

无创产前筛查在辅助生育双胎妊娠染色体非整倍体筛查中的应用价值

王东梅 杨洁霞 杜倩怡 王奕霞 彭海山 齐一鸣

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广州 广东 511442)

【摘要】 目的 评价无创产前筛查(non-invasive prenatal testing, NIPT)在辅助生育(assisted reproductive technology, ART)双胎妊娠染色体非整倍体筛查中的应用价值。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2018 年 8 月间在广东省妇幼保健院接受 NIPT 检测的 476 例 ART 双胎妊娠样本以及 402 例自然双胎妊娠样本, 回顾性对比分析 NIPT 及产前诊断结果。**结果** 两组间孕妇年龄及行 NIPT 检测的孕周有统计学差异。ART 双胎妊娠孕妇 NIPT 检查提示三体高风险 7 例(5 例 21-三体、1 例 18-三体、1 例 7-三体), 经产前诊断核型确诊 5 例双胎之一 21-三体、1 例双胎之一 18-三体、正常 1 例; 自然双胎妊娠孕妇 NIPT 检测提示 21-三体高风险 3 例, 经产前诊断确诊 2 例双胎之一 21-三体、正常 1 例。自然双胎妊娠组胎儿游离 DNA 浓度明显高于 ART 双胎妊娠组。**结论** NIPT 应用于 ART 双胎妊娠的染色体非整倍体筛查具有较高的检测效能, 但是仍存在假阳性与假阴性的局限性, 实际咨询工作中应对 ART 双胎妊娠孕妇年龄、多胎妊娠率、绒毛膜性质及胎儿游离 DNA 浓度等方面加以考虑, 对 ART 双胎妊娠 NIPT 结果判读应更加谨慎。

【关键词】 无创产前筛查; ART 双胎妊娠; 筛查应用价值

【中图分类号】 R714.23 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of non-invasive prenatal testing (NIPT) on assisted reproductive technology (ART) twin pregnancies. **Method** A total of 476 ART twin pregnancies and 402 natural twin pregnancies who received NIPT at Guangdong Province Women and Children hospital from January 2015 to August 2018 were recruited. Then retrospective analysis of the results of NIPT and prenatal diagnosis was performed. **Results** There were statistically significant differences in maternal age and gestational age between the two groups, seven cases (1.5%) of ART pregnant twins were screened out chromosome trisomy 21, 18 and 7 via NIPT, six cases were confirmed by prenatal diagnosis, and 1 case was false positive. three cases (0.7%) of natural pregnant twins were screened out chromosome trisomy 21 via NIPT, two cases were confirmed by prenatal diagnosis, and one case was false positive. The concentration of fetal free DNA in the natural twin pregnancy group was significantly higher than that in the ART twin pregnancy group. **Conclusions** It was feasible to prenatal screen chromosome aneuploidy by NIPT in ART twin pregnancies, but there are still limitations of false positive and false negative, pregnant woman age, the number of embryo, chorionic properties and fetal free DNA fraction should be take into account during actual consulting work, NIPT results of ART twin pregnancy should be interpreted more carefully.

【Key words】 Non-invasive prenatal testing; Assisted reproductive technology twin pregnancies; Application value of screening

染色体疾病是导致我国出生缺陷的主要原因之一。产前筛查及产前诊断是预防出生缺陷的有效手段。胎儿染色体非整倍体的无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)是利用大规模平行测序技术对母体外周血中的胎儿游离DNA (cell free fetal DNA, cfDNA)进行深度测序,经过数据分析后,获取胎儿染色体信息的方法,具有安全准确的优势,近年来已在临床得到良好的应用^[1]。目前已有大量文献证实 NIPT 在单胎妊娠常见染色体非整倍体筛查中的高准确性,其中 21、18、13-三体的准确率分别是 99%、97%、92%^[2]。美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)最新声明指出 NIPT 能够在不同年龄人群中替代传统的非整倍体筛查方法,但双胎妊娠及辅助生育人群仍为该技术的慎用人群。由于 ART 双胎妊娠较为复杂,染色体非整倍体发生率及介入性检查流产率均比单胎要高^[3],而目前用于其染色体非整倍体筛查的血清学技术准确性较低,因此本研究通过检测 cfDNA 对 ART 双胎妊娠样本及自然双胎妊娠样本进行无创产前筛查,以评估其筛查 ART 双胎妊娠染色体非整倍体的可行性,同时也对 ART 双胎妊娠样本胎儿游离 DNA 浓度进行分析,以评估它对 ART 双胎妊娠样本的无创产前筛查结果的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 1 月至 2018 年 8 月在广东省妇幼保健院产前诊断中心接受 NIPT 检测的双胎妊娠孕妇样本,分为 ART 组和自然妊娠对照组,其中通过 ART 方式受孕的 476 例,自然受孕的对照组 402 例。本研究通过本院伦理委员会审核,孕妇在采血前均已签署知情同意书。其他纳入标准有:孕妇体重小于 100 kg。夫妻双方染色体均无明确的异常。

1.2 研究方法 用无菌的 EDTA-K2 抗凝管采集孕妇外周血 10ml,4℃ 条件下保存,并在 6h 内分离血浆。采用 Magen 磁珠法核酸提取试剂盒提取血浆游离 DNA,以博奥晶芯胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒构建文库,Life 公司

Ion proton 平台半导体测序法,进行 NIPT 测序分析。若 Z 值在 -3~3 之间则评估为三体低风险,若 $Z > 3$ 则评估为三体高风险。

1.3 检测后续处理 NIPT 高风险病例,建议孕妇行介入性产前诊断(羊水或脐血染色体核型分析)并随访;NIPT 低风险病例,建议 22~26 周 III 级超声多普勒检查,如发现胎儿有明显的结构异常,建议进一步产前诊断,如未发现异常则建议定期产检并随访;产后新生儿检查未发现异常的,视为阴性结果。未产前诊断及失访样本不纳入研究范围。

1.4 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件处理数据,计量资料采用均数±标准差,计数资料采用频数(百分比)表达,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本基本情况分析 878 例样本按受孕方式分成 2 组,其中 ART 双胎妊娠 476 例,孕妇年龄 22~50(32.86±4.52)岁,NIPT 检查时孕周 11~33(16.84±3.88)周;对照组自然双胎妊娠 402 例,孕妇年龄 16~47(30.19±5.21)岁,NIPT 检查时孕周 11~32(17.93±4.31)周;*t* 检验分析结果显示两组间孕妇年龄间有显著性差异($t = -8.124, P < 0.001$),孕周间也有显著性差异($t = 3.949, P < 0.001$)。两组一般情况对比见表 1。ART 双胎妊娠组高龄孕妇比例是 36.1%,其中双绒毛膜双羊膜囊(dichorionic diamniotic, DCDA)和单绒毛膜双羊膜囊(monochorionic diamniotic, MCDA)比例分别为 75.4%和 3.4%,自然双胎妊娠组高龄孕妇比例是 23.6%,其中 DCDA 和 MCDA 比例分别为 40%和 39.3%。

2.2 染色体非整倍体检出情况 本次研究 NIPT 高风险检出结果与后续核型分析具体情况见表 2。ART 双胎妊娠组染色体非整倍体阳性率为 1.3%(6/476),自然双胎妊娠组为 0.5%(2/402)。

476 例 ART 双胎妊娠样本中,一共检出 7 例三体高风险样本,检出率约为 1.5%,分别为 21-三体 5 例、18-三体 1 例、7-三体 1 例。进一步介入性产前

诊断核型分析证实病例 1、2、3、4、5、6 为真阳性,均为双胎之一阳性,病例 7 为假阳性。同时检出 1 例病例 8 微缺失高风险样本,经产前诊断确定为假阳性;真阳性病例中,病例 5、6 孕妇年龄小于 35 岁,其余 4 例均为高龄妊娠,6 例患者孕周从 16~19 周不等,胎儿浓度分别是 7.5%、18.8%、30.6%、21.2%、13.1%、9.0%,绒毛膜性质均为 DCDA。

402 例自然双胎妊娠样本中,一共检出 3 例 21-三体高风险样本,检出率约为 0.7%。进一步介入性产前诊断核型分析证实病例 9、10 为真阳性,病例 11 为假阳性。2 例真阳性病例均为高龄妊娠,孕周分别是 16、18 周,胎儿浓度分别是 6.07%、19.8%,

病例 9 未知绒毛膜性,病例 10 为 DCDA。病例 11 为 MCDA,胎儿浓度是 5.4%。

表 1 ART 双胎妊娠组及自然双胎妊娠组孕妇一般情况

项目	ART 双胎妊娠 (n=476)	自然双胎妊娠 (n=402)
孕妇年龄		
<35 岁[例(%)]	304(63.9)	307(76.4)
≥35 岁[例(%)]	172(36.1)	95(23.6)
NIPT 检测孕周		
9~13 周[例(%)]	97(20.4)	52(12.9)
14~27 周[例(%)]	366(76.9)	329(81.9)
>28 周[例(%)]	13(2.7)	21(5.2)
绒毛膜类型		
DCDA[例(%)]	59(75.4)	160(40)
MCDA[例(%)]	16(3.4)	158(39.3)
未知[例(%)]	101(21.2)	844(20.7)

表 2 高风险病例信息及核型分析结果

受孕方式	序号	年龄(岁)	孕周(周)	双胎类型	胎儿浓度(%)	BMI(kg/m ²)	NIPT 结果	核型结果
ART	病例 1	37	18	DCDA	7.5	22	T21	正常/T21
	病例 2	39	17 ⁺	DCDA	18.8	21	T21	正常/T21
	病例 3	36	16 ⁺	DCDA	30.6	22	T21	正常/T21
	病例 4	35	16 ⁺	DCDA	21.2	23	T21	正常/T21
	病例 5	33	16	DCDA	13.1	20	T21	正常/T21
	病例 6	31	19 ⁺	DCDA	9.0	25	T18	正常/T18
	病例 7	26	14	DCDA	7.6	27	T7	正常/正常
	病例 8	29	14	DCDA	8.9	19	20 号微缺失	正常/正常
NP	病例 9	37	16	未知	6.07	27	T21	正常/T21
	病例 10	37	18	DCDA	19.8	30	T21	正常/T21
	病例 11	27	22	MCDA	5.4	25	T21	正常/正常

注:ART 为辅助生育;NP 为自然妊娠;BMI 为身体质量指数;DCDA 为双绒毛膜双羊膜囊;MCDA 为单绒毛膜双羊膜囊

病例后续跟踪随访,T21、T18 真阳性病例进行了减胎手术,本研究所检测的阴性样本中未出现染色体非整倍体假阴性的案例。ART 双胎妊娠组结果阴性病例中有一例双胎之一心脏超声异常,经羊

水染色体微阵列分析提示为 22q11.21 有一个大小约为 3.15Mb 的缺失。比较 NIPT 在两组中的筛查效能,具体情况见表 3。

表 3 NIPT 对 ART 双胎妊娠及自然双胎妊娠的检测效能比较

项目	ART 双胎妊娠(n=476)				自然双胎妊娠(n=402)			
	T21	T18	T13	其他	T21	T18	T13	其他
NIPT 高风险(例)	5	1	—	2 (T7、20 号微缺失)	3	—	—	—
真阳性例数(例)	5	1	—	0	2	—	—	—
阳性预测值(%)	100	100	—	0	66.7	—	—	—
假阴性例数(例)	0	0	—	1(22q11.21 微缺失)	0	—	—	—
阴性预测值(%)	100	100	—	99.8	100	—	—	—
灵敏度(%)	100	100	—	100	100	—	—	—
特异度(%)	100	100	—	99.6	99.7	—	—	—

2.3 胎儿游离 DNA 浓度分析 ART 双胎妊娠组平均游离 DNA 浓度为(12.51±5.96)%,自然双胎妊娠组平均游离 DNA 浓度为(15.35±6.71)%,见表 4。*t*

检验分析结果显示,2 组间胎儿游离 DNA 浓度具有显著差异(*t*=6.624,*P*<0.001)。自然双胎妊娠组胎儿游离 DNA 浓度明显高于 ART 双胎妊娠组。

表4 2组间胎儿游离DNA浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本例数(例)	孕妇平均年龄(岁)	孕妇平均孕周(周)	平均胎儿DNA浓度(%)
ART 双胎妊娠组	476	32.86±4.52	16.84±3.88	12.51±5.96
自然双胎妊娠组	402	30.19±5.21	17.93±4.31	15.35±6.71

3 讨论

随着高龄孕产妇的增加及辅助生育技术的发展,ART 双胎妊娠发生率越来越高。接受 ART 的孕妇大多为高龄及胚胎进行了体外培养等因素,使得这类胎儿具有相对更高的染色体异常发治疗生率^[4],对于这部分孕妇有必要进行精准的产前筛查及产前诊断。然而,临床上广泛应用的多项血清学标志物结合孕妇年龄、体重等信息及超声软指标联合的产前筛查方法假阳性率较高^[5];侵入性产前诊断方法属于诊断金标准,但对于双胎妊娠容易造成出血、感染及流产^[6],且报告周期较长;ART 妊娠胎儿本属于珍贵儿,血清学筛查无法满足 ART 孕妇的诊断需求,侵入性产前诊断又有流产风险,均难为孕妇接受。因此,临床上需要一种无创、快速、早期且准确地筛查双胎妊娠胎儿染色体非整倍体异常的方法。自 1997 年 Lo 等^[7]发现母体血浆中存在 cfDNA 后,高通量测序技术在筛查常见染色体非整倍体方面(21、18、13-三体)发展迅速,其具有非侵入性、准确性高的优点,因此被广泛应用。但目前国内外学者对无创产前筛查的准确性和可行性评估主要是针对单胎妊娠进行,而针对辅助生育双胎妊娠群体的研究和运用较少。本研究利用高通量测序技术对 ART 双胎妊娠样本及自然双胎妊娠样本进行了无创产前染色体非整倍体的筛查,并成功筛查出 8 例染色体三体阳性样本。

本研究中,针对常见的 21、18、13 号染色体非整倍体异常,ART 双胎妊娠组中 T21、T18 的 PPV(阳性预测值)、灵敏度、特异度均为 100%。由于样本量少,T13 未检出,故未做统计;自然双胎妊娠组中 T21 的 PPV(阳性预测值)、灵敏度、特异度分别为 66.7%、100%、99.7%。因样本量少,未发现 T18、T13,故未做统计。双胎妊娠组染色体非整倍体阳性率为 1.3%(6/476),自然双胎妊娠组为 0.5%(2/402),ART 双胎妊娠组染色体非整倍体异

常发生率较自然妊娠组高,可能与进行辅助生育技术的人群特点(不孕不育原因及高龄偏多)有关。

ART 双胎妊娠组出现 1 例 T7 假阳性,自然双胎妊娠组出现 1 例 T21 假阳性。假阳性的出现原因有多种可能,包括母体染色体嵌合^[8]、母体拷贝数变异^[9]、早期双胎之一消失^[10](辅助生育技术中为保证存活率通常会植入 2 个胚胎,其中可能出现一胎停育,一胎继续发育成双胎的现象,若消失的一胎染色体异常则可能造成假阳性)以及最常见的限制性胎盘嵌合^[11]。本研究中,病例 8 的 T7 假阳性考虑原因是限制性胎盘嵌合,病例 11 的 T21 假阳性考虑原因是母体染色体嵌合,需要进一步验证。

研究发现 ART 双胎妊娠组提示一例 20 号染色体存在一个大小约 22Mb 的缺失,经产前诊断证实为假阳性;另外,在后续随访中发现 ART 双胎妊娠组 NIPT 结果阴性病例中有一例双胎之一心脏超声异常,经羊水染色体微阵列分析提示为 22q11.21 有一个大小为 3.15Mb 的缺失。该区域位于 Di-george 综合征关键区域,孕妇经遗传咨询后接受减胎手术。NIPT 目前的主要检测范围为 21、18、13-三体综合征,在针对全基因组范围内筛查的同时可发现一些染色体微缺失/微重复,但由于 cfDNA 的复杂性及测序覆盖度等因素,容易出现假阳性/假阴性结果^[12]。美国妇产科医师学会(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)指出对于 cfDNA 检测微缺失的筛查尚未被临床验证,其敏感性和特异性也没有确信数据^[13]。国际产前诊断学会(International Society for Prenatal Diagnosis, ISPD)则表示 NIPT 扩展检测应当限定在研究清楚的微缺失/微重复综合征范围内,并结合临床^[14]。郭可欣等^[15]表明使用 NIPT 检测 5Mb 以上,研究较明确的胎儿 CNV 具有一定的可行性。随着技术的发展,目前 NIPT-PLUS 通过增加测序深度、改进测序技术等可检测大于 3Mb 的微缺失/微重复。

Sarno 等^[16]的研究发现双胎胎儿部分的 cfDNA 中位值较单胎低(8%比 11%, $P < 0.0001$), 取样失败率更高(9.4%比 2.9%, $P < 0.0001$), 且取样失败率随着母亲年龄及母亲体质量指数(body mass index, BMI)值升高而升高, 随着 CRL 值增加而降低。取样失败中最重要的相关因素为体外受精(in vitro fertilization, IVF), 取样失败率在单胎中为 9.5%, 双胎中为 56.2%。另外, 双胎妊娠中 cfDNA 检测比单胎更加复杂。双胎妊娠按合子性质分为单卵双胎和双卵双胎, 单卵双胎由一个受精卵分裂形成, 大多数情况下, 单卵双胎中 2 个胎儿的染色体核型是一致的, 每个胎儿的患病风险与单胎妊娠相同。双卵双胎由两个受精卵分别发育而成, 其中 2 个胎儿的患病风险是独立的, 且较单胎妊娠高。但亦有报道单卵双胎两个胎儿核型不一致的情况, 可能有以下两种解释^[17]: 一是减数分裂时染色体不分离导致形成一个 24 条染色体的配子与另一个正常的配子合成一个三体的受精卵, 发育成双胎后其中一个胚胎发生三体自救, 随机丢失一个额外的染色体, 发育成二倍体胎儿(有 1/3 的概率形成单亲二倍体), 另一个胚胎没有发生三体自救, 继续发育成三体胎儿; 二是受精卵是正常的二倍体, 双胎形成后其中一个胚胎染色体在有丝分裂中不分离, 形成三体 and 单体两种细胞系, 单体系死亡, 三体系发育成三体胎儿, 另外一个胚胎继续发育成一个正常的二倍体胎儿。若双胎中出现三体异常, 通常只有其中一个胎儿受累, 而两个胎儿分别对母血循环中贡献的 cfDNA 量不同, 有些甚至可以相差近两倍^[18,19]。若受累胎儿贡献的浓度低于 cfDNA 成功分析至少需要的 4%, 而正常胎儿贡献得多, 则会导致假阴性的出现。因此, 双胎中每个胎儿提供足够的 cfDNA 或能区分每个胎儿所占的胎儿比例是双胎筛查非整倍体的关键。梁德杨等^[19]提出单核苷酸多态性测定基因组区域间胎儿部分的差异有助于判断双胎的合子性质, 对双卵双胎, 可以确定每个胎儿所占的胎儿比例, 但应用于临床仍然有待进一步大样本研究。本研究中 ART 双胎妊娠组胎儿 cfDNA 浓度明显低于自然双胎妊娠组, 可能是由于两者的孕周计算方式不同或者是辅助生殖技术植入的胚胎在孕妇体内

生长发育速度不同于同期大小的自然双胎妊娠造成的。由于无创筛查的判断值(Z 值)与母体血浆中胎儿游离 DNA 浓度呈一定的线性关系^[20], 因此结果分析应该充分考虑双胎的绒毛膜性质及胎儿游离 DNA 浓度的影响。

综上所述, NIPT 在筛查辅助生育双胎妊娠染色体非整倍体中有一定可行性, 且不受孕周限制, 但也存在假阳性与假阴性的局限性。对于阳性病例我们仍需进一步介入性产前诊断才可明确双胎中哪一胎受累, 但在大多数双胎均正常的情况下, NIPT 避免了不必要的侵入性检查, 减少了孕妇的焦虑与担忧。NIPT 阴性病例后续必须进行超声监测以及常规产检, 发现异常及时就诊以及进一步产前诊断。同时本研究中由于样本数量较少, 仅检出 8 例三体高风险, 阳性率缺乏与单胎筛查的可比性。该技术在双胎妊娠中的临床应用仍需进一步大规模的临床数据支持验证。

参 考 文 献

- [1] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [2] Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2014, 35(3): 156.
- [3] Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, et al. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(4): 330-353.
- [4] Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, et al. Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995-2000: a national cohort study[J]. Hum Reprod, 2008, 23(7): 1545-1552.
- [5] Bush MC, Malone FD. Down syndrome screening in twins[J]. Clin Perinatol, 2005, 32: 373-386.
- [6] Simonazzi G, Curti A, Farina A, et al. Amniocentesis and chorionic villus sampling in twin gestations: which is the best sampling technique? [J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 202(4): 365. e1-e5.
- [7] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal

- DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [8] Wang YL, Chen Y, Tian F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing[J]. *Clin Chem*, 2014, 60:251-259.
- [9] Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372:1639-1645.
- [10] Grmminger S, Yagmur E, Erkan S, et al. Fetal aneuploidy detection by cell-free DNA sequencing for multiple pregnancies and quality issues with vanishing twins[J]. *J Clin Med*, 2014, 3:679-692.
- [11] Choi H, Lau TK, Jiang FM, et al. Fetal aneuploidy screening by maternal plasma DNA sequencing: "False positive" due to confined placental mosaicism[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33:198-200.
- [12] 胡芷洋, 高雅, 郭辉, 等. 无创产前检测筛查胎儿微缺失微重复综合征阳性病例的临床分析[J/CD]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2016, 8(1):14-18.
- [13] Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(3):e31-7.
- [14] 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(8):725-34.
- [15] 郭可欣, 杨丽, 邓涛, 等. NIPT 用于胎儿染色体微缺失/微重复检测的进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(10):10-12.
- [16] Sarno L, Revello R, Hanson E, et al. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47(6):705-711.
- [17] Yang JX, Qi YM, Hou YP, et al. Performance of non-invasive prenatal testing for trisomies 21 and 18 in twin pregnancies[J]. *Mol Cytogenet*, 2018, 11:47.
- [18] Qu JZ, Leung TY, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(2):427.
- [19] Leung TY, Qu ZZ, Liao JW, et al. Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33:675-681.
- [20] 许旭平, 谢美娟, 甘海燕, 等. 基于高通量测序技术无创筛查双胎染色体非整倍体及胎儿游离 DNA 浓度分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(6):375-379.

(收稿日期:2019-05-27)

编辑:宋文颖