

无创产前检测对临界风险值的检出意义： 74例回顾性分析

许晨霞¹ 余学高² 黄浩² 林少宾³ 陈培松^{2*}

(1. 中山市博爱医院 产前诊断中心, 广东 中山 528400; 2. 中山大学附属第一医院 检验科, 广东 广州 510080; 3. 中山大学附属第一医院 胎儿医学中心, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 回顾性分析74例孕妇无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)临界风险值病例的妊娠结局, 探讨临界风险值可能的原因以及对妊娠结局的影响。方法 对2017年3月至2020年7月, 在中山大学附属第一医院行NIPT的4883例孕妇中, 临界风险值T13($3.0 < Z < 4.39$); T18($3.0 < Z < 4.64$); T21($3.0 < Z < 5.08$)人群74例进行分析, 并且加大测序深度后再次检测的结果分析。对重复检测仍然在临界风险值的孕妇, 行介入性产前诊断, 并在产后进行追踪随访。结果 4883例无创产前检测数据中有74例(1.5%, 74/4883)Z值落在临界风险区。Z值灰区的74例加大测序深度重新建库检测, 仍然有7例为临界风险, 其余67例复查后为低风险; 7例两次检测灰区的孕妇经介入性产前诊断, 1例21-三体, 1例21-三体24%的嵌合体, 1例新生儿心脏畸形。44例随访记录中25例产妇在生产时胎儿情况不良。结论 NIPT检测中Z值在临界风险区病例妊娠不良结局发生率较高, 临床上应该提高对该类结果的重视。

【关键词】 无创产前检测; Z值灰区; 妊娠结局

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Detection of gray-area with non-invasive prenatal testing: a retrospective analysis of 74 cases

Xu Chenxia¹, Yu Xuegao², Huang Hao², Lin Shaobin³, Chen Peisong^{2*}

1. Prenatal Diagnosis Center, Boai Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528400, Guangdong, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China; 3. Fetal Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

* Corresponding author; Chen Peisong, E-mail: 13570474904@163.com

【Abstract】 **Objective** A retrospective analysis of gray-area in 74 cases for non-invasive prenatal testing (NIPT). To evaluate possible causes and effects on pregnancy outcomes of gray-area. **Methods** There were 4883 pregnant women undergoing NIPT in The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from March, 2017 to July, 2020, of which 74 cases with Z value gray-area T13($3.0 < Z < 4.39$); T18($3.0 < Z < 4.64$); T21($3.0 < Z < 5.08$) were retested and the results were analyzed after adding sequencing depth. Invasive prenatal diagnosis was performed on pregnant women who still had a Z value gray-area after repeated detection. Pregnant outcomes were followed up. **Results** Among the 4883 pregnant women with NIPT, 74 cases (1.5%, 74/4883) were in gray-area; 74 cases with Z-value gray area were reexamined by increasing the sequencing depth. After retesting, 7 cases were still in gray-area, and the

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.004

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A0303130246)

* 通信作者: 陈培松, E-mail: 13570474904@163.com

remainder 67 cases were in low risk; Among the 7 pregnant women having invasive prenatal diagnosis, 1 case of trisomy 21 and 1 case of mosaic trisomy 21 (24%); 1 case showed congenital heart malformations. Among the other 44 follow-up cases, 25 cases had adverse outcomes during childbirth. **Conclusions** The incidences of adverse pregnancy outcomes in these NIPT patients were significantly higher, which should be paid more attention.

【Key words】 Non-invasive prenatal testing; Z-scores gray-area; Pregnancy outcome

无创产前检测目前已广泛用于13、18、21-三体筛查,灵敏度及特异度均达到99%^[1,2]。胎儿的游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)已被证实起源于低甲基化的胎盘组织,而母体cfDNA来源于甲基化的造血和肝组织^[3,4]。在母体血液中自由循环的DNA,绝大部分来自于母体本身,胎儿游离DNA(cell-free fetal DNA, cffDNA)的平均浓度为10%~15%,变化范围可达3%~30%^[5]。cffDNA筛查要求胎儿游离DNA浓度不能过低,即母体血液来源于胎儿的cfDNA的比例不能过低,小于3%或4%的样本是不合格的^[6]。无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)技术逐步由第三方检测机构转化到医院平台,运用医院平台为孕产妇做检测更重要的是能够根据妊娠结局的随访情况与临床医生沟通,使医生能更科学合理的为孕产妇做产前咨询。然而,不论是使用何种平台检测,都不可避免出现临界风险灰区(gray-area)病例。迄今为止,这些病例的妊娠结局并没有引起大家太多的关注。本研究的目的在于回顾性分析灰区病例的妊娠结局,初步探讨灰区结果可能的原因以及临床价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2017年3月至2020年7月,在中山大学附属第一医院分子诊断中心做NIPT检测的孕妇,检测结果在临界风险值范围T13($3.0 < Z < 4.39$); T18($3.0 < Z < 4.64$); T21($3.0 < Z < 5.08$)的病例。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法 采集孕妇静脉血5ml,采血用EDTA-K2管4℃保存8h。3500rpm 4℃离心10min分离血浆,分离后的血浆于16 100g 4℃离心10min。采用磁珠法(中山大学达安基因生产的核酸提取试剂盒)提取孕妇血浆中的cfDNA。文库质

检试剂及试剂盒(上海立菲生物技术有限公司:高灵敏度荧光染料DNA检测试剂盒;安捷伦科技有限公司:高敏感度DNA芯片)。文库构建步骤包括末端修复、DNA片段加接头、PCR扩增DNA片段。文库定量、上机测序、质控标准等流程后数据分析得到Z值。采用DA8600 proton平台(the ion proton semiconductor sequencing platform)进行半导体测序法检测。

结果判读:检测结果Z值T13($Z > 4.39$)、T18($Z > 4.64$)、T21($Z > 5.08$)明确判断为高风险;T13($3.0 < Z < 4.39$); T18($3.0 < Z < 4.64$); T21($3.0 < Z < 5.08$)样本为灰区样本,需要进行重复检测; $Z \leq 3$ 为低风险。第2次重新建库后检测结果仍然落在灰区的样本建议孕妇进行侵入性产前检查明确诊断; $Z < 3$ 为低风险,超声定期监测,进入常规孕检流程。

1.3 介入性产前诊断 为上述NIPT重复检测Z值2次均落在灰区的孕妇提供遗传咨询,经知情同意后进行羊水或者脐血穿刺G显带染色体核型分析,以及染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)。

1.4 妊娠结局的随访 对NIPT检测Z值落在灰区的病例进行产后随访和生产时的详细病历记录查询,了解孕产妇本身的身体状况和新生儿出生时的健康情况。

2 结果

2.1 74例灰区病例重复检测 2017年3月至2020年7月总共4883例孕妇中第1次检测,74例样本因所得Z值落在灰区而需要进一步验证,其中包括10例13-三体、12例18-三体、52例21-三体的灰区病例(图1)。将上述样本重新建库加大测序深度重新检测74例灰区病例中有7例Z值仍然在灰

区范围。我们建议2次Z值灰区的孕妇行侵入性产前检测。

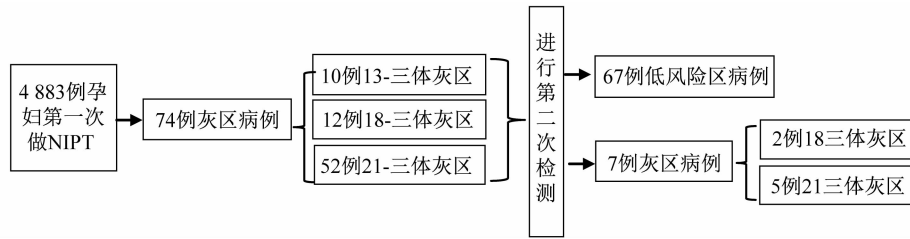


图1 2次检测的结果

2.2 2次检测Z值均落在灰区病例的分析 加大测序深度后检测Z值落在灰区的7例病例中,18-三体灰区2例(其中有1例失访),21-三体灰区5例。以上孕妇经知情同意后进行羊水或者脐血穿刺行G

显带染色体核型和染色体微阵列分析。结果1例21-三体,1例21-三体24%的嵌合体,1例新生儿心脏畸形,其余病例染色体核型和染色体微阵列分析未见异常(表1)。

表1 第二次检测21、18三体灰区病例新生儿情况及Z值

病例编号	新生儿/胎儿情况	第一次Z值	第二次Z值	结果
C20121	染色体核型未见异常(足月儿)	3.18	4.68	chr21-Gray
E2030	染色体核型未见异常(早产儿)	3.19	4.01	chr21-Gray
H1878	染色体核型未见异常;新生儿心脏畸形(大动脉转位,合并室间隔缺损)	3.18	3.24	chr21-Gray
K4	21-三体综合征	3.26	3.64	chr21-Gray
B1937	21-三体嵌合体(嵌合比例24%)	3.39	4.14	chr21-Gray
D62	染色体核型未见异常(足月儿)	3.06	3.13	chr18-Gray

2.3 Z值灰区的74例病例进行孕妇自身情况和结果分析 产妇平均年龄为34.5岁,其中大于35岁的有38例(51%,38/74)。12~13⁺⁶周36例,14~27⁺⁶周36例,2例孕周大于28周。表2中可知,增大测序深度后,13、18、21-三体的Z值平均值较第一次检测结果相比明显下降,而cffDNA的平均浓度并没有随着唯一匹配读数(unique reads,UR)增加而增加。

表2 74例灰区病例2次检测结果的对比

平均值	13-三体灰区	18-三体灰区	21-三体灰区
第一次检测 UR	5219458	5276375	5027571
第二次检测 UR	9939814	7900446	8775680
第一次Z值	3.35	3.24	3.32
第二次Z值	1.90	1.73	1.43
第一次胎儿浓度(%)	8.61	9.48	9.62
第二次胎儿浓度(%)	8.37	9.60	8.90

2.4 灰区病例再次检测Z<3病例的妊娠结局分析 第一次检测Z值落在灰区,而加大测序深度再次检测Z<3的阴性病例67例,44例有产后随访结果,2例失访。这44例灰区病例中高危儿11例,所

占比例高达25%;早产儿8例,所占比例20.4%。

表3 临界风险区新生儿情况

	例数(例)	占百分比(%)
新生儿情况		
高危儿	11	25.0
早产儿	10	22.7
病理性黄疸	5	11.3
呼吸窘迫综合征	6	13.6
染色体异常	3	6.8
双耳耳轮廓形态异常	3	6.8
孕产妇情况		
子宫肌瘤	8	18.1
IVF-EF*术后	8	18.1
自然流产	3	6.8

注:*体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer,IVF-EF)。

3 讨论

灰区是NIPT检测中常见的情况,对于灰区标本的临床处理流程目前尚无指南,且临床意义未知。2017年3月至2020年7月期间,在中山大学附属第一医院行NIPT检测的4883孕妇中发现74例灰区病例,占总数据的1.5%。加大测序深度复查后,

有 67 例(90.5%,67/74)检测结果为低风险免于侵入性产前检测。由于 NIPT 检测的准确度和测序深度存在较大的关联,因此我们以第二次检测的结果为准。重复检测虽然能降低 13、18、21-三体的假阳性率,但当出现 Z 值落在灰区时临床医生应该详细追踪随访其妊娠结局。对于灰区复查阳性的 7 例病例中,1 例 21-三体、1 例 21-三体 24%的嵌合体,说明对于灰区重复检测能够避免漏掉一些真阳性病例。在 NIPT 检测中,国内外有很多研究把更多注意力放在实验的检出率、阳性预测值、漏检率等方面,而往往忽视了灰区病例的妊娠结局。许多生物学因素可导致 NIPT 检测结果与 G 显带染色体核型分析结果不一致,有时是胎儿因素,也可能由于母体本身的原因。关于胎儿的因素包括胎儿部分重复或缺失、限制性胎盘嵌合和双胞胎消失综合征等^[7-9]。研究表明孕期的肿瘤 DNA 片段直接进入血液循环,从而影响 NIPT 的检测结果^[10-12]。常见的良性肿瘤如子宫肌瘤也会将 DNA 释放到血液中^[13,14],这些肿瘤游离 DNA 使得与参照 DNA 之间的预期比例偏移。维生素 B12 或叶酸缺乏、器官移植、自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮也可能导致血浆中 DNA 的变化^[15,16]。母体本身的染色体结构异也会导致 NIPT 结果异常。当检测值落在灰区时,我们应该进一步研究导致的 Z 值上升的具体原因。研究报道 2010 年全球的早产发生率为 11.1%,2014 年为 10.6%^[17]。我国不同地区早产发生率在 4.49%~9.90%,最新的研究表明,中国活产早产率为 6.70%^[18]。对于妊娠结局的随访,我们发现 44 例灰区病例中高危儿 11 例,所占比例高达 25%;早产儿 8 例,所占比例 20.4%,这远超出普通人群的早产发生率。44 例随访记录中 25 例产妇在生产时胎儿状况不良,甚至有 3 例孕妇发生自然流产。因此对于灰区病例特别是 NIPT 检测 Z 值两次都落在灰区,而 G 显带染色体核型分析正常的情况下,我不能单纯地解释为假阳性,这其中还涉及了一个不良的妊娠结局的风险。在表 2 中重新建库加大测序深度虽然 UR 增加,但是胎儿游离 DNA 浓度并没有随之增加,因此对于胎儿游离 DNA 浓度低于 4%的孕妇建议 4 周后重新采血检测或者直接选择侵入性产前

诊断尽快明确诊断。我们的研究发现灰区随访病例中有 8 例(18.1%,8/44)为 IVF-ET 术后双胞胎的病例,IVF-ET 的双胎病例比自然受孕的双胎病例可能更容易使 NIPT 检测的 Z 值升高。染色体异常是导致不孕症的重要原因。近年来,有学者提出染色体多态性也是导致不孕症的重要因素^[19],因此选择辅助生殖技术的患者中最常见的就是夫妻双方或者一方有染色体异常情况。这种 IVF-ET 术后的病例是由于亲本的原因或者由于胎儿本身引起的 Z 值上升,我们还需要进一步的研究。灰区结果和不良妊娠结局之间是否有因果关系还要进一步的临床实验证实和更大的数据量进行研究。

我们的结果提示,当 NIPT 检测 Z 值在灰区时,应该引起实验室人员和临床医生的重视,一方面可能存在假阳性的问题,而另一方面孕妇不良妊娠结局的风险明显提高。

参 考 文 献

- [1] MACKIE FL, HEMMING K, ALLEN S, et al. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis[J]. BJOG, 2017, 124(1): 32-46.
- [2] 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(3): 302-314.
- [3] SUN K, JIANG P, CHENG SH, et al. Orientation-aware plasma cell-free DNA fragmentation analysis in open chromatin regions informs tissue of origin[J]. Genome Res, 2019, 29(3): 418-427.
- [4] SNYDER MW, KIRCHER M, HILL AJ, et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin[J]. Cell, 2016, 164(1-2): 57-68.
- [5] ZIMMERMANN B, HILL M, GEMELOS G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(13): 1233-1241.
- [6] CANICK JA, PALOMAKI GE, KLOZA EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies [J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7): 667-674.
- [7] VAN OPSTAL D, VAN VEEN S, JOOSTEN M, et al.

- Placental studies elucidate discrepancies between NIPT showing a structural chromosome aberration and a differently abnormal fetal karyotype[J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(11): 1016-1025.
- [8] LI X, JU D, SHI Y, et al. Fetal aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing of maternal plasma DNA sequencing with "false negative" result due to confined placental mosaicism: A case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(29): e20848.
- [9] HARTWIG TS, AMBYE L, WERGE L, et al. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) in pregnancies with trisomy 21, 18 and 13 performed in a public setting-factors of importance for correct interpretation of results[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 226: 35-39.
- [10] MIYAGAMI K, MATSUOKA R, TOKUNAKA M, et al. A case of Ewing's sarcoma identified via noninvasive prenatal testing[J]. *Clinical Case Reports*, 2020, 8(5): 867-871.
- [11] JI X, CHEN F, ZHOU Y, et al. Copy number variation profile in noninvasive prenatal testing (NIPT) can identify co-existing maternal malignancies: Case reports and a literature review[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018, 57(6): 871-877.
- [12] JI X, LI J, HUANG Y, et al. Identifying occult maternal malignancies from 1.93 million pregnant women undergoing noninvasive prenatal screening tests[J]. *Genet Med*, 2019, 21(10): 2293-2302.
- [13] AMOR DJ, CHITTY LS, VAN DEN VEYVER IB. Current controversies in prenatal diagnosis 2: The 59 genes ACMG recommends reporting as secondary findings when sequencing postnatally should be reported when detected on fetal (and parental) sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(12):1508-1514.
- [14] DHARAJIYA NG, GROSU DS, FARKAS DH, et al. Incidental detection of maternal neoplasia in noninvasive prenatal testing[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(2): 329-335.
- [15] HLADY RA, ZHAO X, PAN X, et al. Genome-wide discovery and validation of diagnostic DNA methylation-based biomarkers for hepatocellular cancer detection in circulating cell free DNA[J]. *Theranostics*, 2019, 9(24): 7239-7250.
- [16] CHAN RW, JIANG P, PENG X, et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(49): E5302-5311.
- [17] CHAWANPAIBOON S, VOGEL JP, MOLLER AB, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2019, 7(1): e37-e46.
- [18] CHEN C, ZHANG JW, XIA HW, et al. Preterm birth in China between 2015 and 2016 [J]. *Am J Public Health*, 2019, 109(11): 1597-1604.
- [19] CHENG R, MA Y, NIE Y, et al. Chromosomal polymorphisms are associated with female infertility and adverse reproductive outcomes after infertility treatment: a 7-year retrospective study[J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(1): 72-80.

(收稿日期:2021-01-14)

编辑:宋文颖