

胎儿游离 DNA 浓度的临床意义

邓泽桦^{2,1} 刘维强^{1*}

(1. 深圳市龙岗区妇幼保健院 汕头大学医学院龙岗妇幼临床学院, 广东 深圳, 518172;

2. 中山市人民医院, 广东 中山, 528400)



刘维强, 医学博士, 医学实验专业主任技师, 医学遗传学副研究员。美国哈佛医学院波士顿儿童医院 DNA 分子诊断实验室访问学者。汕头大学医学院与国内外大学联合培养博士生导师, 深圳大学医学部硕士生导师。

现任深圳市龙岗区妇幼保健院中心实验室主任, 汕头大学医学院龙岗妇幼临床学院医学检验教研室主任。广东省产前诊断技术专家委员会成员, 广东省卫生系列高级职称评审专家, 中国妇幼保健协会出生缺陷防治与分子遗传分会分会委员, 广东省预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会常委, 广东省精准医学应用学会遗传病分会副主任委员, 广州市医学会精准分子诊断学会副主任委员, 广东省泌尿生殖协会生殖健康医学分会副主任委员, 中华医学会杂志社中国临床案例成果数据库罕见病学组委员。

国卫办妇幼发[2016]45 号文对基于孕妇外周血胎儿游离 DNA 的无创产前筛查技术(non-invasive prenatal screening, NIPS)的质量控制指标有明确规定:21 三体综合征检出率不低于 95%, 18 三体综合征检出率不低于 85%, 13 三体综合征检出率不低于 70%, 复合阳性预测值不低于 50%, 由于凝血、溶血、DNA 质量控制不合格等标本原因造成的检测失败率不超过 5%^[1]。

NIPS 临床应用中不可避免地存在检测失败的现象。有研究表明, 不同的检测方法导致的 NIPS 失败率不一。国内外实验室普遍采用的大规模平行测序方法进行 NIPS 检测时约有 1% 到 3% 的孕妇会因各种因素无法获得筛查结果导致检测失败^[2-4], 其中胎儿游离 DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) 浓度过低是一个重要的原因^[5, 6]。因为 cffDNA 浓度过低而检测失败的孕妇, 她们的胎儿发生染色体非整倍体的概率要比普通孕妇人群显著升高(6.5%

对 0.2%), 同时, NIPS 检测失败的孕妇人群更易发生子痫前期(11% 对 1.5%) 和妊娠期糖尿病(23% 对 7.5%) 等妊娠期并发症^[7]。因此关注异常 cffDNA 浓度对 NIPS 的影响及其与妊娠期并发症的关系, 对于明确胎儿发生染色体非整倍体风险及预测孕妇本人的妊娠并发症风险有着重要的作用。

本期专刊我们邀请了国内多家开展了 NIPS 筛查的产前诊断中心就 cffDNA 的产生机制、计算方法、低浓度 cffDNA 对 NIPS 筛查结果的影响、NIPS 检测失败潜在的胎儿非整倍体风险以及与妊娠期并发症的关系等进行汇总综述和专题笔谈, 以期帮助从事 NIPS 筛查以及遗传咨询的临床医生、实验室人员更深入地了解 cffDNA 的临床意义。

1 cffDNA 浓度的临床检测限

cffDNA 浓度亦称为胎儿分数(Fetal fraction, FF), 是母体血浆中来自胎盘的 cffDNA 占总 cfDNA 的百分比。如果胎儿为非整倍体, 则来自胎儿的那条额外的染色体也释放 cffDNA 到母体血浆中, 导致该条染色体总 cffDNA 量相比正常胎儿要

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.03.001

基金项目: 深圳市龙岗区科技创新专项资金医疗卫生技术攻关项目(LGKCYLWS2022013)

* 通信作者: 刘维强, Email: liuwq06@126.com

高。通过测定血浆样本中足够浓度的 cfDNA,可以较准确的分析出胎儿是否存在非整倍体风险。

目前国内开展 NIPS 筛查有多种技术平台,为保证 NIPS 技术对目标染色体的检出效率,尽管技术方法、原理不相同,他们对 cfDNA 的最低浓度要求基本相同,以保障有足够的胎儿游离 DNA 片段可以用于分析,如纳米球测序平台要求 cfDNA 最低浓度 $\geq 3.5\%$ 、边合成边测序平台 $\geq 4.0\%$ 、半导体测序平台 $\geq 4.0\%$ ^[8]。FF 越大,区分整倍体和非整倍体妊娠的效能就越好。相反,如果 FF 过低,那么异常染色体所释放的 cfDNA 可能被绝大多数的整倍体母体的 cfDNA 所掩盖,从而导致检测失败甚至导致假阴性结果。

2 cfDNA 浓度联合 Z-score 值对阳性结果的遗传咨询

对目标染色体的 cfDNA 片段计数,将统计学上有显著差异的结果定义为高风险(通常定义为 Z-score ≥ 3)。在非整倍体妊娠中随着 FF 的增加,检测出的平均 Z-score 也随之增加。Z 值越高,理论上 NIPS 的阳性预测值(positive prediction value, PPV)也越高^[9-11]。研究表明 FF 与 Z 值有着较强的相关性^[12, 13]。国内尹爱华教授团队最新的研究发现 FF 与 NIPS 筛查的 PPV 也有着较高的关联性,特别是对 21 三体^[13]。华西二院的刘珊玲教授团队也证实 FF 与 21 三体和 18 三体的 Z 值正相关,但与 13 三体的 Z 值并没有相关性^[14]。联合 FF 和 Z 值分析对 NIPS 高风险结果遗传咨询时可以提供更精准的遗传咨询意见。例如当 FF 为 30%而 Z 值只有 4 点多,FF 与 Z 值出现明显的非线性关系时,此时存在胎盘嵌合的可能性较大,而胎儿也有较大的可能为正常二倍体^[15]。

3 低浓度 cfDNA 的意义

实验室为保证结果准确可信,对 FF 小于 4%或 3.5%(不同检测平台不同检测下限)时将报告检测失败。对第一次因 FF 低而无结果的孕妇大多会隔一段时间后重新抽血再次检测。虽然大约 50%到 60% NIPS 第一次检测失败的孕妇通过重抽血可以获得检测结果^[16],但总体上由于低 FF 导致的检测

失败的孕妇其胎儿发生非整倍性的风险比例要比正常对照群体明显升高 2.7%到 23.3%^[17, 18]。

最近通过对 27 项研究 243700 例单胎妊娠的数据荟萃分析表明,低 FF 与胎儿 13 三体、18 三体、X 单体和三倍体的风险增加有关,但与 21 三体无关^[19]。尽管如此,仍有不少研究人员在低 FF 的孕妇后续诊断中检出 21 三体^[20-22]。研究显示,低 FF 还与各种其他类型胎儿染色体畸变的高风险相关,低 FF 孕妇的胎儿染色体畸变的绝对发生率约 1%至 2%^[19]。因此,对低 FF 导致 NIPS 检测失败的孕妇最好建议进行产前诊断以排除胎儿非整倍体风险。

除了增加胎儿染色体异常的概率,近年来的研究表明低 FF 还可能与妊娠期并发症或不良妊娠结局相关^[22-24]。一些小规模的回顾性队列研究显示,低 FF 与胎盘相关的不良妊娠结局如妊高征(pregnancy-induced hypertension, PIH)、先兆子痫(pre-eclampsia, PE)、胎儿生长受限、早产和妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)之间存在关联^[25, 26]。Bekker 等人通过对文献的系统性综述,表明低 FF 与不良妊娠结局特别是妊娠相关的高血压疾病、早产和胎盘功能障碍相关的胎儿生长缺陷相关^[6]。在一项涉及 26226 名孕妇 NIPS 检测的研究里,295 名孕妇(1.12%)因 FF 低而初次检测失败。入组的 284 例初次检测失败孕妇,32.6%经重抽血后仍无法获得结果。与普通孕妇相比,因低 FF 而检测失败的孕妇群体发生 PIH、大于 34 周发生的 PE 和 GDM 的发生率分别为 11.2%对 5.3%、3.7%对 1.9%和 14.8%对 4.9%,差异均有统计学意义。胎儿染色体畸变和先天性结构异常的患病率分别为 1.4%和 4.1%,也比正常 FF 孕妇 0.4%和 1.7%的比例显著提高^[27]。

也有学者对低 FF 是否与胎儿非整倍体或妊娠并发症相关有不同的结论^[28, 29]。在对超过 20 万个样本的全基因组大规模平行测序的 NIPS 筛查研究中,超过 1100 名孕妇由于 FF 低而导致检测失败。重抽血检测后,84.2%获得了结果但并未观察到明显的胎儿非整倍体率升高^[28]。在低 FF 的孕妇中伴随更多的是孕妇体重增加和多胎妊娠率。在重抽血

后仍检测失败的低 FF 孕妇妊娠结局中也并未发现明显的胎儿异常情况。因此,作者认为低 FF 并不是胎儿非整倍体风险或不良妊娠结局的指标^[28]。

尽管低 FF 在与胎儿染色体异常及预测妊娠期并发症中的价值有待进一步通过大样本研究证实,但对于低 FF 特别是因此原因而导致 NIPS 检测失败的孕妇仍有必要加强妊娠期管理。除了要关注其胎儿是否存在染色体异常的风险外,建议孕妇本人重视并预防可能发生的妊娠期并发症。

4 高浓度 cffDNA 的意义

有研究将高于 95 百分位的 FF 定义为高 FF。有研究发现,与正常 FF 的孕妇(FF 浓度位于第 5 到第 95 百分位)比较,高 FF 的孕妇分娩小于 5 个百分位的小胎龄新生儿的几率更大,也可能与自发性早产风险增加有关^[29-31],但也有学者认为高 FF 与早产或妊娠高血压疾病之间没有显著关联^[32]。目前对高 FF 与妊娠并发症或不良妊娠结局的意义尚不清楚,有待进一步的研究阐明,但总体上要比低 FF 带给孕妇和胎儿的风险要更小^[29]。

随着 NIPS 及其拓展技术的广泛临床应用,该技术对预防 21 三体、18 三体等出生缺陷起到了非常重要的作用。为确保对目标染色体的有效检出率,FF 是一项关键的质控指标。尽管仍需更大样本量的研究证实,但低 FF 与胎儿染色体异常及孕妇本人的妊娠期并发症的风险是值得高度重视的。临床医生和实验室人员深入了解 FF 的临床意义,将对低 FF 可能对孕妇及胎儿产生的风险进行预判并加强妊娠期管理,从而更好地保障母婴健康。

参 考 文 献

[1] 国家卫生计生委办公厅关于规范有序开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作的通知[EB/OL]. (2016-11-09). <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=0e6fe5bacl664ebda8bc28ad0ed68389>.

[2] SHI Y, JIANG H, SHAO X. Exploration of factors for failure of non-invasive prenatal testing based on Logistic regression analysis[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2023, 40(5):519-526.

[3] KARLSSON F, AHOLA T, DAHLBERG J, et al. Evalua-

tion of repeat testing of a non-sequencing based NIPT test on a Finnish general-risk population[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2021, 100(8):1497-1500.

- [4] ZHANG B, ZHOU L, FENG C, et al. More attention should be paid to pregnant women who fail non-invasive prenatal screening[J]. *Clin Biochem*, 2021, 96:33-37.
- [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] SCHEFFER PG, WIRJOSOEKARTO SAM, BECKING EC, et al. Association between low fetal fraction in cell-free DNA testing and adverse pregnancy outcome: A systematic review [J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10):1287-1295.
- [7] ULDBJERG N. No-call non-invasive prenatal testing gives important information[J]. *BJOG*, 2018, 125(7):856.
- [8] LIU W, YANG J, ZHANG J, et al. Consensus on technological standards for non-invasive prenatal screening of pathogenic copy number variations by high-throughput sequencing of maternal plasma cell-free DNA[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2021, 38(7):613-619.
- [9] TIAN Y, ZHANG L, TIAN W, et al. Analysis of the accuracy of Z-scores of non-invasive prenatal testing for fetal Trisomies 13, 18, and 21 that employs the ion proton semiconductor sequencing platform[J]. *Mol Cytogenet*, 2018, 11: 49.
- [10] JUNHUI W, RU L, QIUXIA Y, et al. Evaluation of the Z-score accuracy of noninvasive prenatal testing for fetal trisomies 13, 18 and 21 at a single center[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(6):690-696.
- [11] MA L, LI Y, LI L, et al. A high Z-score might increase the positive predictive value of cell-free noninvasive prenatal testing for singleton-pregnant women[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2023, 36(2):2233662.
- [12] BALSLEV-HARDER M, RICHTER SR, KJAERGAARD S, et al. Correlation between Z score, fetal fraction, and sequencing reads in non-invasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(9):943-945.
- [13] YANG J, WU J, WANG D, et al. Combined fetal fraction to analyze the Z-score accuracy of noninvasive prenatal testing for fetal trisomies 13, 18, and 21[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2023, 40(4):803-810.
- [14] 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.

- [15] 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.
- [16] 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(8):816-822.
- [17] 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.
- [18] PERGAMENT E, CUCKLE H, ZIMMERMANN B, et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort[J]. *Obstet Gynecol*, 2014, 124(2 Pt 1):210-218.
- [19] BECKING EC, SCHUIT E, van Baar de Knegt SME, et al. Association between low fetal fraction in cell-free DNA screening and fetal chromosomal aberrations: A systematic review and meta-analysis[J]. *Prenat Diagn*, 2023, 43(7):838-853.
- [20] FIORENTINO F, BONO S, PIZZUTI F, et al. The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(4):304-311.
- [21] 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.
- [22] ROUSSEAU F, LANGLOIS S, JOHNSON JA, et al. Prospective head-to-head comparison of accuracy of two sequencing platforms for screening for fetal aneuploidy by cell-free DNA: the PEGASUS study[J]. *Eur J Hum Genet*, 2019, 27(11):1701-1715.
- [23] SHREE R, KOLAROVA TR, MACKINNON HJ, et al. Association of fetal fraction with hypertensive disorders of pregnancy incidence and disease severity[J]. *Am J Obstet Gynecol MFM*, 2022, 4(5):100671.
- [24] ROLNIK DL, DA SILVA COSTA F, LEE TJ, et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 52(6):722-727.
- [25] GERSON KD, TRUONG S, HAVILAND MJ, et al. Low fetal fraction of cell-free DNA predicts placental dysfunction and hypertensive disease in pregnancy[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2019, 16:148-153.
- [26] CLAPP MA, BERRY M, SHOOK LL, et al. Low Fetal Fraction and Birth Weight in Women with Negative First-Trimester Cell-Free DNA Screening[J]. *Am J Perinatol*, 2020, 37(1):86-91.
- [27] 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.
- [28] CALDWELL S, ALMASRI E, SCHMIDT L, et al. Not all low fetal fraction cell-free DNA screening failures are at increased risk for aneuploidy[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(11):1372-1379.
- [29] REZAIIE KEIKHAIE K, MOSHFEGHI M, REZAIIE KAH-KHAIE L, et al. Evaluation of The Relationship between Cell-Free DNA Fetal Fraction of The Circulatory System and Fetal and Maternal Pregnancy Prognosis: A Prospective Study[J]. *Int J Fertil Steril*, 2023, 17(2):115-119.
- [30] FARINA A, LESHANE ES, ROMERO R, et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(2):421-425.
- [31] JAKOBSEN TR, CLAUSEN FB, RODE L, et al. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(9):840-845.
- [32] SHOOK LL, CLAPP MA, ROBERTS PS, et al. High Fetal Fraction on First Trimester Cell-Free DNA Aneuploidy Screening and Adverse Pregnancy Outcomes[J]. *Am J Perinatol*, 2020, 37(1):8-13.

(收稿日期:2023-08-15)

编辑:刘邓浩