

# 孕妇血中胎儿游离 DNA 是双胎妊娠无创 DNA 筛查的关键

赵妍<sup>1</sup> 张志涛<sup>2</sup> 尹少尉<sup>3</sup> 魏军<sup>3,4</sup> 刘彩霞<sup>3,4</sup> 吕远<sup>3,4\*</sup>

(1. 沈阳市妇婴医院 遗传科, 辽宁 沈阳 110011; 2. 沈阳市妇婴医院 产科, 辽宁 沈阳 110011; 3. 中国医科大学附属盛京医院 妇产科, 辽宁 沈阳 110004; 4. 中国医科大学附属盛京医院 辽宁省母胎医学重点实验室, 辽宁 沈阳 117004)

**【摘要】** 越来越多的数据显示无创 DNA 筛查技术在双胎中具有有良好的应用效果, 并且被一些指南和文献推荐为双胎妊娠胎儿染色体非整倍体的一线检测方案。无创 DNA 筛查的关键是胎儿游离 DNA 浓度, 如果浓度达不到检测阈值, 将出现假阴性的结果。双胎妊娠孕妇血中的胎儿游离 DNA 虽然总体比单胎高, 但是每个胎儿的 DNA 比单胎低, 因此双胎妊娠的无创 DNA 筛查更容易出现检测失败和假阴性的结果。另外, 临床上双胎一胎消失的情况又增加了假阳性的结果, 这些都导致无创 DNA 筛查在双胎妊娠的筛查中效果不如单胎。基于 SNP 的无创 DNA 筛查技术可以准确评估孕妇和每个胎儿的游离 DNA 浓度, 可以有效地保证无创 DNA 检测的效果, 也可以解决消失胎儿对存活胎儿游离 DNA 干扰的问题。本文将对双胎妊娠胎儿游离 DNA 在无创 DNA 筛查中的关键作用进行阐述, 以期对双胎的无创 DNA 筛查在临床上的应用和遗传咨询提供理论依据。

**【关键词】** 双胎妊娠; 无创 DNA 筛查; 胎儿游离 DNA; 双胎一胎消失; 单核苷酸多态位点

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

随着我国生育政策的变化及辅助生殖技术的快速发展, 双胎妊娠发生率逐年升高。文献报道多胞胎比例从 2012 年的 1.6% 显著上升到 2018 年的 1.9%<sup>[1]</sup>。根据双胎妊娠产前筛查与诊断技术规范(2017)报道, 双胎出生缺陷的发生率约为 6.3%<sup>[2]</sup>。染色体异常是导致出生缺陷发生的重要原因之一, 双胎妊娠增加了怀孕胎儿的数量, 因此理论上出现染色体异常胎儿的概率高于单胎妊娠。对于染色体非整倍体的筛查, 基于无创 DNA 筛查技术的高检出率以及低假阳性率, 其在临床上得到了广泛的应用<sup>[3]</sup>。近年来, 越来越多的研究表明<sup>[4]</sup>, 无创 DNA 筛查技术在双胎妊娠胎儿染色体非整倍体的检测中也具有非常好的效果。

无创 DNA 筛查技术是利用高通量测序技术对孕妇外周血中的胎儿游离 DNA 进行检测, 并通过

生物信息学的方法评估胎儿染色体是否存在异常<sup>[5]</sup>。胎儿游离 DNA 浓度是无创 DNA 筛查的关键, 如胎儿游离 DNA 浓度达不到检测要求, 那么将会出现假阴性的结果, 导致缺陷儿出生。在双胎妊娠中, 尤其是异卵双胎, 确定每个胎儿的游离 DNA 浓度是保证筛查效果的关键, 但是目前无论是发表的文献还是临床应用上, 虽然都认为双胎妊娠的无创 DNA 筛查具有高检出率和低假阳/阴性率, 可是在研究中却很少评估胎儿游离 DNA 浓度<sup>[6]</sup>, 这无疑为双胎无创 DNA 筛查的广泛应用留下了隐患。本文将对胎儿游离 DNA 浓度在双胎无创 DNA 筛查中的关键作用及其检测方法进行阐述, 以使得无创 DNA 筛查技术在双胎妊娠中得到更好的应用。

## 1 双胎无创 DNA 筛查的应用现状

双胎无创 DNA 筛查的研究和样本数越来越多<sup>[7]</sup>, 再加上血清学筛查在双胎中的应用效果不如

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.04.001

基金项目: 沈阳市科技计划项目(22-321-33-21)

\* 通信作者: 吕远, hawk.lv@163.com

单胎,国内外的指南或者诊疗规范均认为无创 DNA 筛查可以做为评估双胎妊娠胎儿染色体非整倍体风险的技术。2020年,美国妇产科医师学会(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)发布了胎儿染色体异常的筛查实践指南<sup>[8]</sup>,指出双胎妊娠孕妇可以选择基于胎儿游离 DNA 检测的无创 DNA 筛查评估胎儿 21 三体的风险,但对于 13 和 18 三体的筛查效果尚需要更多的研究数据进行证实。同年,国际产前诊断学会(International Society for Prenatal Diagnosis, ISPD)声明孕早期 cfDNA 筛查常见的常染色体三体是适合双胎妊娠的,因为有足够的证据表明其具有高检出率和低假阳性率<sup>[9]</sup>。2021年,中国妇幼保健协会双胎妊娠专业委员会发布了《双胎妊娠产前筛查与诊断技术规范(2021年更新版)》,认为对于有双胎无创 DNA 筛查经验的产前检测机构而言,可选择其对双胎胎儿 21 三体风险进行筛查,但是对 18 三体及 13 三体的筛查数据有限,仍需要进一步的临床数据支持<sup>[10]</sup>。2023年4月,Dugoff 等人在《美国妇产科》杂志上发表了一项大的多中心的研究,对所有双胎妊娠中 21 三体的检出率为 97.6%,假阴性 1 例,无假阳性病例;对 18 三体的检出率为 100%,但出现了 1 例假阳性病例;对 13 三体的检出率为 80%,假阴性 1 例,无假阳性病例,该研究认为无创 DNA 筛查 21 三体的效果在双胎妊娠中等同于单胎,但是 18 三体和 13 三体的筛查效果需要更多的病例来评估<sup>[4]</sup>。

双胎妊娠的胚胎合子性决定了两个胎儿的染色体异常风险是否一致。在临床诊疗中,通常用超声检查来判断胚胎合子性,如孕囊个数或者双胎峰征,但存在少数无法判断或者误判绒毛膜性的情况,也有双绒双胎发育自单卵的情形。同卵双胎由单个受精卵分裂而来,理论上两个胎儿具有相同的遗传物质,虽然有少量文献报道同卵双胎的染色体会出现不一致的情况,但同卵妊娠染色体异常的风险一直被认为与单胎妊娠相同。对于无创 DNA 的筛查效果也认为同卵双胎等同于单胎<sup>[11]</sup>。另有研究报道,同卵双胎胎儿游离 DNA 浓度高于单胎<sup>[12]</sup>,因此无创 DNA 筛查效果理论上优于单胎妊娠。但是异卵双胎则是由两个不同的受精卵发育而来,胎儿遗传

物质并不同。对于异卵双胎来说,每个胎儿的染色体非整倍体风险是独立计算的,异卵双胎妊娠孕妇血浆中的游离胎儿 DNA 来源于两个不同胎儿,当其中一胎儿染色体异常而另一胎儿染色体正常时,异常胎儿的游离 DNA 很可能被稀释从而无法达到无创 DNA 筛查的要求阈值。双胎妊娠无创 DNA 筛查效果总体不如单胎的主要原因就在于异卵双胎的检测失败率和假阴性概率高于单胎。

总之,由于双胎妊娠存在同卵和异卵的区别,母血中胎儿游离 DNA 可以是“一个”胎儿的,也可以是两个胎儿的,这给无创 DNA 筛查带来了挑战。国内的实验室很少会把同卵和异卵双胎区分开来进行无创 DNA 筛查的检测,虽然根据文献报道对于常见的染色体三体筛查,如 21 三体,无论是单卵还是异卵双胎妊娠,效果都基本等同于单胎,但是随着检测数量的不断增加,假阴性的结果或将越来越多。另外,扩展版的无创 DNA 筛查在临床应用中急速增加,其在单胎中的应用效果都尚未得到大数据的验证<sup>[8]</sup>,如果不当的应用于双胎妊娠中,尤其是异卵双胎,将进一步增加筛查的假阳性率和假阴性率。

## 2 双胎一胎消失的无创 DNA 筛查

双胎消失综合征(vanishing twin syndrome, VTS)是指当双胞胎中的一个胎儿在子宫内死亡、消失及部分或全部被吸收,导致双胎妊娠自然减少为单胎妊娠的情形<sup>[13]</sup>。引起 VTS 的主要原因之一是胎儿自身染色体异常,在一项研究中显示<sup>[14]</sup>,出现双胎一胎消失的平均孕妇年龄明显高于双胞胎妊娠孕妇的平均年龄,同时母亲年龄增加会导致胎儿非整倍体的风险增加,这表明胎儿非整倍体是双胎一胎消失的原因之一。如双胎一胎染色体三体或单体导致 VTS 时,消失胎儿的胎盘组织在一定时间内会持续向孕妇血液中释放游离 DNA,进而导致存活胎儿的无创 DNA 筛查结果为假阳性。Suzumori 等人报道,双胎妊娠无创 DNA 筛查中 13%的假阳性是由 VTS 引起的,导致影响结果的主要原因就是消失胎儿释放的游离 DNA 的干扰<sup>[15]</sup>。

消失胎儿的游离 DNA 释放到双胎妊娠孕妇外周血中,并可被无创 DNA 筛查技术检测到的持续

时间是影响筛查效果的另一个关键因素。消失胎儿的游离 DNA 在孕妇血中持续时间与胎盘组织降解率以及胎儿死亡的孕周大小有关。Niles 等人<sup>[16]</sup>研究显示,在孕 6<sup>+</sup>周时发现 VTS,在 15 周后仍然能检测到消失胎儿的 DNA 存在。赵干业等<sup>[17]</sup>报道出现 VTS 后,其影响持续至少为 11 周,在检测孕周达 20<sup>+</sup>周时影响才消除。VTS 对无创 DNA 筛查检测结果的持续影响时间目前尚无定论,有研究报道<sup>[18]</sup>,在采血孕周大于 14 周后进行检测,其假阳性率和单胎妊娠已基本无差别,性别不一致率也大大降低。另一项研究<sup>[19]</sup>显示,在因检测阳性或者检测失败而重新采血的样本中,超过 15 周后进行重新采血时,排除 VTS 影响的 NIPT 检测成功率为 92%,远超过小于 15 周采血检测的成功率 57%。鉴于 VTS 对于无创筛查的检测准确性有影响,有学者和机构建议对 VTS 孕妇直接进行产前诊断。但也有研究<sup>[20]</sup>认为,VTS 的发生虽然提高了假阳性率和失败率,但基本无假阴性事件出现,因此先选择无创 DNA 筛查再对高风险结果进行产前诊断可以有效降低产前诊断率和风险。

虽然有大量研究探讨无创 DNA 筛查在 VTS 中应用效果,但其中的关键还是消亡胎儿的游离 DNA 对正常胎儿的影响,如果我们能在检测时准确区分消亡胎儿和正常存活胎儿的游离 DNA,那么无创 DNA 筛查的效果和时间将不受 VTS 的影响。

### 3 提高双胎无创 DNA 筛查准确性的方法

3.1 提高双胎胎儿游离 DNA 的浓度 无论使用何种平台,大多数 NIPS 实验室都会报告 1%至 5%的失败率<sup>[4]</sup>,最主要的原因是由于胎儿游离 DNA 的浓度过低导致的,使得检测结果不可靠。对于单胎妊娠的样本,胎儿游离 DNA 的浓度在 4%~30%之间,绝大部分实验室的要求是比例大于 4%<sup>[21]</sup>,以降低假阴性报告的概率。对于双胎妊娠的样本,尤其是异卵双胎,由于来源为不同的胎儿,理论上要求更高的胎儿游离 DNA 比例。卢煜明教授等人<sup>[22]</sup>利用长片段测序的方法发现孕妇血中游离 DNA 片段大小为 76~5776bp,其中大于 1000bp 的片段约 0.06%~0.3%。同时,卢煜明教授也发现在妊娠 12

周,胎儿游离 DNA 的片段大小主要集中在 143bp,而孕妇的 DNA 集中于 166bp<sup>[23]</sup>。相对于母体 DNA,胎儿游离 DNA 的片段更短,目前总体认为区分二者的片段大小为 150bp,即 150bp 以下大多为胎儿游离 DNA,150bp 以上为母体 DNA<sup>[24]</sup>。因此,如果能够富集孕妇血中较短的 DNA 片段,那么即使不能完全将胎儿游离 DNA 区分,但是也相当于间接提高检测样本中胎儿游离 DNA 的浓度。最近有研究<sup>[25]</sup>显示,在测序之前使用高浓度琼脂糖凝胶从制备的胎儿游离 DNA 文库中回收短片段,平均使胎儿游离 DNA 的浓度增加了 2.3 倍。作者认为富集短片段 DNA 是真正意义上的把胎儿游离 DNA 浓度提高,该方法增加了染色体非整倍体筛查的效果,尤其是染色体微缺失的筛查。在双胎妊娠 DNA 筛查中,富集胎儿游离 DNA,提高其浓度,是简单有效地提高筛查效果降低筛查失败率的方法。

3.2 基于 SNP 的无创 DNA 筛查 在检测前提高胎儿游离 DNA 浓度可以减少双胎妊娠无创 DNA 筛查的假阴性报告概率和检测失败率,但是由于两个胎儿的游离 DNA 在母血中并非总是各占一半,因此提高胎儿游离 DNA 浓度不能完全解决假阴性的问题。另外,由于在母血中双胎的游离 DNA 是混在一起的,目前的无创 DNA 筛查技术即使提示了胎儿染色体非整倍体高风险,也无法区分高风险的是一个胎儿还是两个胎儿。近年来,许多研究表明基于高通量测序技术的 cell-free DNA 筛查可以在异卵双胎中实现高效且准确的筛查。这种方法利用 SNP 分型技术来分析胎儿 DNA 中来自母亲和父亲不同的等位基因,从而确定胎儿是否存在染色体异常。由于异卵双胎的基因组存在差异,因此这种方法可以准确地区分两个胎儿的 DNA 片段,避免了误诊和漏诊的问题。同时,通过结合基因型和序列比对等技术,可以进一步提高筛查的准确性和可靠性。

2019 年,Hedriana 等人<sup>[26]</sup>应用基于 SNP 的无创 DNA 筛查方法对双胎妊娠胎儿的游离 DNA 浓度进行了研究,结果表明,双胎妊娠的总体胎儿游离 DNA 浓度比单胎妊娠高 32%,其中单绒双胎比单胎高 35%,双绒双胎高 26%,但是双绒双胎中每个

胎儿平均比单胎少32%。通常来说,单绒双胎两个胎儿染色体是相同的,并且其胎儿游离DNA高于单胎,无创DNA筛查的效果比单胎妊娠更好,因此几乎不需要考虑胎儿游离DNA浓度的影响。但是对于双绒双胎,最有可能的是两个胎儿中只有一个是染色体异常,并且每个胎儿的游离DNA浓度比单胎平均少32%,那么无创DNA筛查的假阴性率就会增加。另外,该研究发现双绒双胎两个胎儿的游离DNA在孕妇血中的比例并不总是各占一半,这更增加了假阴性的概率。大多数的实验室使用4%的胎儿游离DNA浓度做为是否报告的阈值,但该研究发现有22%双绒双胎中至少有一个胎儿的游离DNA浓度小于4%。因此,该研究认为双胎妊娠的无创DNA筛查应充分考虑每个胎儿的游离DNA浓度,尤其是双绒双胎,而基于SNP的无创DNA筛查可以很好的评估每个胎儿的DNA浓度,同时该方法也可以准确地鉴定双胎的合子性。

2019年,Norwitz等人<sup>[27]</sup>在一项前瞻性研究中验证了基于SNP的无创产前DNA筛查对双胎妊娠胎儿合子性、胎儿性别和胎儿非整倍体的检测效果。结果提示其合子性预测准确率为100%,双胞胎的胎儿性别鉴定准确率也为100%,所有染色体非整倍体异常的胎儿也被正确地筛查出来,对于异卵双胎染色体非整倍体的敏感性和特异性均为100%。同时,该方法可以准确地评估双胎每个胎儿的游离DNA浓度。作者认为,基于SNP的无创DNA筛查可以同时检测双胎妊娠的合子性、胎儿性别和染色体非整倍性,尤其是对绒毛膜性不确定的双胎妊娠诊疗更具有指导意义。

2015年,Curnow等人<sup>[14]</sup>应用基于SNP的无创DNA筛查意外发现了0.42%的孕妇血中存在额外的胎儿游离DNA,表明这种技术可以鉴定孕早期消失的未被超声识别的双胞胎和三倍体妊娠。由于消失的胎儿更有可能是非整倍体,因此该方法有望减少假阳性结果并防止错误的胎儿性别判断,从而减少不必要的侵入性诊断。基于SNP的无创DNA筛查还可以准确地判断胚胎的合子性,弥补超声检查的不足和早期的漏诊风险。双胎妊娠的绒毛膜性主要依靠超声进行评估,而超声的准确性可能受到

许多因素的影响,如孕周或超声医生的经验,并且有一小部分双绒双胎是同卵发育而来。2022年,Wojas等人<sup>[28]</sup>的研究显示可以使用基于SNP的无创DNA筛查对双胎妊娠的合子性进行评估,并且认为基于SNP的无创DNA筛查是辅助评估合子性的有效手段,特别是早期没有通过超声确定绒毛膜性或存疑的双胎妊娠。

#### 4 总结

双胎妊娠非整倍体发生率及出生缺陷率高于单胎,且大多数双胞胎妊娠是通过辅助生殖技术获得的珍贵儿,双胎妊娠更需要准确有效的无创产前筛查方法。双胎妊娠无创DNA筛查具有无创性及高准确性,具有广泛的应用前景。然而,双胎妊娠孕妇母血中存在两个胎儿的游离DNA,给无创DNA筛查带来了挑战。区分两个胎儿的游离DNA是提高双胎妊娠无创DNA筛查的准确性的关键,例如基于SNP位点的无创DNA筛查。在准确检测双胎每个胎儿的游离DNA后,期待无创DNA筛查在双胞胎妊娠中的应用效果将与单胎相同。

#### 参 考 文 献

- [1] DENG K, LIANG J, MU Y, et al. Preterm births in Chian between 2012 and 2018: an observational study of more than 9 million women[J]. *Lancet Glob Health*, 2021,9(9):e1226-e1241.
- [2] 国家卫生和计划生育委员会公益性行业科研专项《常见高危胎儿诊治技术标准及规范的建立与优化》项目组. 双胎妊娠产前筛查与诊断技术规范(2017)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017,33(8):810-814.
- [3] ROSE NC, BARRIE ES, MALINOWSKI J, et al. Systematic evidence-based review: The application of noninvasive prenatal screening using cell-free DNA in general-risk pregnancies[J]. *Genet Med*, 2022,24(7):1379-1391.
- [4] DUGOFF L, KOELPER NC, CHASEN ST, et al. Cell-free DNA screening for trisomy 21 in twin pregnancy: a large multicenter cohort study[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2023, S0002-9378(23)00229-6. Online ahead of print.
- [5] CHITTY LS, LO YM. Noninvasive Prenatal Screening for Genetic Diseases Using Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015,5(9):a023085.
- [6] JUDAH H, GIL MM, SYNGELAKI A, et al. Cell-free

- DNA testing of maternal blood in screening for trisomies in twin pregnancy: updated cohort study at 10-14 weeks and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2021, 58(2): 178-189.
- [7] HOPKINS MK, DUGOFF L. Screening for aneuploidy in twins[J]. *Am J Obstet Gynecol MFM*, 2022, 4(2S): 100499.
- [8] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics; Committee on Genetics; Society for Maternal-Fetal Medicine. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226[J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 136(4): e48-e69.
- [9] PALOMAKI GE, CHIU RWK, PERTILE MD, et al. International Society for Prenatal Diagnosis Position Statement: cell free (cf)DNA screening for Down syndrome in multiple pregnancies[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10): 1222-1232.
- [10] 中国妇幼保健协会双胎妊娠专业委员会. 双胎妊娠产前筛查与诊断技术规范(2021年更新版)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2021, 37(3): 312-316.
- [11] EVANS MI, ANDRIOLE S, EVANS SM. Screening and Testing in Multiples[J]. *Clin Lab Med*, 2016, 36(2): 289-303.
- [12] HEDRIANA H, MARTIN K, SALTZMAN D, et al. Cell-free DNA fetal fraction in twin gestations in single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(2): 179-184.
- [13] ZAMANI Z, PAREKH U. *Vanishing Twin Syndrome*[M]. Treasure Island (FL): StatPearls, 2023.
- [14] CURNOW KJ, WILKINS-HAUG L, RYAN A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(1): 79. e1-79. e799.
- [15] SUZUMORI N, SEKIZAWA A, TAKEDA E, et al. Retrospective details of false-positive and false-negative results in non-invasive prenatal testing for fetal trisomies 21, 18 and 13 [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2021, 256: 75-81.
- [16] NILES KM, MURJI A, CHITAYAT D. Prolonged duration of persistent cell-free fetal DNA from vanishing twin[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 52(4): 547-548.
- [17] 赵干业, 代鹏, 时盼来, 等. 双胎之一消失综合征对无创产前检测的影响分析 1 例[J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(9): 701-703.
- [18] BALAGUER N, MATEU-BRULL E, SERRA V, et al. Should vanishing twin pregnancies be systematically excluded from cell-free fetal DNA testing[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10): 1241-1248.
- [19] ZOU Y, CUI L, XUE M, et al. Applications of noninvasive prenatal testing in vanishing twin syndrome pregnancies after treatment of assisted reproductive technology in a single center[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(2): 226-233.
- [20] KLEINFINGER P, LUSCAN A, DESCOURVIERES L, et al. Noninvasive Prenatal Screening for Trisomy 21 in Patients with a Vanishing Twin[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(11): 2027.
- [21] LUO Y, HU B, LONG Y, et al. Clinical application of non-invasive prenatal testing in twin pregnancies: a single-center experience[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2023, 23(4): 335-340.
- [22] CHENG SH, JIANG P, SUN K, et al. Noninvasive prenatal testing by nanopore sequencing of maternal plasma DNA: feasibility assessment [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(10): 1305-1306.
- [23] LO YM, CHAN KC, SUN H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(61): 61ra91.
- [24] YU SC, CHAN KC, ZHENG YW, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(23): 8583-8588.
- [25] WELKER NC, LEE AK, KJOLBY RAS, et al. High-throughput fetal fraction amplification increases analytical performance of noninvasive prenatal screening [J]. *Genet Med*, 2021, 23(3): 443-450.
- [26] HEDRIANA H, MARTIN K, SALTZMAN D, BILLINGS P, DEMKO Z, BENN P. Cell-free DNA fetal fraction in twin gestations in single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(2): 179-184.
- [27] NORWITZ ER, MCNEILL G, KALYAN A, et al. Validation of a Single-Nucleotide Polymorphism-Based Non-Invasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Zygosity, Individual Fetal Sex, and Fetal Aneuploidy[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(7): 937.
- [28] WOJAS A, MARTIN KA, KOYEN MALASHEVICH A, et al. Clinician-reported chorionicity and zygosity assignment using single-nucleotide polymorphism-based cell-free DNA: Lessons learned from 55,344 twin pregnancies[J]. *Prenat Diagn*, 2022, 42(10): 1235-1241.

(收稿日期:2023-08-09)

编辑:刘邓浩