

• 案例分析 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.14.045

1 例 9p-四体综合征嵌合型胎儿的遗传学分析

邱显荣¹, 申 瑶², 林 萃¹

1. 广东省珠海市妇幼保健院检验科, 广东珠海 519001; 2. 广东省中医院珠海医院检验科, 广东珠海 519015

关键词: 9p-四体综合征; 产前诊断; 染色体微阵列分析

中图分类号: R722.11

文献标志码: C

文章编号: 1672-9455(2021)14-2139-03

非平衡嵌合体是导致胎儿先天性缺陷的原因之一, 传统的细胞遗传学检查可能会漏检低水平的嵌合体, 除非加大核型的分析数量。染色体微阵列分析 (CMA) 技术的应用能提高染色体异常嵌合的检出率, 能检出嵌合比例为 10%~20% 的低水平嵌合^[1-2]。衍生染色体, 即由 2 条或以上染色体结构重排, 或是由于单条染色体发生多种畸变而产生, 具有完整的着丝粒。但传统的 G 显带核型分析由于分辨率不高, 很难确定衍生染色体片段的来源、大小和断裂点, 更无法检测出染色体亚显微结构异常。本研究中, 笔者联合应用核型分析与 CMA 技术, 最终确定胎儿的嵌合比例与衍生染色体的来源, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇, 32 岁, 配偶为非近亲。既往体健, 否认家族遗传病史, 孕 5 次, 流产 3 次。曾足月顺产一男婴, 健康。孕 13 周时无创产前 DNA 检测 (NIPT) 报告 21、18、13-三体综合征低风险, 但提示 9 号染色体部分重复, 孕 22⁺ 周 B 超提示胎儿宫内发育迟缓, 室间隔缺损、单脐动脉、不排除多囊肾、羊水少。孕妇在知情同意下行羊水穿刺术, 抽取羊水同时做 G 显带核型分析和基因芯片检查。

1.2 方法

1.2.1 NIPT 评估胎儿常见染色体非整倍体患病风险 用乙二醇四乙酸抗凝的离心管抽取孕妇外周血 5 mL, 2~8 °C 低温条件下离心分离血浆, -70 °C 以下超低温保存。采用磁珠法 DNA 提取试剂盒 (深圳华大基因) 抽提含有胎儿游离 DNA 的孕妇血浆 DNA, 使用胎儿染色体非整倍体 (T21、T18、T13) 检测试剂盒 (深圳华大基因) 对母血游离 DNA 进行特定序列接头连接、扩增及上机测序, 然后通过与阳性判断值比较进行胎儿 21、18、13 号染色体非整倍体情况的判断。应用 BGISEQ-500 基因测序仪 (深圳华大基因) 进行测序, 测序方法为联合探针锚定聚合测序法, 测序深度为 $\times 0.1$ 。

1.2.2 G 显带核型分析 对胎儿取 20 mL 羊水做常规 G 显带核型分析。用改良原位法培养制备染色体, G 显带处理。非嵌合体计数 20 个核型, 嵌合体计数 100 个核型。染色体核型按《2016 人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN)》描述。

1.2.3 CMA 抽取羊水 10 mL, 采用 QIAamp DNA Mini 试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 提取和纯化全基因组 DNA, 应用 Affymetrix 750K 试剂盒 (美国 ThermoFisher 公司) 对 DNA 进行酶切、连接、PCR 扩增、纯化、片段化、标记、杂交等处理, 最后应用配套的 ChAS 软件分析染色体的拷贝数变异 (CNV)。CNV 的分析标准是以 50 个标记、100 kb 为最佳临界值进行分析; 杂合性缺失或纯合状态以 5 Mb 的分辨率进行分析, 包含明确印记致病基因的纯合状态区域报告标准染色体片段 ≥ 5 Mb, 不包含明确印记致病基因的纯合状态区域报告片段为染色体片段 ≥ 10 Mb。

1.2.4 荧光原位杂交技术 (FISH) 分析 采用广州和能生物科技有限公司生产的 GSP PD-L1 (Red) 和 CSP9 (Green) 探针进行原位杂交, 经 Zeiss 荧光显微镜观察, FISH 软件照相分析荧光信号。

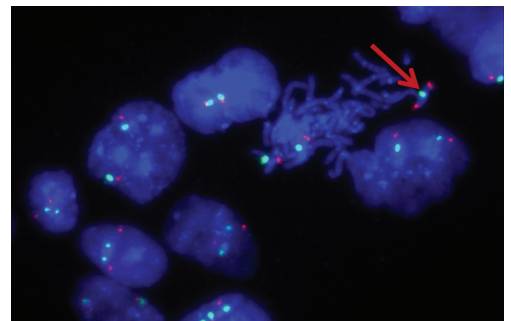
2 结果

2.1 NIPT 检测结果 21、18、13-三体综合征筛查低风险, 但 9 号染色体异常。

2.2 核型分析结果 胎儿核型为 47, Xn, +der(9)del(9)(q21q34)dup(9)(p12p24)[10]/46, Xn[90]。

2.3 CMA 检测结果 对羊水行 CMA, 胎儿在 chr9p24.3p13.2 位置检出一段约 64.9 Mb 的 2.43 拷贝重复, 检测结果为 arr[GRCH37]9P24.3P13.2(208454-68216577) $\times 2-3$, 涉及 DOCK8、KANAK1、DMRT1 等 164 个 OMIM 基因。

2.4 FISH 验证结果 为 9 号染色体短臂定制探针, 对 CMA 测序结果提示的 chr9p24.3p13.2 重复片段进行验证, 发现二者结论一致, 见图 1。



注: 箭头所示为 chr9p24.3p13.2 重复。

图 1 羊水 FISH 示意图

3 讨 论

9p-三体综合征由 RETHOR 等^[3]应用显带技术识别证实并于 1970 年首次报道。1975 年 CENTERWALL 等^[4]确定了 9p-三体综合征的畸变类型,其畸变大多数源自亲代的染色体平衡易位,少部分为新发突变。9p-四体综合征较罕见,在产前诊断羊水穿刺中 9p-四体综合征的检出率约为 0.002%^[5],9p-四体综合征中约 30% 为嵌合体^[6]。其组成类型主要有:9 号染色体整个短臂的等臂、整个短臂和长臂的部分异染色质区的等臂、整个短臂和长臂延伸到部分常染色质区的等臂。迄今为止,已经报道的 9p-四体综合征仅 60 余例,其中产前诊断病例仅 20 例^[7]。本研究中病例为 9 号染色体整个短臂的等臂 i9(p)。产生机制多为减数分裂Ⅱ期不分离和重排,导致 9p 的重复和长臂的缺失,从而形成 9p 等臂,通常为母源性^[8]。

9p-四体综合征的临床症状与 9p-三体综合征相似,如生长发育迟缓、智力严重缺陷,具有眼间距宽、眼裂和嘴角下斜、环状耳等头面部异常^[3],先天性心脏病、中枢神经系统异常、肾脏异常、骨骼畸形、泌尿生殖器等异常^[9-10]。但 9p-四体综合征的存活率更低,表型更严重。许多 9p-四体综合征的异常发现源于胎儿出现多种先天性异常而进行染色体核型分析。其中最常见的是巨脑室及 Dandy-Walker 畸形(60%),其次依次为唇腭裂(55%)、宫内发育迟缓(45%)^[11]。DHANDHA 等^[12]和 NAKAMURA 等^[13]报道了被诊断为 9p-四体综合征的产前超声异常还包括脑室增大、胼胝体发育不全、蚓部发育不全、椎体异常、心脏异常、泌尿生殖系统异常、肢体畸形、鼻骨缺失、先天性膈疝等。

9 号染色体 p22p24 区是 9p-四体综合征的关键区域。9p22.1p22.3 区段重复具有典型颅面部异常,9p21.2p21.3 区段重复与语言发育迟滞有关^[14]。而 9p22p24 区段的 DOCK8、KANK1、DMRT1、VLORL 基因明确与多种疾病及智力低下有关,KANK1 的拷贝数变异与中枢神经系统缺陷有关。BOXILL 等^[15]认为 9p 区域包含一个或多个涉及脉络丛生长调控的基因,与 9p-三体综合征相比,9p-四体综合征患者似乎更容易发生脉络丛增生。二者最常见的中枢神经系统异常是胼胝体异常和脑积水。DMRT1 基因属于一个锌脂样的 DNA 结合序列(DM 域),DM 域是脊椎动物性别决定途径中一个古老而保守的组成部分。当该基因出现 CNV 时,就会出现睾丸发育缺陷和 XY 女性化。VERHEIJ 等^[16]认为 9 号染色体上某些基因的超表达可能导致睾丸功能低下和泌尿生殖系统异常。VLDLR 基因可以转导多种细胞外信号穿过神经细胞膜进入中枢神经系统,调节突触的可塑性并对海马的特殊学习和记忆功能具有重要作用。这些基因拷贝数的改变可能对智力和骨骼的发育产生影响^[14]。本研究中胎儿核型的衍生染色体经过 CMA 确认为 9p 的重复。因其片段覆盖了 9p-四体综合征

的关键区域,故会呈现出与之相关的典型症状,是其发病的真正原因。

综上所述,对正在进行介入性产前诊断和基因检测的父母进行遗传咨询时,除了常见的染色体畸变外,还应包括罕见的,但在临床上同样重要的相关基因组。高分辨率全基因组扫描技术在临床中的应用将会明显提高不明来源复杂染色体畸变的诊断效率,能够为病因的解释、个体化的诊疗和遗传咨询提供科学合理的遗传学依据。

参考文献

- [1] BALLIF B C, ROREM E A, SUNDIN K, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(24): 2757-2767.
- [2] HOANG S, AHN J, MANN K, et al. Detection of mosaicism for genome imbalance in a cohort of 3,042 clinical cases using an oligonucleotide array CGH platform[J]. *Eur J Med Genet*, 2011, 54(2): 121-129.
- [3] RETHOR M O, LARGET P L, ABONYI D, et al. A case of trisomy for the short arm of chromosome 9: individualization of a new morbidity[J]. *Ann Genet*, 1970, 13(4): 217-232.
- [4] CENTERWALL W R, BEATTY-DESANA J W. The trisomy 9p syndrome[J]. *Pediatrics*, 1975, 56(5): 748.
- [5] FORABOSCO A, PERCESEPE A, SANTUCCI S, et al. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88 965 amniocenteses[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(7): 897-903.
- [6] SHEHAB M I, MAZEN I, BINT S. Tissue-specific mosaicism for tetrasomy 9p uncovered by array CGH[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155(10): 2496-2500.
- [7] 赵艳辉, 庞泓, 冯小静, 等. 来源于 9 号染色体短臂四体的标记染色体的产前诊断[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(2): 189-190.
- [8] MOREIRA L M, FREITAS L M, GUSMFIO F A, et al. New case of non-mosaic tetrasomy 9p in a severely polymalformed newborn girl[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2003, 67(12): 985-988.
- [9] MORRISSETTE J J, LAUFER C A, MEDNE L, et al. Patient with trisomy 9p and a hypoplastic left heart with a trisentric chromosome 9[J]. *Am J Med Genet*, 2003, 123A(3): 279-284.
- [10] NAKAGAWA M, KATO H, AOTANI H, et al. Ebstein's anomaly associated with trisomy 9p[J]. *Clin Genet*, 1999, 55(5): 383-385.
- [11] EL-KHATTABI L, JAILLARD S, ANDRIEUX J, et al. Clinical and molecular delineation of tetrasomy 9p syndrome: report of 12 new cases and literature review[J]. *Am J Med Genet A*, 2015, 167(6): 1252-1261.
- [12] DHANDHA S, HOGGE W A. Three cases of tetrasomy 9p[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 113(4): 375-380.
- [13] NAKAMURA P M, CIMA L C. Sonographic findings in a case of tetrasomy 9p associated with increased nuchal

translucency and dandy-walker malformation[J]. J Clin
Ultrasound, 2009, 37(8): 471-474.

[14] 谢娟, 张建林, 杨益梅, 等. 高通量测序确诊 9p 部分三体
综合征一例[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(6): 852-
855.

[15] BOXILL M, BECHER N, SUNDE L, et al. Choroid plex-
us hyperplasia and chromosome 9p gains[J]. Am J Med
Genet, 2018, 176(6): 1416-1422.

[16] VERHEIJ J B, BOUMAN K, VAN-LINGEN RA, et al.
Tetrasomy 9p due to an intrachromosomal triplication of
9p13-p22[J]. Am J Med Genet, 1999, 86(2): 168-173.

(收稿日期: 2020-10-16 修回日期: 2021-02-18)

• 案例分析 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 14. 046

抗-HIV ELISA 检测窗口期献血者的 1 例追踪随访分析

温丽玲, 梁佩贤, 余玉婷, 卓创近, 招淑文
广东省佛山市中心血站, 广东佛山 528000

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 窗口期; 核酸检测; 随访分析
中图法分类号: R512. 91 文献标志码: C 文章编号: 1672-9455(2021)14-2141-03

获得性免疫缺陷综合征是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所导致的以免疫系统功能缺陷为特征的致命性疾病。输血是 HIV 传播的重要途径之一, 采供血机构开展 HIV 抗原抗体等检测后, 输血安全性有了较大的提高, 但由于酶联免疫吸附试验(ELISA)检测窗口期漏检、病毒变异、试剂的灵敏度低、免疫静默感染和人工失误等原因^[1], 仍然存在输血传播 HIV 的残余风险。本血站在进行常规血液筛查时发现, 某献血者的 ELISA 检测各项指标均为阴性, 6 人份混样核酸检测(NAT)结果为 HIV-RNA 反应性, 在征得献血者的知情同意后, 先后进行了 4 次追踪检测, 免疫印迹法由早期的阴性、不确定到后期确认为 HIV-1 抗体阳性, 最终确证该献血者为 1 例低浓度 HIV 窗口期献血者, 现将该献血者的追踪检测情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 无偿献血者, 男, 50 岁, 工人, 离异。2018 年 4 月 22 日在本站捐献机采血小板 2 个治疗量。采用真空管留取献血者静脉血 3 管, 分别用于核酸检测、ELISA 检测和单采血小板捐献前的血型、血常规、丙氨酸氨基转移酶检测, 用于核酸检测的标本管 4 h 内离心, 保存于 2~8 ℃ 冰箱。

1.2 仪器与试剂 ELISA 检测采用全自动酶免加样仪(Microlab STAR 8CH, 瑞士 Hamilton 公司); 全自动酶免后处理器(FAME 24/20, 瑞士 Hammer 公司); 核酸定性检测采用 Cobas's 201 核酸血液筛查系统(瑞士罗氏公司); 核酸定量检测采用 CAP/CTM 96 全自动病毒载量检测系统(瑞士罗氏公司); 免疫印迹法使用 Tecan PROFIBLOTT48 非温控全自动蛋白印迹仪; 抗-HIV ELISA 检测试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司); HIV-Ag/Ab ELISA 检测试剂盒(美国伯乐公司); MPX v2.0-HIV(1+2 型)PCR 荧光法核酸检测试剂盒(瑞士罗氏公司); 核酸定量检测试剂 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 test, version 2.0(瑞士罗氏公司); HIV 抗体确认采用 HIV 1+2 型抗体检测试剂盒(免疫印迹法, 新加坡安倍生物医学亚太私人有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 检测策略 血液标本进行一遍国产试剂、一遍进口试剂的 ELISA 检测, 对于检测结果为双试剂阴性和单试剂反应性的标本, 进行瑞士罗氏 MPX v2.0 HIV(1+2 型)PCR 荧光法核酸检测, 按照罗氏核酸检测系统要求, 为 6 人份混检模式。对有反应性的 6 混样标本进行拆分, 拆分后判断标本有无反应性; 对于检测双试剂反应性的标本送佛山市疾病预防控制中心进行确认试验。

1.3.2 献血者 HIV 阳性确认 对 ELISA 双试剂反应性、ELISA 双试剂无反应性或者 ELISA 单试剂反应性而核酸定性有反应性的标本送佛山市疾病预防控制中心进行 HIV 抗体确认试验。

1.3.3 献血者追踪检测 在征得献血者知情同意后, 于初次献血后每间隔一周随访追踪和采集标本, 并对每次采集的标本进行 HIV 抗原/抗体 ELISA 检测和核酸的定性、定量检测及 HIV 确证试验。

1.3.4 T 淋巴细胞计数检测 在 HIV 抗体确认检测不确定时, 对随访标本进行 T 淋巴细胞计数检测。

2 结果

献血者追踪检测 对献血者采取间隔一周随访, 追踪随访结果。献血者从献血初次检测 ELISA 双试剂阴性、NAT 阳性、病毒载量为 48 copy/mL, 1 周后随访, 进口 4 代试剂 HIV-Ag/Ab 转为阳性、病毒载量迅速上升至 1.15×10⁶ copy/mL; 2 周后随访, 国产 4 代试剂 HIV Ag/Ab 转为阳性、病毒载量上升至>