

双胎妊娠中无创产前检测的胎儿游离 DNA 浓度特征及检测失败原因分析

钟佳通 胡亮 温丽娟 李双武 陈晓杭 裴元元 刘维强*

(深圳市龙岗区妇幼保健院/汕头大学医学院龙岗妇幼临床学院 中心实验室, 广东 深圳, 518172)

【摘要】 目的 分析双胎妊娠中无创产前筛查检测的胎儿游离 DNA 浓度及检测失败原因, 探讨无创产前基因检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)在双胎妊娠中的筛查效果和临床价值。**方法** 选择 2017 年 11 月至 2023 年 6 月接受 NIPT 产前筛查的 1685 例双胎孕妇和 109784 例单胎孕妇作为研究对象, 对行 NIPT 检测孕妇的血浆中胎儿游离 DNA(cell free fetal DNA, cffDNA)浓度情况和检测失败原因及双胎妊娠对三大目标染色体的筛查效果进行分析。**结果** 1685 例双胎妊娠孕妇中 NIPT 检测成功 1669 例, 检测成功率为 99.05%, 检测失败 16 例, 检测失败率为 0.95%, cffDNA 浓度均在 0.84%~41.22%, 平均循环游离 DNA(cffDNA)浓度为(10.30±4.75)%。109784 单胎妊娠孕妇 NIPT 检测成功 109335 例, 检测成功率为 99.59%, 检测失败总计有 449 例, 检测失败率为 0.41%, cffDNA 浓度均在 0.94%~49.83%, 平均 cffDNA 浓度为(9.52±3.92)%。双胎妊娠孕妇中有 11 例检测结果提示高风险, 筛查阳性率为 0.66%, 其中确诊 7 例, 阳性预测值为 63.63%(7/11)。**结论** NIPT 是双胎妊娠目标染色体筛查的重要手段, 但仍存在假阳性、检测失败等局限性, 其检测失败率高于单胎妊娠。

【关键词】 双胎妊娠, 胎儿游离 DNA 浓度, 无创产前筛查, 产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Characteristics of Fetal Cell-free DNA Fraction and Causes of Failure in Non invasive Prenatal Test for Twin Pregnancy

Zhong Jiatong, Hu Liang, Wen Lijuan, Li Shuangwu, Chen Xiaohang, Pei Yuanyuan, Liu Weiqiang*

The Central Laboratory, Longgang District Maternity & Child Healthcare Hospital of Shenzhen City (Longgang Maternity and Child Institute of Shantou University Medical College), Shenzhen, Guangdong 518172, China

【Abstract】 Objective The aim of this study is to examine the concentration of cell-free fetal DNA and the factors that contributed to the failure of noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancy, as well as to discuss the screening impact and clinical significance of NIPT during twin pregnancy. **Methods** 1,685 twin pregnant women and 109,784 singleton pregnancy women who received NIPT, Shenzhen from November 2017 to June 2023 were selected as the research subjects to test the cffDNA concentration and the reasons for the failure of the test. Screening effect was evaluated for 3 target chromosomes in twin pregnancy. **Results** 1665 pregnant women with twins were successfully tested for NIPT, with a success rate of 99.05%. 16 cases have failed with a rate of 0.95%. The concentration of cffDNA varied from

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.03.005

基金项目: 深圳市自然科学基金基础研究面上项目(JCYJ20210324111810028); 深圳市龙岗区科技创新专项资金医疗卫生技术攻关项目(LGKCYLWS2022013); 深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS2020106)(LGKCYLWS2020157)(LGKCYLWS2021000024).

* 通信作者: 刘维强, Email: liuwq06@126.com

0.84% to 41.22%, with an average concentration of $(10.30 \pm 4.75)\%$. The number of NIPT cases with singleton pregnancy women was 109784, and 109,335 of them were successfully detected, with a success rate of 99.59%. There have been a total of 449 cases of failure testing, with a failure rate of 0.41%. The cfDNA concentration in singleton pregnancy was ranged from 0.94% to 49.83%, with an average concentration of $(9.52 \pm 3.92)\%$. There were 11 screening positive cases detected among the pregnant women with twins, with a screening positive rate 0.66%, of which, 7 cases were confirmed truepositive by invasive prenatal diagnosis. Therefore, the positive prediction value of twin pregnancy screening in our study was 63.63% (7/11). **Conclusion** NIPT can be used as a means for twin pregnancy screening, but there are still limitations such as false positives, test failure, etc. The NIPT failure rates in twin pregnancy is significantly higher than that in singleton pregnancy.

【Key words】 Twin pregnancy; cfDNA; non-invasive prenatal screening; prenatal diagnosis

随着我国全面放开了二胎政策以及辅助生殖技术的不断发展和普及, 双胎妊娠率逐年升高。既往研究显示, 双胎妊娠容易出现流产、早产、胎盘功能不全、胎儿缺氧和染色体异常等问题^[1,2]。双胎妊娠孕妇的产前筛查和咨询极为重要, 尽早发现异常可以提供更好的医疗干预和治疗。无创产前筛查(noninvasive prenatal testing, NIPT)是一种通过高通量测序分析孕妇血液中胎儿游离DNA (cell-free fetal DNA, cfDNA)来筛查胎儿染色体非整倍体异常的高精确度产前筛查技术。目前在临床上被广泛应用于单胎妊娠的13、18、21染色体非整倍体的筛查, 具有很高的灵敏度和特异度(检出率可达98%), 已成为单胎妊娠常规筛查的重要工具^[3-4]。随着全基因组大规模并行测序的快速发展和广泛应用, NIPT对双胎妊娠的筛查也已广泛应用于临床。由于双胎妊娠具有不同于单胎妊娠的独特生物学和遗传特征, NIPT对于双胎妊娠的筛查效果仍有待进一步的探讨和总结^[5]。本研究以在本院接受行NIPT检测孕妇作为研究对象, 分析NIPT双胎妊娠时的检测效率, 并与单胎妊娠的筛查情况作比较, 探讨NIPT在双胎妊娠染色体非整倍体异常筛查的临床价值, 旨在为双胎妊娠的NIPT筛查在临床上的应用和遗传咨询提供更多的参考和理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2017年11月至2023年6月在深圳市龙岗区妇幼保健院行遗传咨询, 选择接受NIPT产前筛查的1685例双胎孕妇和109784例单

胎孕妇。纳入标准: 超声检查显示确定为双胎妊娠的孕妇; 经过遗传咨询并签署知情同意书。排除标准: 夫妇一方已知明确染色体异常; 染色体异常分娩史; 1年内接受过异体输血、移植手术、干细胞治疗或免疫治疗者等; 胎儿超声结果提示有结构异常需行产前诊断; 孕期合并恶性肿瘤; 医生认为有明确影响结果的其他情形。本研究已经通过中国人类遗传资源采集审批(2023SLCJ1401), 并通过医院伦理审批(LGFYYXLLL-2022-024)。

1.2 NIPT检测 采用联合探针锚定聚合测序法试剂盒(华大智造)在BGISEQ-500测序平台进行全基因组大规模平行测序。用EDTA抗凝管抽外周血5 ml, 经低速1500G离心10 min后, 吸取血浆再高速15000G离心10 min后二次分离血浆, 取200 ml血浆应用磁珠吸附法提取游离DNA并纯化, 然后进行末端修复、连接分子标签和PCR构建文库将各样本文库定量混合, 再将混合后的文库进行单链环化DNA、滚环扩增, 加载于芯片上, 最后在BGISEQ-500测序仪上进行联合探针锚定聚合测序。所有NIPT样本的建库过程均未采用DNA富集技术。使用BGI Halos分析系统进行数据分析, 通过序列对比获得每条染色体的有效DNA序列条数, 计算各染色体的Z值, 参照标准化来判断染色体是否异常。使用BGI Halos计算cfDNA浓度。cfDNA浓度低于3.5%、GC含量超过42%、有效数据量低于3.5M或异常染色体数量超过3个被认为检测不合格, 其中第一次采血检测因GC含量超过42%、有效数据量低于3.5M或异常染色体数量

超过 3 个检测失败的进行重建库,再次检测不合格进行第二次重新采血检测。第二次采血仍检测不合格定义为最终检测失败。

1.3 统计学方法 本实验数据采用 R4.3.1 软件进行统计分析,符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,选择两独立样本 t 检验或 Mann-Whilney 秩和检验进行比较;计数资料比较采用 Pearson X 检验或 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。NIPT 检测结果灰区定义为目标染色体 Z 值在[1.96,3)之间。

2 结果

2.1 入组孕妇特征 2017 年 11 月至 2023 年 6 月

在深圳市龙岗区妇幼保健院选择接受 NIPT 检测共计 1685 例双胎妊娠孕妇和 109784 单胎妊娠孕妇,1685 例双胎妊娠孕妇年龄平均值为(30.39±4.73)岁,平均孕周(15.81±2.64)周。109784 单胎妊娠孕妇年龄平均值为(29.39±4.59)岁,平均孕周(16.72±3.13)周。双胎妊娠孕妇的平均年龄大于单胎妊娠孕妇,平均孕周小于单胎妊娠孕妇,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 NIPT 检测情况

2.2.1 检测流程 对纳入本研究的 1685 例双胎妊娠孕妇和 109784 单胎妊娠孕妇行 NIPT 检测,检测流程见图 1。

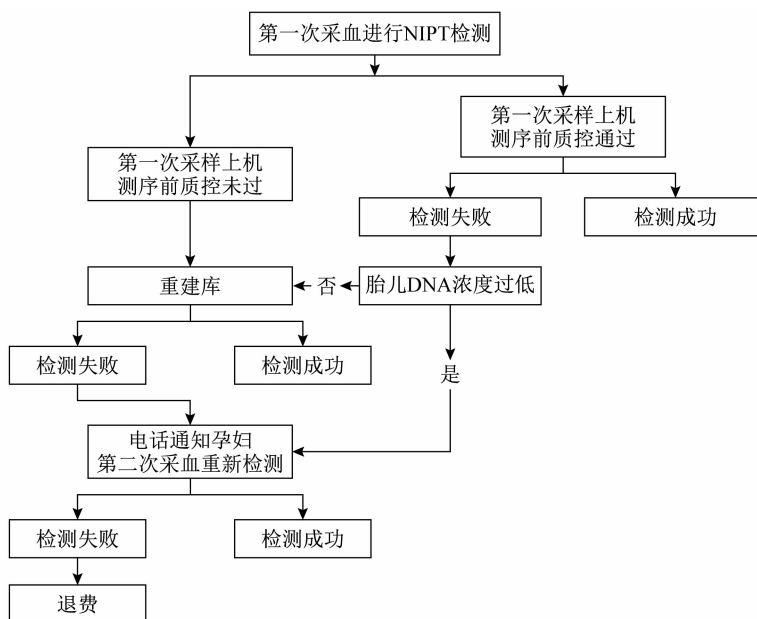


图 1 NIPT 检测流程图

2.2.2 检测完成情况 1685 例双胎妊娠孕妇行 NIPT 检测第一次采样检测成功 1645 例(97.63%, 1645/1685),检测失败 40 例(2.37%, 40/1685),检测失败的原因主要为 cfDNA 浓度过低总计有 35 例(2.07%, 35/1685)。第一次采血检测失败的 40 例双胎妊娠孕妇通知第二次重采血行 NIPT 检测仍然检测失败 16 例(0.95%, 16/1685),其中因 cfDNA 浓度低失败 14 例(0.83%, 14/1685)。最终 1685 例双胎妊娠孕妇中 16 例未能检测成功,最终失败率 0.95%(16/1685)。109784 例单胎妊娠孕妇行

NIPT 检测第一次采样检测成功 108519 例(98.85%, 108519/109784),检测失败 1265 例(1.15%, 1265/109784),检测失败的原因主要为染色体 Z 值处于灰区和胎儿 cfDNA 浓度低,1265 例单胎妊娠孕妇通知第二次重采血行 NIPT 检测仍然检测失败 449 例,其中因 cfDNA 浓度低失败 262 例(0.24%, 262/109784)。最终 109784 例单胎妊娠孕妇中 449 例未能检测成功,最终失败率 0.41%(449/109784),单胎妊娠的最终失败率低于双胎妊娠,差异具有有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,表 2。

2.3 双胎妊娠中的 cfDNA 浓度 双胎妊娠及单胎妊娠孕妇的外周血 cfDNA 浓度整体趋势均随着孕周的增长而升高。在相同孕周下双胎妊娠孕妇的

cfDNA 浓度个体差异性较单胎妊娠更大,且整体 cfDNA 浓度比单胎妊娠的更高 ($P < 0.05$),见图 1A、图 1B。

表 1 1685 例双胎妊娠孕妇 NIPT 检测失败情况

例数	有效数据量不足	多条染色体异常	GC 含量过高	胎儿浓度不足	灰区	总计
重建库(例)	1	1	2	0	15	19
重取样(例)	0	0	0	35	5	40
退费(例)	0	0	0	14	2	16
失败率(%)	0	0	0	0.83	0.12	0.95

表 2 109784 例单胎妊娠孕妇 NIPT 检测失败情况

例数	有效数据量不足	多条染色体异常	GC 含量过高	胎儿浓度不足	灰区	总计
重建库(例)	124	6	66	0	1960	2156
重取样(例)	4	6	5	769	481	1265
退费(例)	1	4	0	262	182	449
失败率(%)	0.0009	0.004	0	0.24	0.17	0.41

本研究 1685 例双胎孕妇外周血 cfDNA 浓度在 0.84%~41.22%,平均 cfDNA 浓度为(10.30±4.75)%。109784 单胎妊娠孕妇外周血 cfDNA 浓度均在 0.94%~49.83%,平均 cfDNA 浓度为(9.52±3.92)%。单胎妊娠的孕妇外周血 cfDNA 浓度分布集中于平均值附近范围,双胎妊娠的孕妇 cfDNA 浓

度分布较单胎妊娠的孕妇更加分散,见图 1C。

35 例双胎妊娠孕妇第一次因 cfDNA 浓度较低($<3.5\%$)导致检测失败,电话通知重取样再次行 NIPT 检测,仍有 14 例因 cfDNA 浓度较低导致检测失败,且这 35 例双胎妊娠孕妇两次采样的整体 cfDNA 浓度变化不大,见图 1D。

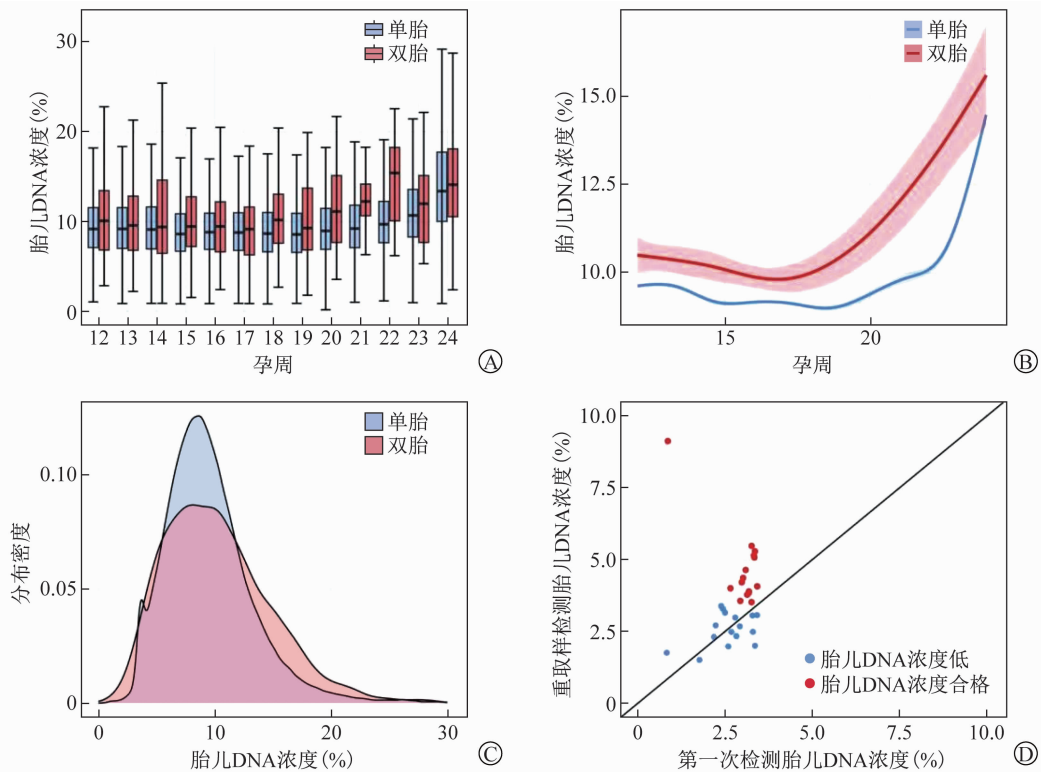


图 2 cfDNA 分析结果

A、B:单胎妊娠和双胎妊娠不同孕周 cfDNA 浓度变化趋势图;

C:单胎妊娠和双胎妊娠 cfDNA 的分布密度图;D:双胎妊娠孕妇两次采样的整体 cfDNA 浓度变化图。

2.4 双胎妊娠孕妇 NIPT 检测结果 1669 例 NIPT 检测成功的双胎妊娠孕妇中,共计 1658 例检测结果提示低风险,随访至出生后三个月,未出现假阴性。11 例检测结果提示高风险,筛查阳性率为 0.66%(11/1669),其中 1 例提示为 13 三体高风险,6 例提示为 18 三体高风险,4 例提示为 21 三体高风险。对 NIPT 提示高风险的双胎妊娠孕妇进行遗传咨询和产前诊断,染色体核型结果显示,确证 1 例 13 三体高风险、3 例 18 三体高风险、3 例 21 三体高风险,阳性预测值分别为 100%、50%和 75%。复合阳性预测值为 63.63%(7/11)未发现漏检的假阴性孕妇,阴性预测值为 100%。

3 讨论

本研究基于大样本量 NIPT 结果,对 1685 例双胎妊娠及 109784 例单胎妊娠中的胎儿游离 DNA 浓度和检测失败原因进行了分析,并进一步探讨了双胎妊娠对三大目标染色体的筛查效果。在本研究基于的研究对象为全妊娠人群,即不具有 NIPT 技术不适用情形的孕妇均被纳入筛查范围。在此基础上获得的人群数据具有更广泛的代表性。

cffDNA 浓度是 NIPT 的重要质控参数^[6],通常通过男胎 Y 染色体比例或利用深度学习算法对母胎游离 DNA 来源分布差异进行建模并预测,如 SeqFF 等^[7]。cffDNA 浓度对于 NIPT 的准确性有至关重要的意义。国内外大量研究表明 cffDNA 浓度高于 3.5%~4%时,NIPT 分析结果才具有意义^[8,9]。本研究使用的 BGI seq500 平台采用 3.5%作为 cffDNA 浓度的质控阈值。影响 cffDNA 浓度的因素较复杂,包括孕周、母体因素、胎儿因素、胎盘因素等^[10]。本研究中的双胎妊娠 cffDNA 浓度呈现三个特点:①cffDNA 浓度总体较单胎妊娠高;②分布较宽;③个体差异较单胎妊娠更大。单双胎妊娠的 cffDNA 浓度在 20 周左右开始均随孕周增加而明显上升,其中双胎妊娠上升的更早。由于胎儿游离 DNA 主要来自胎盘滋养层细胞^[11],胎盘的发育情况和胎盘面积往往与 cffDNA 浓度相关,因此双胎妊娠可具有较高的 cffDNA 浓度。但双胎妊娠中胎盘面积受绒毛膜性的影响,并可能存在胎盘融

合、发育不均等现象,因此双胎妊娠的 cffDNA 浓度分布较宽^[12]。Yang Zhou 等报道发现孕妇外周血 cffDNA 浓度会随孕周增加而升高,但增长速度不一致,从孕 10 周到孕 21 周,cffDNA 浓度每周升高 0.1%,孕 21 周之后每周升高 1%^[13]。本研究进一步发现,双胎妊娠 cffDNA 浓度在 18 周左右即开始明显增高,而单胎妊娠则约在 22 周开始上升,较双胎妊娠更晚。

NIPT 在双胎妊娠中的检测失败总体较单胎妊娠高,标本 cffDNA 浓度不足是检测失败的主要原因。由于 cffDNA 浓度在双胎妊娠中具有较大分布宽度,因此双胎妊娠更易发生 cffDNA 浓度过低。本研究发现相较于单胎妊娠,双胎妊娠因 cffDNA 低而导致检测失败的比例要明显更高。这也是双胎妊娠在临床应用中作为慎用指征的原因之一。Yaron 等的研究显示,NIPT 的检测失败率大约为 0.12%~8.09%^[14]。Palomaki GE 等的一项研究结果显示当孕妇外周血的 cffDNA 浓度<4%时,将会极大的影响 NIPT 的检测,较低的 cffDNA 浓度会加剧 cffDNA 受到母体 DNA 的影响,使得在 NIPT 测序过程中无法准确识别到 cffDNA,导致检测失败^[15]。本研究中 40 例双胎妊娠孕妇在知情同意的情况下进行第二次采血重新行 NIPT 检测,仍有 14 例因 cffDNA 浓度较低而检测失败,成功率与 Kinnings SL 等研究接近^[16]。同时值得注意的是,双胎妊娠较单胎妊娠少发生检测灰区,这一原因尚不完全明确,可能与检测平台所用得到生物信息学算法针对双胎进行了优化所致。除此之外,有效数据量不足和 GC 含量过高也是导致检测失败的原因,主要可能与实验操作有关,通过复查可避免。多染色体异常导致检测失败原因尚不明确,可能于孕妇本人存在体细胞嵌合等因素有关^[17]。

本研究通过随访双胎妊娠产前诊断结果发现,双胎妊娠同样具有的较高的阳性预测与阴性预测值,有良好的临床应用价值。但由于阳性样本量较少,暂无法与单胎妊娠比较。由于双胎妊娠的胎儿游离 DNA 浓度具有上述特点,且检测失败率较高,临床应用时是需向受检者明确这些局限性和可能存在的假阳性、假阴性风险。本研究还存在一些局限

性,例如未探讨双胎妊娠中不同绒毛膜性对胎儿游离DNA及检测失败率的影响,未对假阳性的发生原因进行验证,可在后续研究中进一步完善。

综上,NIPT在双胎妊娠中具有较好的临床应用价值,但更易存在因胎儿游离DNA浓度不足导致检测失败的情形,在临床应用中需向受检者完善知情同意,阐明NIPT在双胎妊娠检测中的局限性。

参考文献

- [1] LIHUA Z, JIANZHENG Y, AIPING M, et al. Clinical Value and Treatment Progress of Prenatal Ultrasonography in Twin Pregnancy: A Systematic Review [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022: 6748487.
- [2] 刘光莲, 董雅娟, 雷飞. 双胎妊娠孕妇体质量指数对妊娠结局及并发症、新生儿体质量的影响[J]. *贵州医药*, 2019, 43(5): 747-748.
- [3] PALOMAKI G E, COSMIN DECIU M S, M S E M K, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study [J]. *Genetics in Medicine*, 2012, 14(3): 296-305.
- [4] ZHANG B, LU B Y, YU B, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood [J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(2): 621-630.
- [5] AVIRAM A, BERGER H, ABDULAZIZ K E, et al. Outcomes Associated With Hypertensive Disorders of Pregnancy in Twin Compared With Singleton Gestations [J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2021, 138(3): 449-458.
- [6] SHAHBAZIAN N, BARATI M, SHOJAEI K, et al. Cell-free Fetal Deoxyribonucleic Acid Results in Low-risk Pregnancy Screenings for Aneuploidies [J]. *Journal of SAFOG*, 2018, 10(4): 249-252.
- [7] IEVA M, CHARLOTTE B, CHRISTINA F, et al. Total number of reads affects the accuracy of fetal fraction estimates in NIPT [J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2021, 9(4): e1653.
- [8] XIYING Y, WEINAN W, LEI D, et al. Noninvasive prenatal testing, ultrasonographic findings and poor prenatal diagnosis rates for twin pregnancies: a retrospective study. [J]. *BMC pregnancy and childbirth*, 2023, 23(1): 351.
- [9] 周俊华. 基于胎儿游离DNA浓度定量降低NIPT假阳性及拓展其检测范围的初步研究[D]. 广州:南方医科大学, 2023.
- [10] ZHAO Q, HUOJIABIEKE J N L, DU S. The influence of fetal gender and maternal characteristics on fetal cell-free DNA in maternal plasma [J]. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 2019, 48(8): 653-656.
- [11] WEI J W, NAN Y L, BIN Q, et al. Cell-free fetal DNA testing and its correlation with prenatal indications [J]. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2021, 21(1): 585.
- [12] SHUNJI S, MIWA I, YUSUKE I, et al. Abnormally shaped placentae in twin pregnancy. [J]. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2010, 281(1): 65-69.
- [13] YANG Z, YINFENG W, PEPRAH F A, et al. Analysis of cell-free fetal DNA in 16,843 pregnant women from a single center in China using targeted sequencing approach [J]. *Placenta*, 2022, 122: 18-22.
- [14] YARON, YUVAL. The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(5): 391-396.
- [15] PALOMAKI G E K E M. Prenatal cell-free DNA screening test failures: a systematic review of failure rates, risks of Down syndrome, and impact of repeat testing [J]. *Genetics in medicine*, 2018, 20(11): 1312-1323.
- [16] KINNINGS, SARAH L, GEIS, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing [J]. *Prenat Piagn*, 2015, 35(8): 816-822.
- [17] JIAZHEN C, QINGWEI Q, XIYA Z, et al. Factors associated with test failure in pregnant women undergoing cell-free DNA-based testing for fetal trisomy. [J]. *Journal of medical screening*, 2021, 28(4): 411-418.

(收稿日期:2023-08-31)

编辑:刘邓浩