

低胎儿 DNA 浓度样本重采血行无创产前检测成功的相关因素分析

吴小娟 贺权泽 张春花 王挺*

(南京医科大学附属苏州医院 生殖与遗传中心 215002)

【摘要】 目的 探讨影响低胎儿 DNA 浓度样本重采血复测成功的相关因素。方法 回顾性收集 2018 年 1 月至 2020 年 12 月期间在南京医科大学附属苏州医院做 NIPT 检测,且首次检测因胎儿 DNA 浓度低检测失败的单胎孕妇的临床资料,根据重采血复测后是否获得有效结果分为成功组和失败组,分析其母体特征、NIPT 检测结果,采用多因素 Logistics 回归分析影响重采血复测成功的因素。结果 因胎儿 DNA 浓度低首次 NIPT 检测失败的样本 157 例,重采血复测后有 94 例(59.87%)样本检测成功获得结果,63 例(40.13%)仍因胎儿 DNA 浓度低检测失败,最终检测失败率 0.138%(63/45500)。比较重采血后成功组和失败组样本信息发现:两组样本的重采血孕周和首次检测的胎儿 DNA 浓度有显著性差异($P < 0.05$),孕周 > 19 周或首次检测胎儿 DNA 浓度 $> 3\%$ 的样本重采血再检测获得有效 NIPT 结果的成功率更高。结论 重采血可以降低 NIPT 检测失败率。重采血孕周和首次检测的胎儿 DNA 浓度是影响重采复测成功的主要因素。临床医生可以结合这两个参数,给孕妇咨询时选择重采血 NIPT 检测、其他筛查还是介入性产前诊断提供参考意见。

【关键词】 无创产前检测; 胎儿 DNA 浓度; 检测失败; 重采血孕周

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

Factors affecting the success rate of the non-invasive prenatal testing redraw and retest due to a low fetal fraction

Wu Xiaojuan, He Quanze, Zhang Chunhua, Wang Ting*

Reproductive and Genetic Center, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu, 215002 China

【Abstract】 **Objective** This study was performed to investigate the factors associated with a successful redraw and retest in these women with initial no-call results due to a low fetal fraction. **Methods** We retrospectively analyzed the data of 157 women who underwent a second blood draw and retest with initial no-call results due to a low fetal fraction from 2018 to 2020 in our center. **Results** Among the 45 500 women who underwent NIPT, low fetal fraction was reported as the cause of NIPT failure in 157 women who perform a second blood draw and retest. 94(59.87%) women with a successful result and 63(40.13%) women still receive an unsuccessful result (no-call results). The final failure rate was 0.138%(63/45,500). Comparison between two groups showed a significant difference in both the first test fetal fraction and redraw gestational age. The probability of obtaining a successful result with a second blood draw and retest increases with higher first test fetal fraction($> 3\%$) and redraw gestational age (> 19). **Conclusions** A second blood draw can reduce failure rate due to a low fetal fraction. The first test fetal fraction and redraw gestational age are two major factors associated with a successful NIPT retest. This should aid in

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.02.006

* 通信作者:王挺,Email:biowt@163.com

the counseling of women who faced with the choice of second blood redraw and retest ,other screening, or an invasive diagnostic test.

【Key words】 noninvasive prenatal testing; fetal fraction; no-call results; redraw gestational age

1997年,Lo等^[1,2]在母体外周血中发现了胎儿游离DNA开启了无创产前诊断的新纪元。无创产前检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)是通过母体外周血中的游离DNA进行高通量测序并结合生物信息学分析,来判断胎儿染色体非整倍体异常的一种非侵入性产前筛查技术。若母血中胎儿游离DNA浓度低则无法正确反映其在各染色体上的分布情况,会影响NIPT检测结果的准确性^[3]。因此实验室将胎儿DNA浓度作为一个重要的质控参数。通常情况下,1%~3%的胎儿DNA浓度无法实现准确检测出胎儿非整倍体染色体异常,且胎儿DNA浓度低于3.5%时,所需要的满足生信分析的唯一匹配的数据量(unique reads)呈指数型增长^[4]。结合筛查结果的准确性和成本因素,本研究检测结果以胎儿DNA浓度<3.5%作为检测失败阈值。对于首次检测因胎儿DNA浓度低无法获得结果的孕妇,给予重采血复测建议。我们对重采血的157例样本信息及两次检测结果进行了追踪分析,挖掘影响重采血检测成功率的因素,为临床咨询丰富证据。

1 对象和方法

1.1 对象 回顾性收集2018年1月至2020年12月期间选择本院做NIPT检测,且首次检测因胎儿DNA浓度低无法出结果的单胎孕妇的临床资料。

1.2 方法

1.2.1 样本采集及处理 孕妇知情同意后,EDTA抗凝管采集其外周血10 ml,4 h内分离血浆,具体流程为:4℃、1600 g离心10 min,取上清血浆,16 000 G离心10 min,分离上清血浆至EP管中。按照试剂盒说明书提取血浆中游离DNA并构建文库,选用胎儿染色体非整倍体试剂盒(T21, T18, T13)试剂盒以高通量测序仪DA8600检测。测序数据经处理后(去低质量、去重复、GC校正等)获得不低于90M的有效reads数(每个样本不低于4M的unique reads)。比对到人类基因组参考序列图谱经生物信息学分析分别计算出目标疾病染色体的Z

值,男胎根据Y染色体唯一比对条数进行胎儿DNA浓度计算^[5],女胎则基于SeqFF算法建立高维回归模型,使用划分为50kb基因组区域的常染色体序列计数来计算^[6]。NIPT检测失败的标准:胎儿DNA浓度<3.5%。

1.2.2 NIPT检测失败后的处理 首次检测胎儿DNA浓度低的样本,首次采血孕周小于19周的孕妇建议19周后回来重采血,孕妇重采血孕周不超过25周。重采血后仍无法获得有效结果的,电话告知孕妇给予全额退费处理并出具具体原因的检测失败报告,同时提供遗传咨询和建议其进行介入性产前诊断。

1.2.3 染色体核型分析和随访 对选择介入性产前诊断的孕妇,经充分告知和知情同意后,抽取羊水或脐血进行染色体核型分析或者染色体微阵列分析检测(CMA)。对所有重采血孕产妇的产前诊断结果、妊娠结局和新生儿情况进行电话随访。

1.3 统计学方法 将研究数据录入Excel表格中进行汇总、整理、统计,应用SPSS 20.0软件进行统计学分析,连续变量用中位数和四分位数表示(IQR),分类变量用数字(*n*)和百分比(%)表示。对连续变量进行正态性检验,符合正态分布的比较采用*t*检验,非正态分布的数据比较采用Mann-Whitney U检验。分类变量采用 χ^2 检验。采用多因素Logistics回归进一步分析单因素确定的显著因素, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NIPT检测结果 45500例选择NIPT检测样本中,与首次采血检测成功组相比,首次采血检测因胎儿DNA浓度低未获得有效结果157例样本的体重指数(BMI)更高($P<0.05$)、孕周和胎儿DNA浓度显著偏低($P<0.05$)(如表1)。首次检测失败率为0.345%(157/45500)。重采血复测后94例(59.87%)孕妇检测成功获得有效结果,63例(40.13%)孕妇仍因胎儿DNA浓度低检测失败无法获得有效结果,NIPT最终失败率0.138%(63/45500)(图1)。

表 1 NIPT 首次采血检测成功组与因胎儿 DNA 浓度低首次检测失败组孕妇特征分析

特征	首次采血检测成功组(n=45 040)	首次采血检测失败组(n=157)	P
首次采血孕周[周, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	17.00(16.00~18.57)	17.00(16.00~18.10)	0.026
孕妇 BMI[kg/m ² , M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	22.66(20.81~24.98)	25.80(23.12~28.66)	<0.05
胎儿 DNA 浓度[%, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	10.19(7.87~13.09)	2.96(2.42~3.25)	<0.05
孕妇年龄[岁, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	31.00(28.00~34.00)	32.00(28.00~35.00)	0.142
T18/T21[例(%)]	241(0.54)	2(1.27)	0.207

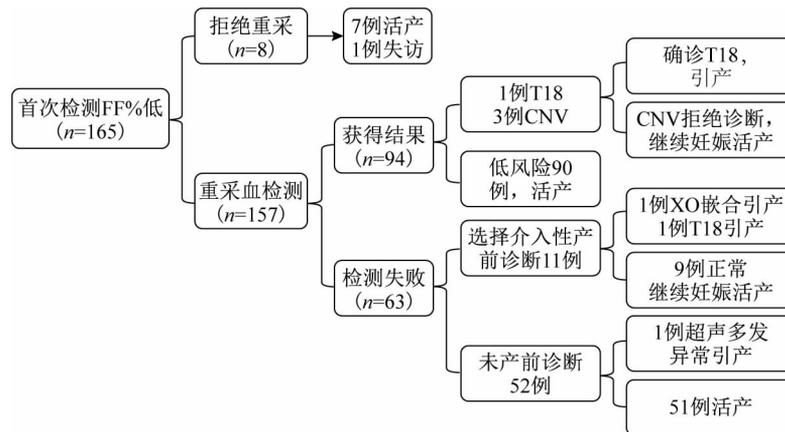


图 1 检测失败病例妊娠结局和随访结果

重采血检测获得有效结果的 94 例孕妇中, NIPT 结果提示 1 例 T18, 3 例 CNV, 经羊水细胞染色体核型分析最终 T18 确诊, 孕妇选择终止妊娠。3 例 CNV 拒绝进一步检测选择继续妊娠, 随访结果新生儿健康状况良好。

2.2 检测失败的随访情况 重采血检测仍失败的 63 例孕妇中, 11 例选择介入性产前诊断, 检出 1 例 45, XO/46, XN 嵌合和 1 例 T18。随访发现 1 例孕妇 23 周大排畸多发畸形, 孕妇选择终止妊娠, 引产后取胎儿组织提取 DNA 行 CMA 检测, 结果显示为 22 号染色体致病性变异。染色体异常结果占比 4.76%(3/63)。其余 51 例随访结果显示新生儿健康

状况良好, 未发现假阴性结果。

2.3 重采血检测失败因素分析 我们将重采血检测的 157 例样本的分为成功组(n=94)和失败组(n=63), 比较两组孕妇的 BMI、年龄、首次采血孕周、重采血孕周、首次检测胎儿 DNA 浓度、重采血间隔天数是否有显著性差异。结果显示:重采血孕周和首次检测胎儿 DNA 浓度的比较, 差异有统计学意义(P<0.05); 成功组的重采血孕周和首次检测胎儿 DNA 浓度均高于失败组(表 2)。将有差异的因子纳入 logistics 回归中, 结果显示:首次检测的胎儿 DNA 浓度和重采血孕周对于 NIPT 重采复测成功的影响有统计学差异(P<0.05)(表 3)。

表 2 157 例重采血样本成功组和失败组孕妇特征分析比较

特征	成功组(n=94)	失败组(n=63)	P
首次采血孕周[周, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	17.14(16.14~18.14)	16.43(15.29~18.14)	0.141
重采血孕周[周, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	18.93(17.71~19.75)	18.14(17.14~19.43)	0.035
首次检测胎儿 DNA 浓度[%, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	3.20(2.97~3.37)	2.87(2.43~3.21)	<0.01
孕妇 BMI-1[kg/m ² , M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	26.24(23.30~29.01)	24.98(22.27~28.26)	0.202
孕妇 BMI-2[kg/m ² , M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	27.36(24.35~30.86)	27.08(23.85~30.29)	0.456
孕妇年龄[岁, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	31.00(28.00~35.00)	33.00(29.00~36.00)	0.573
采血间隔天数[天, M(P ₂₅ ~P ₇₅)]	12.00(8.00~14.25)	10.00(7.00~14.00)	0.112
妊娠方式 [例(%)]			0.216
IVF 例数	15(16)	14(22)	
自然受孕例数	79(84)	49(78)	

注: BMI-1 为首次采血时孕妇体重指数; BMI-2 为重采血时孕妇体重指数。

表3 多因素 logistic 分析影响重采血检测成功率的因素

因素	β	SE	OR(95% CI)	P
重采血孕周(周)	0.209	0.104	1.23(1.005~1.511)	0.044
首次检测胎儿浓度(%)	1.790	0.443	5.99(2.565~13.986)	<0.01

进一步探讨胎儿 DNA 浓度和重采血孕周与重采复测成功率的关系,将孕妇按照不同的浓度梯度进行分组(胎儿 DNA 浓度 <2%、2%~2.49%、2.5%~2.99%、3%~3.49%),发现重采血复测的成功率随着首次检测胎儿 DNA 浓度增加在上升,3%~3.49%浓度组成功率高达 74.2%(图 2)。重采血孕周进行分组分析,发现在 19 周后重采血检测成功率达到 69.12%(图 3)。

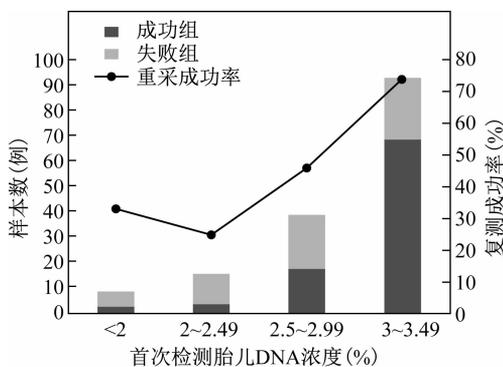


图2 首次检测胎儿 DNA 浓度与复测成功率的关系

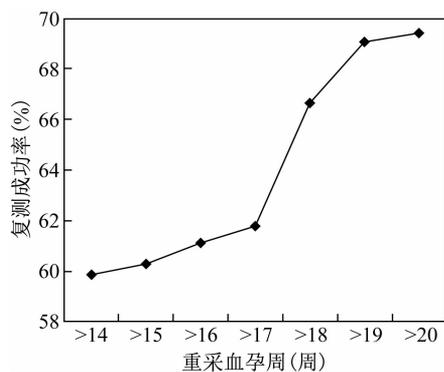


图3 重采血孕周与 NIPT 复测成功率的关系

3 讨论

已有研究发现,NIPT 检测孕妇中因胎儿 DNA 浓度低造成检测失败率占 0.1%~6.1%^[7]。其中 50%~70%的样本在重采血复测后获得成功结果。本研究回顾性分析了 157 例因胎儿 DNA 浓度低选择重采血复测样本,发现重采血后有 59.87%的样本检测成功获得有效结果。略低于 Lin 等^[8]报道的

重采血检测后 63.5%成功率,高于 White 等^[9]的报道。再次表明当第一次 NIPT 检测失败时,重采血再检测是不错的选择^[10-12]。

胎儿 DNA 浓度过低是导致检测失败的最根本原因。大量研究表明,胎儿 DNA 浓度与孕周有很强的正相关性^[13]。Kinnings^[14]等对 14 万份 NIPT 检测结果进行回顾发现,孕 20 周前胎儿 DNA 浓度每周升高 0.1%,孕 20 周后胎儿 DNA 浓度每周升高 1%。本研究中,成功组重采血孕周显著大于失败组($P<0.05$),且随着重采孕周的增大 NIPT 检测成功率随之增加,19 周后重采血的检测成功率高达 69.12%。推迟重采血孕周对提高 NIPT 检测的成功率有一定的帮助,但会延迟胎儿非整倍体诊断的时间,NIPT 检测的孕周越大,风险越高,在孕妇咨询时要充分告知重采血再次检测失败的可能性和相关风险。

首次检测胎儿 DNA 浓度是影响低胎儿 DNA 浓度重采血复测成功与否的关键因素。Benn 等^[15]研究发现当首次检测胎儿 DNA 浓度在 1.5%~2%之间重采血复测成功率仅 27.8%。Lin 等^[8]最新发表的结果也证实首次检测胎儿 DNA 浓度 <2%时,重采血复测成功的概率非常有限。本研究发现,成功组首次检测胎儿 DNA 浓度明显高于失败组($P<0.05$),随着首次检测胎儿 DNA 浓度的增加,重采血检测成功率升高,胎儿 DNA 浓度 >3%时重采血检测成功率为 74.2%。所以对胎儿 DNA 浓度 >3%这部分孕妇可以重采血复测一次,这可以缓解孕妇首次检测就失败的焦虑和减少不必要的诊断。

染色体核型对胎儿 DNA 浓度影响的生物学机制尚不明确,但大量研究发现胎儿 DNA 浓度低与胎儿非整倍体的风险增加有关^[3,16]。Chan 等^[17]发现 NIPT 检测失败的孕妇中染色体非整倍体发生率高达 6.5%。Gil^[18]等发现,检测失败的孕妇后续妊娠时胎儿目标染色体非倍体的发生率为 6.9%,性染色体异常的发生率高达 17.2%。本研究检测失

败病例中,仅 17% 的孕妇进行介入性诊断,共确诊染色体异常 3 例(包括 18 三体 1 例,性染色体异常 1 例,拷贝数变异 1 例),总的染色体异常占比 4.76%,比已有报道的异常率低,一方面是 NIPT 检测失败孕妇选择介入性诊断病例较少,另一方面我们仅基于某一测序平台讨论了低胎儿 DNA 浓度造成的 NIPT 检测失败。Revello^[19]研究发现在 NIPT 检测失败的病例中,18 和 13 三体所占的比例高于 21 三体,建议处理这类病例时,对 18 和 13 三体特征进行详细的超声检查,如果存在这些特征,要求进行侵入性诊断。胎儿 DNA 浓度低和胎儿染色体异常的关系要求临床加强对二次检测仍失败人群的围产期保健及遗传咨询。

综上,首次检测胎儿 DNA 浓度和重采血孕周是重采血复测成功与否的关键因素,临床工作者可以参照这两个指征给首次检测失败的孕妇提供参考建议。

参 考 文 献

- [1] DEVERS PL, CRONISTER A, ORMOND KE, et al. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counslors[J]. J Genet Couns, 2013, 22(3): 291-295.
- [2] LO YD, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PE, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [3] 李佳欣,魏瑗,赵扬玉. 胎儿游离 DNA 浓度低导致无创产前检测失败的相关因素研究进展[J]. 中华围产医学杂志, 2019, 22(1): 30-34.
- [4] QU SF, ZHANG YY, YANG X, et al. The setup and application of reference material in sequencing based noninvasive prenatal testing [J]. Gynecol Obstet Invest, 2021, 86: 123-131.
- [5] XUE Y, ZHAO GD, QIAO LW, et al. Sequencing short cfDNA fragments decreases the false negative rate of noninvasive prenatal testing[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11:280.
- [6] KIM SK, HANNUM G, GEIS J, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8): 810-815.
- [7] GIL MM, ACCURTI V, SANTACRUZ B, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2017, 50: 302-314.
- [8] LIN Y, LIANG D, LI H, et al. Two factors affecting the success rate of the second noninvasive prenatal screening after initial no-call result: experience from a single tertiary center in China[J]. Chinese Medical Journal, 2021, 134(12):1416-1421.
- [9] KAREN WHITE, WANG YW, IZA HOPE KUNZ, et al. Factors associated with obtaining results on repeat cell-free DNA testing in samples redrawn due to insufficient fetal fraction[J]. Matern Fetal Neonatal Med, 2019:1-6.
- [10] PALOMAKI GE, KLOZA EM, LAMBERT-MESSERLIAN GM, et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? [J]. Prenat Diagn, 2015, 35:289-293.
- [11] PALOMAKI GE, KIOZA EM. Prenatal cell-free DNA screening test failures: a systematic review of failure rates, risks of Down syndrome, and impact of repeat testing[J]. Genet Med, 2018, 20:1312-1323.
- [12] GREGG AR, SKOTKO BG, BENKENDORF JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics[J]. Genet Med, 2016, 18: 1056-1065.
- [13] WANG E, BATEY A, STRUBLE C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7): 662-666.
- [14] KINNINGS SL, GEIS JA, ALMASRI E, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing [J]. Prenat Diagn, 2015, 35:816-822.
- [15] BENN P, BORRELL A, CHIU RW, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis[J]. Prenat Diagn, 2015, 35:725-734.
- [16] NORTON ME, JACOBSSON B, SWAMY GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy [J]. N Engl J Med, 2015, 372(17):1589-1597.
- [17] CHAN N, SMET ME, SANDOW R, et al. Implications of failure to achieve a result from prenatal maternal serum cell-free DNA testing: a historical cohort study[J]. BJOG, 2018, 125(7):845-855.
- [18] GIL MM, QUEZADA MS, REVELLO R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(3): 249-266.
- [19] REVELLO R, SARNO L, ISPAS A, et al. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2016, 47: 698-704.

(收稿日期: 2022-12-29)

编辑: 曲晓星