

# 胎儿游离 DNA 浓度的影响因素及相关产前筛查/诊断策略探讨

邢铃苓<sup>1</sup> 刘洪倩<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西第二医院 医学遗传科/产前诊断中心; 2. 四川大学华西第二医院 妇产科 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都, 610041)

**【摘要】** 自1997年在孕妇血浆中发现了胎儿游离DNA后,无创产前筛查(non-invasive prenatal screening, NIPS)便应运而生,并迅速在全球临床开展。NIPS检测失败率约1%~3%,胎儿游离DNA浓度(fetal fraction, FF)低是其中一个重要的原因。本文主要对影响FF的胎儿因素、母体因素、实验室因素进行探讨,并结合孕妇相关临床特征、妊娠结局等,对进一步产前检查的选择进行探讨,以期为产前遗传咨询提供参考。

**【关键词】** 无创产前筛查; 胎儿游离DNA浓度; 检测失败; 遗传咨询

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

## 1 概述

正常人血液及体液循环中存在来源于细胞核DNA和线粒体DNA的少量游离DNA(cell free DNA, cfDNA)。1997年,Lo等人<sup>[1]</sup>在母体血浆中发现了游离的胎儿DNA片段(cell free fetal DNA, cffDNA)。cffDNA主要来自胎盘和胎儿细胞,片段较小,长度在75bp~205bp左右。胎盘滋养层细胞分泌cffDNA进入母体血浆,在孕4周左右即可检出,孕8周建立胎盘循环后cffDNA则以一定比例稳定存在于母体外周血血浆中(图1)。妊娠使母体循环中cfDNA的总量增加了约3%~13%。胎儿游离DNA浓度(fetal fraction, FF)是cffDNA占母体cfDNA总量的百分比 $[FF = cffDNA / (cffDNA + 母源cfDNA) \times 100\%]$ 。既往研究表明,受孕妇和胎儿特征的影响,FF在孕10至15周之间约为10%~20%<sup>[2-3]</sup>。无创产前筛查(non-invasive prenatal screening, NIPS)就是采用大规模平行测序等技术检测孕妇外周血血浆游离DNA,对测序结果进行生物信息学分析,来量化胎儿染色体非整倍体异常的风险。该检测技术于2011年进入临床应用,因

筛查效能高于传统血清学筛查,逐步成为美国妇产科医师学会(ACOG)推荐的染色体非整倍体一线筛查方法。在我国,NIPS也在临床广泛应用。其中,FF是影响NIPS检测准确性的重要因素,FF过低也是NIPS检测失败的主要原因。

研究表明,因低FF导致NIPS检测失败的孕妇群体,其胎儿发生染色体异常的风险较普通孕妇群体偏高<sup>[4]</sup>。本文主要对影响FF的胎儿因素、母体因素、实验室因素进行探讨,并结合孕妇相关临床特征、妊娠结局对进一步产前检查的选择进行探讨,以期为临床遗传咨询提供参考。

## 2 NIPS中FF的检测方法

FF是NIPS测序结果的主要生物信息学分析质控因素,现有的FF检测方法如表1<sup>[6]</sup>。

2.1 基于DNA片段大小的方法 cfDNA的大小分布在不同群体中具有共同的特征,呈“阶梯”状分布,在166bp处有一个优势峰。然而,cfDNA由于特定的起源组织而表现出轻微的差异特征。胎儿和母体cfDNA片段的优势峰分别为143bp和166bp<sup>[7]</sup>,即胎儿cfDNA通常比母体cfDNA短。因此,较高的FF在理论上应该与短cfDNA分子的百分比增

加有关。该方法的关键是找到分属于胎儿和母体本身的片段长度区间,然后计算出胎儿序列片段的占比。2014年,Lo等通过计算孕妇血样中长度在100~150bp之间的DNA片段与长度在163~169bp之

间的DNA片段的相对比例来估算胎儿浓度,并与基于Y染色体的方法对比,结果发现两种估算胎儿浓度的结果高度一致<sup>[8]</sup>。

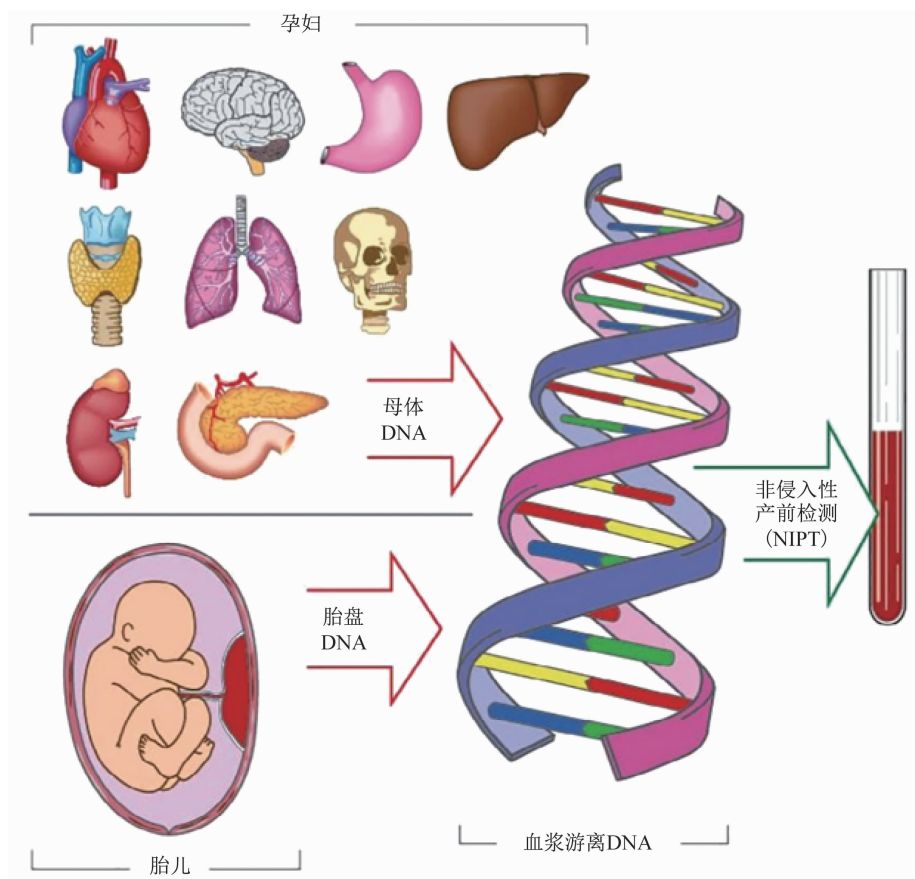


图1 孕妇血浆 cfDNA 的来源<sup>[5]</sup>

表1 现有不同 FF 检测方法的优劣及局限

方法	优势	局限
基于 DNA 片段大小的方法	易在常规 NIPS 中开展	准确性一般
基于 SNP 位点亲本基因型的方法	直观	需要胎儿父亲的信息
基于 Y 染色体的方法	简单、准确	不能用于女胎
基于母体血浆 DNA 高深度测序	准确	昂贵、测序深度需要高达 120x
SeqFF 模型	高效	FF<5%时,性能降低
基于核小体轨迹的方法	热门方向、经济	准确性有待提高
基于甲基化的方法	准确	昂贵、稳定性待提高

2.2 基于 SNP 位点亲本基因型的方法 这是一种通过检测双亲单核苷酸多态性(SNP)位点来确定 FF 的方法。由于胎儿的遗传物质一半来自父亲,另一半来自母亲,对于父亲和母亲均为纯合但基因型不同的 SNP 位点,胎儿的基因型为杂合。因此,基

于此种 SNP 位点,通过识别母体血浆中胎儿特异性等位基因,计算其与血浆中总等位基因的比率是量化 FF 的直接而准确的方法。但这种方法的可行性受样本限制,因为临床上常规 NIPS 只收集孕妇的外周血样本,父亲血样的获取比较困难。

2.3 基于 Y 染色体的方法 孕妇血浆中的 Y 染色体 DNA 片段通常来自男性胎儿。在以往基于 Y 染色体测定 FF 的研究中,使用最多的方法是定量荧光扩增(quantitative fluorescence amplification, qPCR),该方法主要通过对孕妇血浆中 Y 染色体上的基因(如 SRY、DYS14、ZFY 等基因)定量来代表胎儿来源 DNA 量,对 X 染色体上的基因如 ZFX 定量来代表游离 DNA 总量。另外,临床上利用二代测序数据来分析 Y 染色体的含量的方法,降低了成

本、提高了效率<sup>[9]</sup>。虽然基于 Y 染色体的方法简单准确,但只能针对男胎,不适用于女胎。

2.4 基于母体 cfDNA 高深度测序 为了消除对亲本基因型信息的依赖,科学家们开发了一种被称为 FetalQuant 的方法,通过使用高深度靶向大规模平行测序来测量 FF,该方法的预测结果与基于亲本基因型的方法推导的结果非常接近,但局限性为测序深度需要高达 120x 才能可靠地确定胎儿等位基因<sup>[10]</sup>。

2.5 SeqFF 模型 Sung K. Kim 团队开发的 SeqFF 模型,尝试从 NIPS 常规深度的测序数据中直接计算胎儿 DNA 分数。这是一种更加准确和高效的方法,但是这种高维模型在构建过程中需要大规模的样本数据,且当 FF 低于 5% 时,性能大大降低,可能是因为 FF < 5% 的病例数相对较少,不足以构建 Enet 模型<sup>[11]</sup>。

2.6 基于核小体轨迹的方法 血浆 DNA 核小体测定 FF 是一个比较热门的方向。Straver 等收集孕妇血样,基于游离 DNA 的单端测序数据生成全基因组核小体图谱,以产生假设的“核小体轨迹”。研究发现核小体中心上下游 73 bp 区域内的 reads 数与 FF 呈正相关。然而,相关系数仅为 0.636,较其他方法低。因此,基于“核小体轨迹”的方法有待进一步开发<sup>[12]</sup>。

2.7 基于甲基化的方法 母胎存在甲基化差异性位点,Nygren 团队开发了一种 FF 检测方法-FQA,

通过比较胎盘组织和母体血沉棕黄层的 5 个差异甲基化区域,测量甲基化敏感限制性内切酶酶切后的总 DNA(母体和胎儿)和胎儿甲基化 DNA 的拷贝数来估算 FF。其检测结果与基于 Y 染色体的定量方法具有较好的一致性。但因实验涉及甲基化敏感限制酶的消化,其稳定性还需要更多的实验验证<sup>[13]</sup>。

大规模平行亚硫酸盐测序作为另一种基于甲基化的方法,是根据 cfDNA 在差异甲基化区域的比例来估算 FF<sup>[14]</sup>。有研究利用全基因组亚硫酸盐测序获取 cfDNA 的甲基化谱,分析了多个甲基化标记区域关联组织的甲基化谱来推断血浆中不同组织的占比<sup>[15]</sup>。这种方法与基于亲本基因型的方法对比,准确性得到了验证,但检测成本较高。

### 3 低 FF 发生率

国际产前诊断学会(ISPD)发表的声明提示,在一些大型实验室报告中 NIPS 检测失败率约为 1.9%~6.4%<sup>[16]</sup>。不同测序平台,包括 Verinata, LifeCodexx, Sequenom, BGI, Ariosa, Natera 等,报告的检测失败率范围从 1.6% 到 6.4% 不等<sup>[17]</sup>。多中心研究表明,FF 低于 4% 是 NIPS 检测失败的主要原因(41.88%~100%,71.32%),其他原因包括测序失败以及母体外周血血浆总 DNA 浓度高于质控标准等。笔者汇总了国内外部分 NIPS 检测实验室提供的检测失败率及 FF < 4% 占比情况,检测失败率低于前期文献报道,见表 2。

表 2 国内外医院 NIPS 样本的检测失败率及 FF < 4% 占比<sup>A</sup>

数据来源	首次 NIPS 检测失败率[% (例)]	FF < 4% 占比[% (例)]
四川大学华西第二医院 <sup>[18]</sup>	0.32(394/123291)	79.44(313/394)
陆军军医大学第一附属医院(重庆西南医院) <sup>[19]</sup>	0.12(47/40311)	100(47/47)
上海市产前诊断中心 <sup>[20]</sup>	0.15(308/210923)	41.88(129/308)
南京医科大学附属常州妇幼保健院 <sup>[21]</sup>	0.63(200/31832)	60.71(17/28) <sup>B</sup>
江西省妇幼保健院产前诊断中心 <sup>[22]</sup>	0.64(154/23704)	57.14(88/154)
Siriraj 医院 <sup>[23]</sup>	5.33(462/8659)	69.91(323/462)

注:A:纳入样本量>8000 的研究;B:重采血复检后的 FF;C:基于 SNP 的 NIPS。

### 4 FF 的影响因素

FF 存在较大的个体间差异,任何增加母体贡献和/或减少胎儿、胎盘贡献的疾病都可能降低 FF。除母体、胎儿、胎盘以外,实验室技术和 FF 的计算方法也可能影响 FF。近期一篇文章总结了 FF 的

影响因素,见表 3<sup>[5]</sup>。

#### 4.1 cfDNA 过低(胎儿因素)

4.1.1 胎龄 现有研究表明,FF 通常与孕周(胎龄)呈正相关,不同妊娠阶段的胎儿 DNA 分数增加速率不同,可能是由于随着胎龄的增加,胎盘体积逐渐增加,凋亡滋养层细胞也逐渐增加导致更多的

cffDNA 片段被释放到母体血浆中,导致 FF 增加<sup>[24-26]</sup>。

表 3 影响 FF 的相关因素引起 FF 变化的情况

影响 FF 的相关因素	FF 变化情况
胎儿因素	
孕周	正相关
顶臀长(CRL)	正相关
嵌合	减少
胎儿非整倍性	变量
三倍体	减少
多胎妊娠	总 FF 增加,但每个胎儿的 FF 减少
孕妇自身因素	
体重/BMI	负相关
自身免疫性疾病	疾病活动期减少
使用低分子肝素	减少(有争议)
血清学筛查标志物 PAPP-A、 $\beta$ -HCG	增加
种族	变量
辅助生殖技术	减少
孕产次	减少
年龄	减少

4.1.2 胎儿染色体异常 既往研究表明,低 FF 导致 NIPS 失败的孕妇中,胎儿三倍体较常见,且胎儿非整倍体的风险增高。NIPS 检测失败后报告的非整倍体包括:T13、T18、T21、T16 嵌合和 X 单体<sup>[5]</sup>。同时,怀有非整倍体胎儿的孕妇血浆中 FF 随非整倍体类型不同而有差异<sup>[3,26-28]</sup>。研究发现,T21、T18 和 T13 胎儿的孕妇 Z 值与 FF 之间存在很强的正相关关系,而在 T18 低风险样本中观察到负相关<sup>[29]</sup>。与 T21 相比,T13 和 T18 的中位 FF 值较低,总体检出率也较低<sup>[30-32]</sup>。这些发现或许可以通过 T18 和 T13 的胎儿生长受限或胎盘尺寸较小导致 FF 小于整倍体胎儿来解释,进而可以部分解释为何 NIPS 对 T21 的检测效能优于 T18 和 T13。

4.1.3 其他 胎儿顶臀长、嵌合等也被一些学者认为可影响 FF。FF 随 CRL 增加而增加,胎盘嵌合 FF 减少<sup>[3,33]</sup>。

4.2 母源 cfDNA 过高(母体因素) FF 降低的另一种可能是由于稀释效应或由于母体 cfDNA 的增加而导致 cffDNA 含量的相对降低。任何可引起 cfDNA 增高的母体因素均可引起母体外周血 cffDNA 浓度降低,即 FF 降低<sup>[3,32]</sup>。

4.2.1 孕妇 BMI 值 母体 BMI 值过高是 FF 过低致 NIPS 检测失败的相关因素之一。随着孕妇 BMI

升高,循环血容量增加导致血浆中游离 DNA 总量增加,稀释了胎儿来源的 cfDNA,导致 FF 降低。另外,肥胖孕妇血浆中的母体 cfDNA 不仅来源于凋亡造血细胞,还来自脂肪和基质血管组织的凋亡和坏死细胞<sup>[28]</sup>。

4.2.2 孕妇自身疾病及妊娠相关并发症 本中心 NIPS 随访数据提示,总 cfDNA 浓度过高的孕妇中,约 70% 合并了自身免疫性疾病(systemic autoimmune diseases, SAD)如抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome, APS)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、干燥综合征(sjogren syndrome, SS)以及妊娠高血压(pregnancy induced hypertension, PIH)等妊娠相关并发症。与总 cfDNA 浓度正常的相比,有统计学差异。

根据孕妇 BMI 与 FF 的负相关性推测,临床上常伴有肥胖的疾病如多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)、激素治疗的 SAD 和糖尿病也可能会导致 FF 降低,使 NIPS 失败的发生率增加,但目前的研究结果尚未证实这一观点<sup>[34]</sup>。

对于有母体疾病或并发症的患者,母体血浆 cfDNA 的浓度普遍增加<sup>[35]</sup>。母体合并肿瘤,cfDNA 含量增加可能与肿瘤细胞坏死和凋亡有关,循环肿瘤 DNA(ctDNA)可通过降低血浆中 cffDNA 的占比而增加 NIPS 假阴性的可能性。

SAD 是一种多因素疾病,其特征是出现自身反应性免疫细胞和特异性自身抗体。多种疾病机制包括细胞凋亡、坏死、炎症反应或活性细胞的释放,都被认为是这些 SAD 患者 cfDNA 的来源。此外,cfDNA 产生和清除之间的不平衡已被假定为另一种机制<sup>[36]</sup>。值得注意的是,一项研究显示 APS 患者与健康受试者孕妇的 cffDNA 定量分析结果无显著性差异<sup>[37]</sup>。这表明,孕妇增加的 cfDNA 部分可能主要来自母体细胞,而不是胎儿细胞。同样,现有文献表明 SLE 及 SS 患者的 cfDNA 浓度较正常人群明显升高。此外,与处于非活动期的患者相比,处于疾病活动期的 SLE 患者的 cfDNA 水平更高<sup>[38-39]</sup>。

同时,越来越多的证据表明,胎盘来源的 cffDNA 升高与 PIH 相关,PIH 作为产科常见疾病,是妊娠特有的一种综合征。关于 PIH 与 cfDNA 的关

系,前期研究提示妊娠中转运的母、胎 cfDNA 浓度与 PIH 异常增高,且 DNA 释放量与疾病严重程度相关。亦有学者指出<sup>[40]</sup>,在 PIH 预测中,总 cfDNA 似乎比 cffDNA 增加更明显,cffDNA 水平升高与妊娠并发症之间没有关系,但总 cfDNA 作为 PIH 的生化标志物发挥作用,则需要具有同质人群和标准化方法的大型前瞻性研究来进一步确认其预测价值<sup>[40-44]</sup>。究其机制,PIH 患者的主要病理学因素可能是由于滋养层不能有效地侵入蜕膜和缺乏动脉导管壁的侵入导致胎盘的缺陷,胎盘滋养层和合体滋养层细胞凋亡率增加,引起更多的 cffDNA 释放入血,cffDNA 在 PIH 出现症状之前水平的增加可能是由于缺氧和氧化应激导致胎盘细胞凋亡和坏死增加,另外 cffDNA 可以通过激活先天免疫 DNA 传感器来损害滋养层迁移,从而对胎盘功能产生局部影响;有研究发现 PIH 的孕妇有核细胞通透性增高,在 PIH 发生前的几个星期,母循环中有核红细胞的数目异常增加,cfDNA 升高可能还与其清除率下降有关,因为在 PIH 患者中已经发现包括肝脏、肾脏在内的病理学改变,因此可能器官损害导致 cfDNA 清除异常,最终导致 cfDNA 水平升高;与正常妊娠源性 cffDNA 相比,PIH 的 cffDNA 增加了炎症细胞因子水平,循环 cfDNA 和 cffDNA 升高可诱发胎盘炎症反应,导致 PIH 病理特征加速<sup>[45-50]</sup>。

4.2.3 孕期用药 既往研究发现,低 FF 导致的 NIPS 失败可能发生在多达 18% 的接受低分子量肝素(low molecular weight heparin, LMWH)治疗的孕妇中,即使在控制了母亲体重和过度紧张之后,与未经治疗的女性相比也有显著差异<sup>[51-52]</sup>。可能的机制包括,肝素对 DNA 聚合酶具有很强的亲和力,并影响 PCR 检测中  $Mg^{2+}$  的浓度;孕妇血浆 DNA 中含有较高比例的小片段 DNA,其 GC 含量很高。将采集血液样本的时间调整到下一次用药前,可能会提高这些孕妇复查 NIPS 的成功率<sup>[53]</sup>。同时,也有一些学者指出,这些研究缺乏适当的方法,证据不足。母体因素可能是 cfDNA 浓度升高的主要原因,低 FF 和 LMWH 之间的关系是由于潜在的疾病而不是治疗本身<sup>[54]</sup>。然而,美国妇产科学杂志近期发表的一篇文章认为,使用抗凝药(非阿司匹林)与

cfDNA 片段大小或 GC 含量的差异无关,且染色体水平 Z 值的差异不会对临床非整倍体检测产生影响。这表明抗凝治疗对 FF 可能有稀释作用,从而导致基于 cfDNA 的 NIPS 检测失败,而不是实验室或测序水平的变化<sup>[55]</sup>。LMWH 和低 FF 导致 NIPS 失败之间相互作用的确切机制仍有待阐明。

4.3 实验室因素 FF 的测量并不精确,目前的方法无法对 FF 进行可靠、一致地估算,实验室之间的 FF 阈值也存在很大差异,低于阈值就无法获得检测结果<sup>[56]</sup>。阈值取决于每个实验室使用的技术平台和生物信息学算法,以及单个样本特征。实验室应对其检测范围和低 FF 结果阈值进行内部验证<sup>[61]</sup>。

生物信息学分析方法可能对 FF 的测定产生较大的影响。以基于 DNA 片段大小的方法为例,由于胎儿来源的 DNA 通常较短,而母源 DNA 中较短的片段可能会被误解为胎儿来源。未来的研究应以建立最佳的生物信息学工具为方向。

## 5 NIPS 检测失败的孕妇妊娠结局追踪

笔者摘取了四川大学华西第二医院 378 例 NIPS 检测失败病例随访资料<sup>[18]</sup>,发现产前、产后共检出 15 例染色体异常,约 10% 的孕妇出现异常妊娠结局;在染色体异常病例中,拷贝数变异占 66.67% (10/15),见表 4。另有不同研究中心 NIPS 测试失败后行羊水细胞核型分析的染色体异常,见表 5。上述结果提示,由于核型分析分辨率的局限,NIPS 检测失败的病例中,胎儿染色体异常比例可能高于既往研究报道。

表 4 四川大学华西第二医院 NIPS 检测失败病例妊娠结局<sup>[18]</sup>

妊娠结局	特征	失败病例[例(%)]
进行介入性产前诊断	染色体结果异常	14(3.70)
	染色体结果正常	121(32.01)
	正常妊娠结局	116(30.69)
	异常妊娠结局	5(1.32)
	出生后发育异常	2(0.53)
	早产	1(0.26)
	流产	1(0.53)
拒绝行产前诊断	正常妊娠结局	210(55.56)
	异常妊娠结局	33(8.73)
	出生后发育异常	3(0.79)
	早产	2(0.53)
	流产	13(3.44)

表5 不同研究中 NIPS 测试失败情况下的染色体异常率

研究(作者、年份)	研究类型	研究例数(例)	染色体异常率(%)	染色体异常例/NIPS失败数(例)
Norton, et al., 2015 <sup>[57]</sup>	前瞻性队列研究	15841	2.7	13/488
Revello, et al., 2016 <sup>[58]</sup>	队列研究	10698	2.6	8/308
Hancock, et al., 2020 <sup>[59]</sup>	回顾性队列研究	58048	7.6	24/316
McKanna, et al., 2019 <sup>[60]</sup>	队列研究	>16500	4.2	48/1148

## 6 进一步产前检测方法选择的思考

ISPD 在 2023 年声明指出,胎儿游离 DNA 浓度是一项重要的质控指标,但实验室之间和检测方法之间存在很大差异,实验室应对其检测限和检测失败结果的阈值进行内部验证。医疗服务提供者(实验室和临床医生)应建立临床路径,以管理 NIPS 检测失败的患者。这可能包括详细的超声检查、提供重复 NIPS、替代筛查试验和/或产前诊断<sup>[61]</sup>。

根据首次 NIPS 检测失败的原因规范临床路径管理对于为孕妇提供准确的信息和减少焦虑非常重要<sup>[62]</sup>。以  $FF < 4\%$  导致 NIPS 检测失败为例,临床医生在提供建议前,要考虑到以下因素<sup>[5]</sup>:

(1) 孕妇的身体质量指数(BMI)是多少?

(2) 是否有可能的相关母体疾病(如抗凝脂综合征、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病;妊娠高血压等并发症)?

(3) 是否使用低分子量肝素或其他抗凝药物?

(4) 是否通过辅助生殖技术怀孕,是否已通过超声检查确定妊娠情况?

(5) 是否为多胎妊娠? 绒毛膜性如何?

(6) 超声是否提示染色体异常相关表型?

进一步可选的非整倍体风险评估方式包括:

6.1 NIPS 重采血复检 研究提示,在 NIPS 首次检测失败的孕妇进行重采血复检,超过 60% 的孕妇获得了有效的 NIPS 结果。且  $FF < 4\%$  或 Z 值临界致 NIPS 失败的孕妇,其复检成功率远高于因基因组图谱改变(z 值异常)致 NIPS 失败的病例<sup>[21-23,62]</sup>。若孕妇的产前超声等检查正常,且未合并影响 FF 的情况,同时孕妇明确表达希望避免介入性产前诊断,则可以为她提供染色体非整倍体的替代筛查如妊娠中期血清学联合筛查,或重复抽血进行 NIPS。需要特别考虑到孕周,通过重采血复检获得有效 NIPS 结果的成功率随着胎龄的增加而增加,但可

能会导致胎儿非整倍体产前诊断时机延迟。因此,重采样时间应严格把控,保证孕妇在 NIPS 重采血复检失败时,能有时机进行血清学联合筛查或介入性产前诊断;复检结果提示高风险时,能够进行介入性产前诊断。若孕妇正在使用低分子肝素,则建议其在下一次用药前采样。

6.2 介入性产前诊断 美国妇产科医师学会(ACOG)和母胎医学协会(SMFm)提出,低 FF 导致 NIPS 检测失败的人群发生非整倍体的风险增加,这些患者应进一步接受遗传咨询,并提供全面的超声评估和诊断性检测。他们指出,那些在适当的孕周采血的孕妇,虽然可以再次检测,但可能导致胎儿非整倍体异常的诊断延迟,可能会限制生育选择,而且只有 50%~60% 的重复筛查可成功得到检测结果<sup>[60-64]</sup>。且有研究表明 NIPS 失败的胎儿染色体异常类型主要为拷贝数变异(66.67%),这使得 NIPS 检测失败病例染色体异常发生率较以往研究增加<sup>[18]</sup>。此外,虽然羊膜腔穿刺术和绒毛取样(CVS)的妊娠期胎儿丢失率分别约为 1/1000 和 1/500<sup>[65-66]</sup>,但有创手术后进行的产前诊断检查成功率高,使孕妇能够根据随后的有创产前诊断结果更好地决定妊娠管理。文献表明,检测产前样本(羊水、脐血或绒毛组织)的总体成功率可高达 98%~99%,几乎不受样本类型的影响<sup>[67-68]</sup>。因此,权衡利弊,对于胎龄相对较大的孕妇在 NIPS 失败后进行介入性产前诊断确定胎儿是否有染色体异常比不进行的孕妇综合风险更小,更有利于临床医生及孕妇决定随后的妊娠管理。

6.3 其他 对于重采血复检仍提示  $FF < 4\%$ ,且孕妇自身合并了影响 FF 因素的孕妇,可在充分告知不同检测技术的优势、局限性及风险前提下,遵循孕妇意愿选择其他替代筛查或介入性产前诊断。另外,研究提示低 FF 导致 NIPS 失败的孕妇发生早产的风险增加<sup>[69]</sup>,但低 FF 在预测不良妊娠结局方面

的价值需要进一步确定<sup>[70]</sup>。遗传咨询时临床医生可提醒孕妇警惕早产的可能性。

#### 参 考 文 献

- [1] LO YM, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] PALOMAKI GE, KLOZA EM, LAMBERT-MESSERLIAN GM, HADDOW JE, NEVEUX LM, EHRICH M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect down syndrome: an international clinical validation study[J]. *Am J Med Genet*, 2011, 13(11):913-920.
- [3] ASHOOR G, SYNGELAKI A, POON LC, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 41(1):26-32.
- [4] NICOLAIDES KH, SYNGELAKI A, DEL MAR GIL M, et al. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2014, 35(3):212-217.
- [5] HUI L, BIANCHI DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(2):155-163.
- [6] PENG XL, JIANG P. Bioinformatics Approaches for Fetal DNA Fraction Estimation in Noninvasive Prenatal Testing[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):453.
- [7] SHI J, ZHANG R, LI J, et al. Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing[J]. *Theranostics*, 2020, 10(11):4737-4748.
- [8] YU SC, CHAN KCA, ZHENG YW, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111:8583-8588.
- [9] HUDECOVA I, SAHOTA D, HEUNG MM, et al. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88484.
- [10] JIANG P, CHAN KCA, LIAO GJ, et al. Fetalquant: Deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28:2883-2890.
- [11] 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, 35:810-815.
- [12] STRAVER R, OUDEJANS CB, SISTERMANS EA, et al. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles[J]. *Prenat. Diagn*, 2016, 36:614-621.
- [13] NYGREN AO, DEAN J, JENSEN TJ, et al. M. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination[J]. *Clin. Chem*, 2010, 56:1627-1635.
- [14] LUN FM, CHIU RWK, SUN K, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA[J]. *Clin Chem*, 2013, 59:1583-1594.
- [15] SUN K, JIANG P, CHAN KCA, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112:E5503-E5512.
- [16] 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.
- [17] CUCKLE H. cfDNA screening performance: accounting for and reducing test failures[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017, 49(6):689-692.
- [18] LIU S, LIU H, LIU J, et al. Follow-up in patients with noninvasive prenatal screening failures: a reflection on the choice of further prenatal diagnosis[J]. *Front Genet*, 2021, 12:666648.
- [19] 罗艳梅, 胡华梅, 章容, 等. 无创产前检测失败相关因素与重复检测的可行性分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(6):603-608.
- [20] 陈珏, 朱丽萍, 岑舒远, 等. 210923例孕妇外周血胎儿游离DNA无创产前筛查研究[J]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2023, 15(1):29-34.
- [21] 张珍, 沈聪, 王慧艳, 等. 孕妇外周血胎儿游离DNA无创产前检测失败原因的初步分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(3):329-333.
- [22] 卢婉, 刘艳秋, 黄婷, 等. 孕妇外周血无创产前检测失败的原因分析及妊娠追踪[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(1):63-68.
- [23] PANCHALEE T, POUNGVARIN N, AMORNRIIT W, et al. Clinical performance of DNA-based prenatal screening using single-nucleotide polymorphisms approach in Thai women with singleton pregnancy[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(7):e1256.
- [24] DENG C, LIU J, LIU S, et al. Maternal and fetal factors influencing fetal fraction: A retrospective analysis of 153,306 pregnant women undergoing noninvasive prenatal screening[J]. *Front Pediatr*, 2023, 11:1066178.
- [25] HOU Y, YANG J, QI Y, et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction: statistical analysis of 13,661 maternal plasmas for non-invasive prenatal screening[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1):62.
- [26] 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(6):698-704.
- [27] ZHOU Y, ZHU Z, GAO Y, et al. Effects of maternal and fetal characteristics on cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma[J]. *Reprod Sci*,2015,22:1429-1435.
- [28] SUZUMORI N, EBARA T, YAMADA T, et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy[J]. *J Hum Genet*,2016,61:647-652.
- [29] XU XP, GAN HY, LI FX, et al. A method to quantify cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma using next generation sequencing: its application in non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection[J]. *PLoS One*,2016,11(1):e0146997.
- [30] PALOMAKI GE, KLOZA EM, Lambert-Messerlian GM, et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative[J]? *Prenat Diagn*,2015,35(3):289-293.
- [31] VORA NL, JOHNSON KL, BASU S, et al. A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI[J]. *Prenat Diagn*,2012, 32(9):912-914.
- [32] 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.
- [33] BRISON N, NEOFYTOU M, DEHASPE L, et al. Predicting fetoplacental chromosomal mosaicism during non-invasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*,2018 ,38(4):258-266.
- [34] 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.
- [35] CARBONE IF, CONFORTI A, PICARELLI S, et al. Circulating Nucleic Acids in Maternal Plasma and Serum in Pregnancy Complications: Are They Really Useful in Clinical Practice? A Systematic Review[J]. *Molecular diagnosis & therapy*,2020,24(4):409-431.
- [36] DUVVURI B, LOOD C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases[J]. *Front Immunol*,2019, 10:502.
- [37] KORABECNA M, ULCOVA-GALLOVA Z, HORINEK A, et al. Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies[J]. *Autoimmunity*,2014,47(7):473-477.
- [38] XU Y, SONG Y, CHANG J, et al. High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE[J]. *Eur J Clin Invest*,2018,48(11):e13015.
- [39] BARTOLONI E, LUDOVINI V, ALUNNO A, et al. Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren's syndrome[J]. *Lupus*, 2011,20(9):928-935.
- [40] KARAPETIAN AO, BAEV OR, SADEKOVA AA, et al. Cell-Free Foetal DNA as a Useful Marker for Preeclampsia Prediction[J]. *Reprod Sci*, 2021 ,28(5):1563-1569.
- [41] SARZYNSKA-NOWACKA U, KOSINSKI P, WIELGOS M. Is there a future for cell-free fetal dna tests in screening for preeclampsia[J]? *Ginekol Pol*,2019,90(1):55-60.
- [42] WU Y, WERLANG A, CHENG W, et al. Association between Levels of Total Cell-Free DNA and Development of Preeclampsia-A Literature Review[J]. *AJP Rep*, 2021 ,11(1):e38-e48.
- [43] POON LC, MUSCI T, SONG K, et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes[J]. *Fetal Diagn Ther*,2013,33(4):215-223.
- [44] ROLNIK DL, OGORMAN N, FIOLENA M, et al. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of preeclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015,45(1):106-111.
- [45] SEKIZAWA A, JIMBO M, SAITO H, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2003,188(2):480-484.
- [46] MADAZLI R, BENIAN A, ILVAN S, et al. Placental apoptosis and adhesion molecules expression in the placenta and the maternal placental bed of pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia[J]. *J Obstet Gynaecol*,2006 ,26(1):5-10.
- [47] AL-MUFTI R, HAMBLEY H, ALBAIGES G, et al. Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia[J]. *Hum Reprod*,2000,15(7):1624-1628.
- [48] ANTONIO FARINA, AKIHIKO SEKIZAWA, YUMI SUGITO, et al. Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients[J]. *Prenat diagn*,2004,24(2): 83-86.
- [49] OZEKI A, TANI K, TAKAHASHI H, et al. Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signaling in the human placenta[J]. *J Hypertens*, 2019,37(12):2452-2460.
- [50] LEÓN-MARTÍNEZ D, LYNN T, ABRAHAMS VM. Cell-free fetal DNA impairs trophoblast migration in a TLR9-dependent manner and can be reversed by hydroxychloroquine [J]. *J Reprod Immunol*, 2023,157:103945.
- [51] MA G, WU W, LEE M, et al. Low-molecular-weight heparin associated with reduced fetal fraction and subsequent false-negative cell-free DNA test result for trisomy 21 [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018,51:276-277.
- [52] BURNS W, KOELPER N, BARBERIO A, et al. The asso-



- ciation between anti-coagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction[J]. *Prenat Diagn*, 2017,37:1125-1129.
- [53] GROMMINGER S, ERKAN S, SCHOCK U, et al. The influence of low molecular weight heparin medication on plasma DNA in pregnant women[J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35:1155-1157.
- [54] DABI Y, GUTERMAN S, JANI JC, et al. Autoimmune disorders but not heparin are associated with cell-free fetal DNA test failure[J]. *J Transl Med*,2018,16(1):335.
- [55] SHREE R, MACKINNON HJ, HANNAN J,et al. Anticoagulation use is associated with lower fetal fraction and more indeterminate results[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2023;S0002-9378(23)00453-2. ahead of print.
- [56] BECKING EC, LINTHORST J, PATTON S, et al. Variability in Fetal Fraction Estimation; Comparing Fetal Fractions Reported by Noninvasive Prenatal Testing Providers Globally[J]. *Clin Chem*,2023 ,69(2):160-167.
- [57] 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.
- [58] 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(6):698-704.
- [59] HANCOCK S, BEN-SHACHAR R, ADUSEI C, et al. Clinical experience across the fetal-fraction spectrum of a non-invasive prenatal screening approach with low test-failure rate [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*,2020,56(3):422-430.
- [60] MCKANNA T, RYAN A, KRINSHPUN S, et al. Fetal fraction-based risk algorithm for non-invasive prenatal testing: screening for trisomies 13 and 18 and triploidy in women with low cell-free fetal DNA[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019,53(1):73-79.
- [61] HUI L, ELLIS K, MAYEN D, et al. Position statement from the International Society for Prenatal Diagnosis on the use of non-invasive prenatal testing for the detection of fetal chromosomal conditions in singleton pregnancies[J]. *Prenat Diagn*, 2023 ,43(7):814-828.
- [62] SUZUMORI N, SEKIZAWA A, TAKEDA E,et al. Classification of factors involved in nonreportable results of noninvasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT[J]. *Prenat Diagn*,2019,39(2):100-106.
- [63] Committee on Genetics, and The Society for Maternal-Fetal Medicine. (2015). Committee Opinion No. 640: cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy[J]. *Obstet. Gynecol*, 126, e31-e37.
- [64] Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, Committee on Genetics, and The Society for Maternal-Fetal Medicine. (2016a). Practice Bulletin No. 162: prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders[J]. *Obstet Gynecol*, 127, e108-e122.
- [65] ABEL DE, ALAGH A. Benefits and limitations of noninvasive prenatal aneuploidy screening[J]. *JAAPA*,2020, 33(4): 49-53.
- [66] AKOLEKAR R, BETA J, PICCIARELLI G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling; a systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015,45(1):16-26.
- [67] MARTINEZ-PORTILLA RJ, PAUTA M, HAWKINS-VILLARREAL A, et al. Added value of chromosomal microarray analysis over conventional karyotyping in stillbirth work-up: systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019 ,53(5):590-597.
- [68] PAUTA M, GRANDE M, RODRIGUEZ-REVENGA L, et al. Added value of chromosomal microarray analysis over karyotyping in early pregnancy loss: systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018 , 51(4):453-462.
- [69] YUAN X, HAN X, JIA C, et al. Low Fetal Fraction of Cell Free DNA at Non-Invasive Prenatal Screening Increases the Subsequent Risk of Preterm Birth in Uncomplicated Singleton Pregnancy[J]. *Int J Womens Health*,2022,14:889-897.
- [70] BECKING EC, WIRJOSOEKARTO SAM, SCHEFFER PG, et al. Low fetal fraction in cell-free DNA testing is associated with adverse pregnancy outcome: Analysis of a subcohort of the TRIDENT-2 study [J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10): 1296-1304.

(收稿日期:2023-08-09)

编辑:刘邓浩