

# 无创胚胎植入前非整倍体筛查的诊断有效性分析

贾磊<sup>1</sup>, 陈静波<sup>1</sup>, 郭映纯<sup>1</sup>, 何姝婧<sup>1</sup>, 张志强<sup>1</sup>, 苏文龙<sup>1</sup>, 宫晓<sup>2</sup>, 方丛<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东广州 510655; 2. 广东药科大学公共卫生学院流行病学与生物统计学教研室, 广东广州 510006)

**摘要:**【目的】探讨无创胚胎植入前非整倍体筛查(niPGT-A)的诊断有效性。【方法】收集并再次分析了2018年7月到2019年7月期间,在中山大学附属第六医院生殖医学中心因染色体相互易位,或罗氏易位经首次滋养层细胞(TE)活检(TE1)行植入前,遗传学检测被诊断为非整倍体或嵌合的患者捐献胚胎24枚。解冻捐赠胚胎行滋养层细胞活检(TE2)、内细胞团活检(ICM)并收集囊胚培养液/囊胚腔液(BCM/BF)通过高通量测序技术获得遗传信息。以ICM的结果为胚胎真实染色体结果,比较TE1、TE2及BCM/BF的核型一致性。【结果】TE1、TE2及BCM/BF与相应的ICM的核型一致性分别为66.7%,87.5%和79.2%( $P>0.05$ ),任意两组之间的差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。【结论】利用囊胚培养液/囊胚腔液中的游离DNA行无创胚胎植入前非整倍体筛查可以获得与同期活检的TE2和ICM相似的诊断有效性。

**关键词:**无创胚胎植入前非整倍体筛查;囊胚培养液/囊胚腔液;滋养层细胞活检

中图分类号:R711.6 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)01-0073-08

## Diagnostic Efficiency of Noninvasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy

JIA Lei<sup>1</sup>, CHEN Jing-bo<sup>1</sup>, GUO Ying-chun<sup>1</sup>, HE Shu-jing<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, SU Wen-long<sup>1</sup>,  
GONG Xiao<sup>2</sup>, FANG Cong<sup>1</sup>

(1. Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; 2. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: FANG Cong; E-mail: fangcong@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the diagnostic efficiency of noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (niPGT-A).【Methods】A total of 24 blastocysts diagnosed as aneuploid or mosaic by initial trophectoderm biopsy (TE1) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) were donated by 11 couples with reciprocal translocation or Robertsonian translocation. All the PGT cycles were performed at Center for Reproductive Medicine in the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from July 2018 to July 2019. The 24 frozen-thawed blastocysts were reanalyzed by trophectoderm re-biopsy (TE2), inner cell mass (ICM) biopsy and collection of spent blastocyst culture medium/blastocoel fluid (BCM/BF) using Next Generation Sequencing (NGS) platform. With the corresponding ICM result as the actual chromosomal status, the karyotype concordances with corresponding ICM were compared among TE1, TE2 and BCM/BF sampling.【Results】The karyotype concordance rates of TE1, TE2 and BCM/BF with their corresponding ICM were 66.7%, 87.5% and 79.2%, respectively ( $P>0.05$ ). No statistically significant difference was found between any two groups ( $P>0.05$ ).【Conclusions】niPGT-A by using BCM/BF could achieve similar diagnostic efficiency as TE2-biopsy PGT-A and ICM-biopsy PGT-A.

收稿日期:2020-09-22

基金项目:国家自然科学基金(81871214,81801449);国家重点研发计划(2017YFC1001603);广东省医学科学技术研究基金(A2020226)

作者简介:贾磊,博士研究生,主管技师,研究方向:早期胚胎发育,E-mail: jialei7@mail.sysu.edu.cn;方丛,通信作者,主任医师,博士生导师,E-mail: fangcong@mail.sysu.edu.cn

**Key words:** noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (niPGT-A); blastocyst culture medium/blastocele fluid (BCM/BF); trophoctoderm biopsy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(1):73-80]

胚胎植入前非整倍体筛查(preimplantation genetic testing for aneuploidy, PGT-A)是指在体外受精助孕时,对植入前胚胎进行染色体非整倍性及染色体拷贝数变异(copy number variants, CNV)检测,从而筛选正常的胚胎移植入子宫的一种早期筛查方法。传统的PGT仍需通过胚胎活检来获取卵裂球或滋养层细胞(trophoctoderm, TE)样本行遗传学检测,而这种有创操作可能会影响胚胎的发育潜能及临床结局<sup>[1-2]</sup>;临床TE活检样本仅在整条染色体非整倍体胚胎中具有很好的预测价值,而对于染色体片段性非整倍体胚胎<sup>[3]</sup>或嵌合体胚胎<sup>[4]</sup>其预测价值则大幅下降。低水平嵌合已被证实是人类早期胚胎发育过程中普遍存在的现象<sup>[5]</sup>,因此1~2个卵裂球或5~10个TE细胞常常无法准确的预测最终发育成胎儿部分的内细胞团(inner cell mass, ICM)的真实染色体状态<sup>[6]</sup>。既往研究<sup>[7-9]</sup>报道,移植经TE活检诊断为“异常”的胚胎仍有健康活产。因此,传统PGT-A技术的安全性及结果的可靠性是生殖医学领域亟待解决的难题之一。近年来,囊胚培养液及囊胚腔液中游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)的发现为无创植入前胚胎遗传学检测(non-invasive preimplantation genetic testing, niPGT)的临床应用提供了可能。2013年Stigliani等<sup>[10]</sup>首次在胚胎培养液滴中成功检测到基因组DNA和线粒体DNA;同年,Palini等<sup>[11]</sup>证实在囊胚腔液中存在的胚胎源性cfDNA可以用来诊断性连锁疾病。虽然无创胚胎植入前非整倍体筛查(non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy, niPGT-A)技术应用于临床已有活产的报道<sup>[12]</sup>,但是迄今为止cfDNA是否可以获得与传统TE活检类似的诊断有效性仍在不断验证中。Yeung等<sup>[13]</sup>比较了168个胚胎的TE及相应胚胎培养液(spent culuture medium, SCM)的核型一致性,结果显示TE和SCM在常染色和性染色体的核型一致性分别为62.1%和82.4%。Huang等<sup>[14]</sup>对52枚捐赠囊胚的再次分析显示,niPGT-A在预测胚胎的染色体倍性和拷贝数的方面均优于TE。然而,既往研究均以剩余胚胎<sup>[14-15]</sup>或TE<sup>[13,16]</sup>作为标准来衡量niPGT-A诊断的有效性,

缺乏ICM作为金标准的研究。除此以外,培养液中母源细胞的污染也是限制cfDNA临床应用的重要环节。本研究拟再次分析首次活检(TE1)诊断为非整倍体或嵌合的患者捐献胚胎,获取胚胎的内细胞团(ICM)、另一部位的滋养层细胞(TE2)及cfDNA(BCM/BF)样本,以ICM的结果为胚胎的真实染色体结果,分别比较TE1、TE2及BCM/BF样本的核型一致性,探讨囊胚培养液/囊胚腔液来源的cfDNA在无创植入前胚胎染色体筛查中的诊断有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究收集并再次分析了2018年7月到2019年7月期间,在中山大学附属第六医院生殖医学中心行植入前遗传学检测(preimplantation genetic test, PGT)被诊断为非整倍体或嵌合的患者捐献胚胎24枚。捐献胚胎来自11对因夫妻一方罗氏易位( $n=5$ )和相互易位( $n=6$ )行植入前遗传学检测(PGT for chromosomal structural rearrangements, PGT-SR)的夫妇。所有废弃胚胎均为患者自愿捐赠用于科学研究并全部签署了正式的书面知情同意书;本研究经中山大学附属第六医院生殖医学伦理委员会批准收集废弃标本(批件号:2017ZSLYEC-015S)及患者临床资料(批件号:2017ZSLYEC-016S)用于科学研究。

### 1.2 常规胚胎培养及囊胚活检

采用G5系列(Vitrolife, 瑞典)序贯培养基在37℃、体积分数为6%CO<sub>2</sub>培养箱中行胚胎培养。在D5/D6天,按照Gardner标准<sup>[17]</sup>对囊胚进行形态学评分,对于评分 $\geq 4$  BB的囊胚行囊胚活检。囊胚滋养层细胞的活检方法参考《胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识》<sup>[18]</sup>,即采用30 μm的活检针(TPC 澳大利亚)配合激光法(ZIOLS-tkTM, Hamilton 美国)吸取5~10个滋养层细胞。活检完毕,立即将活检样本转移至含5 μL细胞裂解液的无RNA酶-DNA酶的PCR管(XK043, 亿康基因)

中,离心后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。活检后的囊胚按照产品说明书的要求行玻璃化冷冻(VT101,日本加藤),单个胚胎冷冻保存。第一次滋养层细胞活检的样本为TE1。TE1诊断为非整倍体或嵌合的胚胎经患者签字放弃并同意捐赠科研以后解冻并收集囊胚培养液、行内细胞团活检及滋养层细胞二次活检。

### 1.3 解冻患者捐献胚胎并收集 BCM/BF、ICM 及 TE2 样本

按本中心既往报道<sup>[19]</sup>解冻患者捐献的废弃胚胎24枚。解冻后囊胚置于平衡过夜的 $15\text{ }\mu\text{L}$ 滴的G2培养液滴中单独培养,且每个胚胎均匹配一个没有接触过胚胎的空白对照液滴。15 h以后,在细胞的连接处采用激光行人工皱缩以帮助囊胚腔液中的cfDNA释放到囊胚培养液滴中,以获得足够多的用于检测的cfDNA片段<sup>[20]</sup>。人工皱缩6 h后将胚胎转移至活检操作皿中,并收集 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的囊胚培养液滴及空白对照液滴,分别置于含有 $5\text{ }\mu\text{L}$ 细胞裂解液的无RNA酶-DNA酶的PCR管中,离心置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存(BCM/BF)。为避免样本间的交叉污染,所有胚胎转移及样本收集均专管专用。分别活检所有的24枚囊胚以获得内细胞团(ICM)样本及另一个部位的TE样本(TE2)。ICM的活检方法参考既往文献报道<sup>[21]</sup>;TE2的活检方法同TE1活检,但是由于捐赠的异常胚胎不再用于移植,TE2获取的细胞数 $>10$ 个。

### 1.4 全基因组扩增及高通量测序

全部TE1、TE2及ICM样本均采用多次退火环状循环扩增技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)进行全基因组扩增及建库(ChromInst, XK-008-024 亿康基因);BCM/BF样本采用NICSInt技术一步法行全基因组扩增和建库(XK-005-024 亿康基因)。扩增后的样本外送至亿康基因公司,采用Illumina HiSeq 2500高通量测序平台进行二代测序<sup>[14]</sup>,每个样本可以获得大约2 M的原始数据用以生信分析。对于行PGT-SR患者的TE1样本,第一阶段先行植入前非整倍体筛查(Preamplantation genetic testing for aneuploidy, PGT-A),即只有整倍体胚胎才能进入下一阶段的携带者筛查。本研究入组的24枚胚胎均为第一阶段报出为非整倍体或嵌合的异常胚胎,因此本研究只讨论所有样本的染色体筛查的结果。

### 1.5 胚胎整倍体、非整倍体和嵌合的报出

在参考国际胚胎植入前遗传学诊断协会(Preamplantation Genetic Diagnosis International Society, PGDIS)对于诊断染色体嵌合建议的基础上<sup>[22]</sup>,为了提高诊断的准确性、降低假阳性率,我们报告染色体嵌合的标准为:Chr13、16、18及21染色体 $\geq 30\text{ M}$  30%~70%的嵌合;Chr 19染色体 $\geq 50\text{ M}$  50%~70%的嵌合;其余染色体 $\geq 40\text{ M}$  40%~70%的染色体嵌合。超过上限值的嵌合被认为是非整倍体胚胎,低于下限值被认为是整倍体胚胎。

### 1.6 观察指标

为了了解同一胚胎不同来源样本对于胚胎染色体情况预测的准确性,我们比较了TE1、TE2及BCM/BF结果的核型一致性。核型一致性是指以ICM的结果为胚胎染色体的金标准,检测出同样的异常染色体,特别是对目标染色体的检出。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。入组的女性患者的年龄呈正态分布,采用均数( $S$ )表示;对核型一致性以率( $\%$ )表示,TE1与ICM、TE2与ICM及BCM/BF与ICM组间一致率的比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 入组患者的核型情况及捐赠胚胎情况

本研究共入组11对夫妇捐赠的24枚囊胚,其中包含18枚D5和6枚D6。患者双方的染色体核型结果及捐赠胚胎的情况如表1所示。11位女性患者的年龄平均 $30.5(S=2.6)$ 岁。

### 2.2 TE1、TE2、BCM/BF及ICM的检测结果

全部24个囊胚共96个样本均扩增成功,且24个BCM/BF的空白阴性对照样本均无DNA的检出。全部检测的结果如表2所示。由于ICM是未来会发育成胎儿的部分,因此ICM的结果被认为是胚胎真实的核型结果,TE1、TE2及BCM/BF的结果都与相应的ICM进行比较。在表2中,与ICM核型一致的结果字体部分被加粗。例如,01号胚胎TE1的核型与相应的ICM一致,而TE2和BCM/BF的结果与相应的ICM不一致。12、14和16号胚胎的TE1结果为嵌合,而TE2、BCM/BF和ICM的结果均为整倍体胚胎,因此TE1结果为假阳性(表2,下划线表示)。除此以外,我们发现19号胚胎BCM/BF结果

表1 捐赠胚胎夫妻双方的核型结果  
Table1 Karyotypes of couples who donated embryos for re-analysis

Female karyotype	Male karyotype	Number of couples	No. of embryos	Number of donated embryos
46, XX	46, XY, t(7; 17)(q11.21; q25)	1	01, 02	2
46, XX, t(1; 2)(p32; p11.2)	46, XY	1	03, 04	2
46, XX	46, XY, t(4; 21)(p12; q22), 13pstk+	1	05, 06	2
46, XX	46, XY, t(1; 5)(q36.1; q22)	1	07, 08	2
46, XX, t(5; 12)(q11.2; p11.2)	46, XY	1	09, 10	2
46, XX	46, XY, t(3; 11)(p23; q13.3)	1	11	1
45, XX, der(13; 14)(q10; q10)	46, XY	1	12, 13	2
46, XX	45, XY, der(13; 14)(q10; q10)	2	14~16	3
45, XX, der(13; 14)(q10; q11)	46, XY	2	17~24	8
Total		11		24

的性别与其他3个样本均不一致,可能是母源DNA污染所致(表2,上角标表示)。

### 2.3 组间核型一致性的比较

如表3所示, TE1、TE2及BCM/BF与相应的ICM的核型一致性分别为66.7%, 87.5%, 79.2%(全部,  $P>0.05$ ), 任意两组之间的差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

无创胚胎染色体筛查开创了胚胎植入前遗传学检测的新纪元。通过对同一胚胎不同部位、不同来源的样本核型结果的比较,我们发现对于TE1诊断为非整倍体或嵌合的捐献胚胎,利用囊胚培养液/囊胚腔液中的cfDNA行无创植入前胚胎非整倍体筛查可以获得与同期活检的TE2和ICM相似的临床诊断有效性。

既往关于囊胚培养液或囊胚腔液中cfDNA行niPGT-A的诊断有效性的研究均以剩余胚胎或TE的结果作为金标准<sup>[12-13, 15-16, 23]</sup>。然而,由于胚胎嵌合<sup>[5, 24]</sup>及自我更新机制<sup>[25]</sup>的存在,混杂了滋养层细胞及内细胞团细胞的剩余胚胎并不能准确的反映胎儿部分的染色体情况<sup>[7, 23, 26-27]</sup>。只有活检胚胎的多个位点特别是ICM部分才能够更加真实、准确的反映胚胎的染色体情况<sup>[28]</sup>。本研究通过再次分析被TE1诊断为非整倍体或嵌合的患者捐献胚胎的

多个TE位点、ICM及囊胚培养液/囊胚腔液cfDNA的核型情况,比较TE与ICM、BCM/BF与ICM的核型一致性,更加准确的反映了无创胚胎染色体筛查的临床诊断有效性。

本研究结果显示, niPGT-A可以获得与TE1、TE2类似的核型一致性。niPGT-A在核型一致性方面的优势主要体现在对胚胎嵌合的识别方面,这与Huang等<sup>[14]</sup>的研究结果相一致。24个捐献胚胎中有3个在TE1时被诊断为嵌合(表2中, 12、14和16号),经过遗传咨询并告知风险后,3对夫妇均签字要求放弃胚胎并捐献给科学研究。我们再次分析了这3枚“异常”胚胎,结果发现TE2、ICM以及niPGT-A的结果均为整倍体,这提示上述3枚胚胎TE1结果可能出现了假阳性。造成TE1结果假阳性的可能原因很多。首先,可能是由于胚胎嵌合及胚胎的自我更新机制。胚胎嵌合是指在胚胎的组成细胞中存在两种或以上不同染色体组成的细胞系<sup>[22]</sup>,即由同一个受精卵发育而来的TE和ICM可能会出现核型不一致的现象。其次,活检操作本身也会增加嵌合的报出<sup>[22]</sup>。活检操作过程中激光的使用会破坏细胞的完整性、造成部分DNA缺失,在建库时出现偏移。除此以外,与比较基因组杂交技术(array comparative genomic hybridization, aCGH)<sup>[8]</sup>技术相比,NGS对于低水平嵌合的检出会更为敏感<sup>[29-30]</sup>。作为介于正常与异常之间的整倍体/非整倍体嵌合胚胎,如何准确把握嵌合报出的

表2 TE1、TE2、BCM/BF 及 ICM 的检测结果

Table 2 Results from TE1 biopsy, TE2 biopsy, BCM/BF and ICM biopsy

No. of embryos	TE1	TE2	BCM/BF	ICM
01	<b>+7q(q11.21→q36.3,~96M,×3)</b> <b>-17q(q25.1→q25.3,~10M,×1)</b>	+7q(×3) -	+7q(×3) -	+7q(q11.23→q34,~65Mb,×3) -17q(q25.1→qter,~10.0Mb,×1)
02	<b>-7q(q11.21→q36.3,~96M,×1),</b> <b>+17q(q25.1→q25.3,~10M,×3)</b>	-7q(×1) -	-7q(×1) <b>+17q(q24.3→q25.3,~10Mb,×3)</b>	-7q(×1) +17q(q11.2→q21.31,~17Mb,×4)
03	<b>-1p(p36.33→p32.3,~53M,×1)</b> <b>+2p(×4), +2q(×3)</b>	<b>-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1)</b> <b>+2p(×4), +2q(×3)</b>	<b>-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1)</b> <b>+2p(pter→p12,~76Mb,×4)</b> <b>+2q(×3)</b>	-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1) +2p(×4), +2q(×3)
04	<b>-1p(p36.33→p32.3,~53M,×1)</b> <b>+2p(pter→p12,~84M,×3)</b> <b>+16(×3)</b>	<b>-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1)</b> <b>+2p(×3)</b> <b>+16(×3)</b>	<b>-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1)</b> <b>+2p(p25.1→p12,~76Mb,×3)</b> <b>+16(×3)</b>	-1p(p36.32→p32.3,~50Mb,×1) +2p(×3) +16(×3)
05	+4p(×3), +4q(q13.3→q35.2,~117M,×3, mos, ~60%) <u>-21q(q21.3→qter,~17.4M,×1)</u> <u>-Xq(q21.1→q28,~78M,×1, mos, ~60%)</u>	<b>+4p(×3)</b> <b>-21q(q21.3→q22.2,~11Mb,×1)</b>	<b>+4p(p16.1→p15.2,~18Mb,×3)</b> <b>-21q(q21.3→q22.2,~11Mb,×1)</b>	+4p(×3) -21q(q21.3→q22.2,~11Mb,×1)
06	<b>+4q(×3)</b> <b>-21q(q11.2→q21.3,~16.2M,×1)</b>	<b>+4q(×3)</b> <b>-21q(q11.2→q21.3,~16Mb,×1)</b>	<b>+4q(q12→q28.3,~86Mb,×3, mos, ~60%),</b> <b>+4q(q28.3→q35.2,~52Mb,×3)</b> <b>-21q(q11.2→q21.3,~16Mb,×1)</b>	+4q(×3) -21q(q11.2→q21.3,~15Mb,×1)
07	<b>-1p(p36.33→p36.21,~14.8M,×1)</b> <b>+5q(q23.2→q35.3,~57M,×3)</b>	<b>-1p(p36.32→p36.21,~12Mb,×1)</b> <b>+5q(q23.2→q35.3,~58Mb,×3)</b>	+5q(q23.2→q31.1,~11Mb,×3) +5q(q31.1→q35.2,~40Mb,×3) <b>+8q(q22.2→q24.3,~41Mb,×3, mos, ~60%)</b>	-1p(p36.32→p36.21,~11Mb,×1) +5q(q23.2→q35.3,~57Mb,×3)
08	<b>+8(×3)</b>	<b>+8(×3)</b>	<b>+8q(q22.2→q24.3,~41Mb,×3, mos, ~60%)</b>	+8(×3)
09	-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1) +12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)	-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1) +12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)	<b>-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1, mos, ~60%)</b>	-5q(q14.3→q31.2,~57Mb,×1) -5q(q32→q34,~22Mb,×1)
10	2q(q14.2→q31.2,~58Mb,×1, mos, ~70%), 2q(q33.3→q37.3,~35Mb,×1) -5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1) +12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)	<b>-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1)</b> <b>+12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)</b>	<b>-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1) +12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)</b>	-5q(q13.2→q35.3,~110Mb,×1) +12p(p13.33→p12.3,~18Mb,×3)
11	<b>-3p(p26.3→p24.1,~29Mb,×1)</b> <b>+11q(q13.5→q25,~59Mb,×3)</b>	<b>-3p(p26.3→p24.1,~29Mb,×1)</b> <b>+11q(q13.4→q25,~59Mb,×3)</b>	<b>-3p(p26.3→p24.1,~29Mb,×1)</b> <b>+11q(q13.4→q25,~59Mb,×3)</b>	-3p(p26.3→p24.1,~29Mb,×1) +11q(q13.5→q25,~58Mb,×3)
12	<u>46,XY,-5(×1, mos, ~40%)</u>	<b>46,XY</b>	<b>46,XY</b>	46,XY
13	<b>+1(×3)</b>	<b>+1(×3)</b>	<b>+1(×3)</b>	+1p(×3), +1q(×3, mos, ~70%)
14	<u>46,XX,-Xq(×1, mos, ~30%)</u> <u>+18q(×3, mos, ~30%)</u> <u>+21(×3, mos, ~30%)</u>	<b>46,XX</b>	<b>46,XX</b>	46,XX
15	<b>-16(×1)</b>	<b>-16(×1)</b>	<b>-16(×1)</b>	-16(×1)
16	<u>46,XX,-Xq</u> <u>(q23→q28,~41M,×1, mos, ~50%)</u>	<b>46,XX</b>	<b>46,XX</b>	46,XX
17	<b>+13(×3)</b>	<b>+13(×3)</b>	<b>+13(×3)</b>	+13(×3, mos, ~70%)
18	<b>-14(×1)</b>	<b>-14(×1)</b>	-14(×1), -X(×1)	-14(×1)
19	<b>47,XY, +13(×3)</b>	<b>47,XY, +13(×3)</b>	46, XX, -Xp (×1, mos, ~50%) <sup>1)</sup>	47,XY, +13(×3)
20	<b>+22(×3)</b>	<b>+22(×3)</b>	-1p(p31.1→p13.3,~30Mb,×1), -1q(q31.1→q41,~32Mb,×1), -2q(q32.1→q37.1,~47Mb,×1), +4q(q22.3→q31.22,~51Mb,×3, mos, ~60%) +22(×3)	+22q(q11.22→q12.3,~15Mb,×3)
21	+10p(p15.3→p11.22,~34M,×3) -10q(×1)	<b>-10q(×1)</b>	<b>-10q(×1)</b>	-10p(×1, mos, ~50%) -10q(×1)
22	+9p(×3, mos, ~60%) -13(×1)	<b>-13(×1)</b>	<b>-13(×1)</b>	-13(×1)
23	<b>+13(×3)</b> <b>+16(×3)</b>	<b>+13(×3)</b> <b>+16(×3)</b>	<b>+13(×3)</b> <b>+16p(×3, mos, ~60%)</b> <b>+16q(×3, mos, ~70%)</b>	+13(×3) +16(×3)
24	<b>-13(×1)</b>	<b>-13(×1)</b>	<b>-13(×1)</b>	-13(×1)

TE, trophoctoderm; BCM/BF, blastocyst culture medium/blastocoe fluid; ICM, inner cell mass; The karyotype results in blond font represent the karyotype concordance with corresponding ICM; the underline indicates the false positives in TE1 results; <sup>1)</sup> indicates the gender discrepancy.

表3 比较TE1、TE2、BCM/BF与相应ICM的核型一致性  
Table 3 Comparison of karyotype concordance among TE1, TE2, BCM/BF and ICM samples

	TE1 and ICM	TE2 and ICM	BCM/BF and ICM	$\chi^2$	<i>P</i>
Karyotype concordance rate	66.7(16/24)	87.5(21/24)	79.2(19/24)	3.051	0.217

There was no statistically significant difference in karyotype concordance between each two groups (all,  $P>0.05$ ).

cutoff值是植入前遗传学诊断技术的新挑战。国际植入前遗传学诊断学会(PGDIS)推荐的嵌合报出阈值是20%~80%<sup>[29]</sup>。然而有研究表明,移植低比例嵌合(<50%)的胚胎可以获得与移植整倍体胚胎类似的临床结局<sup>[31]</sup>且低水平嵌合是人类早期胚胎发育过程中非常常见的现象<sup>[5]</sup>。因此,为了降低假阳性率和假阴性率,我们参考PGDIS的建议及既往文献报道<sup>[14-15]</sup>,将嵌合报出的阈值设定在40%~70%。

在核型一致性比较中我们发现,TE2均高于TE1。造成这一结果的主要原因我们认为这是由于活检的细胞数不同。在TE1活检时,由于剩余胚胎需要冷冻保存等待移植,我们活检的TE细胞数是严格按照《胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识》的建议控制在5~10个;而在TE2活检时,由于捐赠的废弃胚胎不再用于移植,为了获得更多的来自滋养层细胞的遗传学信息,我们抽取了>10个细胞样本用于检测。也就是说送检的TE细胞数越多,PGT诊断的有效性越高,这也与既往的研究结果相一致<sup>[32]</sup>。

母源性DNA的污染是影响niPGT-A临床应用的主要障碍之一。本研究中所有囊胚培养液/囊胚腔液均来自复苏囊胚,粘附在透明带上的少量颗粒细胞即使经过玻璃化冷冻/解冻及反复的冲洗后仍有1例出现可疑母体颗粒细胞污染的情况(表2中,19号),niPGT-A为46XX而其他均为46XY。在实际临床应用中,对于niPGT-A的结果是46XX的胚胎,如何通过连锁分析判断该结果是否为母源性DNA污染是亟待解决的问题。因此,如何避免母源颗粒细胞的污染以及辨别是否存在母源性污染是未来niPGT-A确保其诊断准确性的重大挑战。除此以外,由于本研究的样本量有限且分析的胚胎均为患者捐献的“异常”解冻囊胚,缺乏正常胚胎的数据,因此本研究具有一定的局限性。

综上所述,采用囊胚培养液/囊胚腔液中的游离DNA行niPGT-A可以获得与同期活检的TE2和ICM相似的临床诊断有效性。

(致谢:感谢苏州亿康医学检验有限公司焦淑静女士对本研究提供的技术支持)

#### 参考文献

- [1] Bar-El L, Kalma Y, Malcov M, et al. Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis[J]. J Assist Reprod Gen, 2016, 33(11): 1449-1457.
- [2] Neal SA, Franasiak JM, Forman EJ, et al. High relative deoxyribonucleic acid content of trophectoderm biopsy adversely affects pregnancy outcomes[J]. Fertil Steril, 2017, 107(3): 731-736.
- [3] Victor AR, Griffin DK, Brake AJ, et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoderm biopsy and blastocyst [J]. Hum Reprod, 2019, 34(1): 181-192.
- [4] Huang J, Yan L, Lu S, et al. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an inner cell mass and different regional trophoderm cells[J]. J Assist Reprod Gen, 2017, 34(4): 487-493.
- [5] Starostik MR, Sosina OA, McCoy RC. Single-cell analysis of human embryos reveals diverse patterns of aneuploidy and mosaicism[J]. Genome Res, 2020, 30(6): 814-825.
- [6] Gleicher N, Metzger J, Croft G, et al. A single trophoderm biopsy at blastocyst stage is mathematically

- unable to determine embryo ploidy accurately enough for clinical use[J]. *Reprod Biol Endocrin*, 2017, 15(1): 33.
- [7] Patrizio P, Shoham G, Shoham Z, et al. Worldwide live births following the transfer of chromosomally "Abnormal" embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2019, 36(8): 1599–1607.
- [8] Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(21): 2089–2090.
- [9] Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, et al. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(7): 805–819.
- [10] Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, et al. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(10): 2652–2660.
- [11] Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid [J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26(6): 603–610.
- [12] Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(42): 11907–11912.
- [13] Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM) [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2019, 36(8): 1609–1621.
- [14] Huang L, Bogale B, Tang Y, et al. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(28): 14105–14112.
- [15] Jiao J, Shi B, Sagnelli M, et al. Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(7): 1369–1379.
- [16] Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(3): 510–519.
- [17] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1155–1158.
- [18] 胚胎植入前遗传学诊断筛查专家共识编写组. 胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(2): 151–155.
- Consensus of experts on preimplantation genetic diagnostic screening. Consensus among experts on preimplantation genetic diagnosis/ screening technology [J]. *Chin J Med Genet*, 2018, 35(2): 151–155.
- [19] Fang C, Huang R, Wei LN, et al. Frozen-thawed day 5 blastocyst transfer is associated with a lower risk of ectopic pregnancy than day 3 transfer and fresh transfer [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): 655–661.
- [20] Fang C, Yue CM, Huang R, et al. Pregnancy outcomes of blastocysts cultured overnight after thawing. [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 293(6): 1347–1356.
- [21] Xu J, Li Y, Xu Y, et al. A simple and effective method for the isolation of inner cell mass samples from human blastocysts for gene expression analysis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50(3): 232–236.
- [22] Cram DS, Leigh D, Handyside A, et al. PGDIS Posi-

- tion Statement on the Transfer of Mosaic Embryos 2019[J]. *Reprod Biomed Online*, 2019: e1-e4.
- [23] Popovic M, Dheedene A, Christodoulou C, et al. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(7): 1342-1354.
- [24] Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2016, 33(11): 1439-1444.
- [25] Gleicher N, Barad DH. Not even noninvasive cell-free DNA can rescue preimplantation genetic testing [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(44): 21976-21977.
- [26] Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos [J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(5): 1107-1112.
- [27] Ou Z, Chen Z, Yin M, et al. Re-analysis of whole blastocysts after trophectoderm biopsy indicated chromosome aneuploidy [J]. *Hum Genomics*, 2020, 14(1): 3.
- [28] Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? [J]. *Hum Reprod Update*, 2020, 26(1): 16-42.
- [29] Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(6): 1414-1419.
- [30] Wells D, Kaur K, Grifo J, et al. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation [J]. *J Med Genet*, 2014, 51(8): 553-562.
- [31] Spinella F, Fiorentino F, Biricik A, et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments [J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(1): 77-83.
- [32] Zhang S, Luo K, Cheng D, et al. Number of biopsied trophectoderm cells is likely to affect the implantation potential of blastocysts with poor trophectoderm quality [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(5): 1222-1227.

(编辑 余菁)