩大了覆盖整个基因组的 NIPT，称为全基因组游离 DNA 检测（cfDNA），已应用于染色体三体以外的 CNV。Familiari 等人进行荟萃分析，全基因组 cfDNA 检测微缺失和微重复综合征的阳性预测值（PPV）为 44.1% [23]。然而，每项研究的病例数少，缺乏标准化的诊断确认，以及不同的 DNA 测序方法使得结果不清楚 [23]。最近，Rafalko 等人进行了一项研究，表明全基因组 cfDNA 检测可以为患者提供更多临床相关信息，PPV 约为 74.2% (95% CI: 68.1 - 79.5%)[24]。然而，全基因组 cfDNA 检测用于产前诊断目前尚存在争议。首先，了解 NIPT 的 PPV 主要取决于患者先前的染色体异常风险。在大约 6.7% 的胎儿中发现了非常见的良性 CNV，这些胎儿具有超声检测异常 [25]。当观察到多器官系统超声异常时，非常见良性 CNV 的频率增加到 13.6%[25]。Guseh 等人评估了全基因组筛查和诊断测试的一致性，表明与诊断测试相比，全基因组筛查的主要限制是在具有 κ 异常超声的人群中 = 0.38 (95% CI, 0.08 - 0.67)，包括 5 个一致阳性、4 个假阳性、7 个假阴性和 48 个一致阴性结果，表明假阴性人群的剩余风险很高 [26]。其次，权威机构建议通过侵入性程序确认阳性 NIPT 结果。尽管全基因组 cfDNA 筛查检测的 PPV 约为 74.2%[24]，但随着假阳性结果的出现，需要侵入性手术的人群增加。由于 P/LP CNVs 发生在大约 1.7% 的超声检查正常的患者中 [27]，因此在没有异常超声检查结果的人群中，全基因组筛查和诊断测试之间的一致性是值得的，但需要进一步全面评估全基因组 cfDNA 检测的临床实施情况。

2.3 全外显子组测序（WES）

WES 是一种用于在核苷酸水平咨询基因组以识别单基因疾病变异的技术。当检测到胎儿结构异常时，新出现的证据支持 WES 的益处。Mellis 进行了 1 项荟萃分析，以确定 WES 对胎儿结构异常的产前诊断的诊断率 [28]。该研究表明，所有研究中 WES 相对于 CMA/ 核型的汇总增量产量为 31%（95% CI 26-36%，p< 0.0001)[28]。国际产前诊断学会发布的更新声明建议使用全基因组测序进行产前诊断，这表明使用 WES 应遵循产前临床诊断的适应症。对于那些在快速产前诊断后未发现基因诊断的人，怀有单一主要异常或多器官系统异常的胎儿将受益于 WES 或其他基因组测序方法 [29]。目前没有证据支持 WES 作为除高度怀疑的胎儿异常或单基因疾病外的适应症的常规测试。还应该注意的是，WES 结果的解释在产前诊断环境中有一些局限性：已经进行了研究以评估 WES 数据在 CNV 检测中的性能，并确定了几个潜在的盲点：超出 WES

目标区域或覆盖不佳区域内的 CNV，以及与基因内区域相关或涉及单外显子变化的 CNV[30, 31]；报告不确定的结果不利于临床解释，并且对偶然和次要发现的管理尚未达成普遍共识[29, 32]。

## 3 结论

快速产前诊断技术，如荧光原位杂交技术（FISH）、比较基因组杂交技术（CGH）、荧光定量聚合酶链反应技术（QF-PCR）、多重连接探针扩增技术（MLPA）、染色体微阵列分析技术（CMA）等，已逐渐取代传统核型分析成为主流的检测技术。然而，快速产前诊断技术均有一定的局限性，尚不能完全取代传统核型分析。

近年来，随着高通量测序的发展，基于高通量测序的产前诊断技术，拷贝数变异测序（CNV-seq）、全基因组无细胞 DNA（cfDNA）和全外显子组测序（WES）等被开发用于产前诊断。这些基于高通量测序的产前诊断技术具有整体成本低、准确度高且可发现更多的或新的突变等，给快速产前诊断技术带来冲击。然而这些基于高通量测序的产前诊断技术可检测出未知的突变及遗传咨询尚未成熟，可能导致孕妇焦虑和抑郁等。因此，目前快速产前诊断技术依然是重要的检测手段，现阶段不能被完全替代。

**参考文献：**

[1]NYKEL A, KASZKOWIAK M, FENDLER W, et al. Chip-Based Digital PCR Approach Provides A Sensitive and Cost-Effective Single-Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies-A Proof of Concept Study [J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(21)

[2]DRISCOLL D A, GROSS S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy [J]. The New England journal of medicine, 2009, 360(24): 2556-62

[3]DE COPPI P, LOUKOGEORGAKIS S, GöTHERSTRöM C, et al. Regenerative medicine: prenatal approaches [J]. The Lancet Child & adolescent health, 2022, 6(9): 643-53

[4]SHAFFER L G, BUI T H. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis [J]. American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics, 2007, 145c(1): 87-98

[5] 李琼，王挺，王玮. 快速产前遗传学诊断新技术进展 %J 现代妇产科进展 [J]. 2013, 22(05): 408-12.

[6]VERMEESCH J R, FIEGLER H, DE LEEUW N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis [J]. European journal of human genetics : EJHG, 2007, 15(11): 1105-14

[7]LIU X, LIU S, WANG H, et al. Potentials and challenges of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis [J]. Frontiers in genetics, 2022, 13(938183

[8] 中国医院协会临床检验专业委员会出生缺陷防控实验技术与管理学组，刘世国，王敬丽，et al. 产前荧光原位杂交技术专家共识 %J 中华医学遗传学杂志 [J]. 2020, 37(09): 918-23

[9] 李晓娟，符生苗，邓立群. 快速产前诊断胎儿非整倍体的分子细胞遗传学方法 %J 中国妇幼保健 [J]. 2010, 25(12): 1728-9

[10] 计德永，王虎，贾文娟，et al. 胎儿非整倍体产前诊断的研究进展 %J 中国现代医生 [J]. 2017, 55(35): 161-4

[11] 禹虹，边旭明. 快速非整倍体胎儿产前诊断技术 %J 协和医学杂志 [J]. 2010, 1(01): 98-102

[12]LEVY B, WAPNER R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis [J]. Fertility and sterility, 2018, 109(2): 201-12

[13]LO J O, SHAFFER B L, FEIST C D, et al. Chromosomal microarray analysis and prenatal diagnosis [J]. Obstetrical & gynecological survey, 2014, 69(10): 613-21

[14]NECTOUX J. Current, Emerging, and Future Applications of Digital PCR in Non-Invasive Prenatal Diagnosis [J]. Molecular diagnosis & therapy, 2018, 22(2): 139-48

[15]ZIMMERMANN B G, GRILL S, HOLZGREVE W, et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? [J]. Prenatal diagnosis, 2008, 28(12): 1087-93

[16] 冯治，黄元河. 引物原位标记技术及其在人类染色体病诊断中的应用现状 %J 吉林医学 [J]. 2009, 30 (23): 3077-9

[17] 宋花蕾，陈宝江，方群. 光谱核型分析技术在细胞遗传中的应用 %J 国际妇产科学杂志 [J]. 2010, 37 (06): 383-6

[18]CHOY R K, CHEN Y, SUN X F, et al. BACs-on-beads: a new robust and rapid detection method for prenatal diagnosis [J]. Expert review of molecular diagnostics, 2014, 14(3): 273-80

[19] 张有成，张志军，潘国珍，et al. DNA-SNP 等位基因比率分析快速诊断产前唐氏综合征 %J 实用临床医药杂志 [J]. 2015, 19(09): 84-6+90

[20]DONG Z, CHAU M H K, ZHANG Y, et al.

Low-pass genome sequencing-based detection of absence of heterozygosity: validation in clinical cytogenetics [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2021, 23(7): 1225-33

[21]ZHANG J, TANG X, HU J, et al. Investigation on combined copy number variation sequencing and cytogenetic karyotyping for prenatal diagnosis [J]. BMC pregnancy and childbirth, 2021, 21(1): 496

[22]WANG H, DONG Z, ZHANG R, et al. Low-pass genome sequencing versus chromosomal microarray analysis: implementation in prenatal diagnosis [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2020, 22(3): 500-10

[23]FAMILIARI A, BOITO S, REMBOUSKOS G, et al. Cell-free DNA analysis of maternal blood in prenatal screening for chromosomal microdeletions and microduplications: a systematic review [J]. Prenatal diagnosis, 2021, 41(10): 1324-31

[24]RAFALKO J, SOSTER E, CALDWELL S, et al. Genome-wide cell-free DNA screening: a focus on copy-number variants [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2021, 23(10): 1847-53

[25]DONNELLY J C, PLATT L D, REBARBER A, et al. Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies [J]. Obstetrics and gynecology, 2014, 124(1): 83-90

[26]GUSEH S, WILKINS-HAUG L, KAIMAL A, et al. Utility of noninvasive genome-wide screening: a prospective cohort of obstetric patients undergoing diagnostic testing [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2021, 23(7): 1341-8

[27]WAPNER R J, MARTIN C L, LEVY B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis [J]. The New England journal of medicine, 2012, 367(23): 2175-84

[28]MELLIS R, OPRYCH K, SCOTCHMAN E, et al. Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: A systematic review and meta-analysis [J]. Prenatal diagnosis, 2022, 42(6): 662-85

[29]VAN DEN VEYVER I B, CHANDLER N, WILKINS-HAUG L E, et al. International Society for Prenatal Diagnosis Updated Position Statement on the use of genome-wide sequencing for prenatal diagnosis [J]. Prenatal diagnosis, 2022, 42(6): 796-803

[30]RETTERER K, SCUFFINS J, SCHMIDT D, et al. Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2015, 17(8): 623-9

[31]ROYER-BERTRAND B, CISAROVA K, NIEL-BUTSCHI F, et al. CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities and Limitations [J]. Genes, 2021, 12(9)

[32]MONAGHAN K G, LEACH N T, PEKAREK D, et al. The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [J]. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2020, 22(4): 675-80