

孕妇外周血中低胎儿游离 DNA 浓度及处理方案

赵千业 孔祥东*

(郑州大学第一附属医院 遗传与产前诊断中心,河南 郑州 450000)

【摘要】 无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)技术因其高灵敏度和特异度的特点已广泛应用于胎儿染色体异常的产前筛查之中。胎儿游离 DNA 浓度(fetal fraction, FF)是影响 NIPT 结果准确性的关键因素之一。不同检测平台对 FF 的最低阈值设定不同,FF 达不到检测最低阈值是导致 NIPT 检测失败的重要原因之一。影响 FF 的因素众多,主要可分为生物学因素和实验相关因素。低 FF 也与妊娠期并发症或异常妊娠有一定相关性,其后续处理需引起重视。本文将从可能引起 FF 降低的因素及后续如何进行妊娠期管理等方面进行综述。

【关键词】 无创产前检测;胎儿游离 DNA 浓度;检测失败;异常妊娠

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

基于孕妇外周血中游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 的无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)技术在筛查胎儿染色体非整倍体及染色体微缺失微重复等疾病中发挥了重要作用。cfDNA 中胎儿游离 DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) 所占的比例,即 cffDNA 浓度 (fetal fraction, FF) 是保证 NIPT 检测准确性的重要指标,较低的 FF 会影响 NIPT 对胎儿染色体异常的检出,使假阴性的风险升高,故在 NIPT 检测过程中对 FF 设有最低的检测阈值,若不达标即判定为检测失败。FF 不足已成为导致 NIPT 检测失败的重要因素之一。现有研究表明可能影响 FF 的因素众多^[1],对此的深入认识有利于对此类人群进行更合理的遗传咨询和妊娠期管理。现就相关因素及后续如何处理进行综述。

1 孕妇外周血中的游离 DNA

孕妇外周血中的 cfDNA,由占据大部分的孕妇自身 cfDNA 和占据小部分的 cffDNA 共同组成,其中孕妇自身的 cfDNA 主要来源于造血系统,同时其

他的母体器官包括肿瘤也会向母体血浆中释放 cfDNA^[2-4];cffDNA 则主要由胎盘滋养层细胞的凋亡和坏死形成^[5,6],这也是 cffDNA 的主要特点之一。此外,cffDNA 含量随孕周增大,呈上升趋势^[7];胎儿分娩后 cffDNA 会被快速清除^[8];母源 cfDNA 片段长度比 cffDNA 要长;cffDNA 虽为短片段,但其可拼凑出完整的胎儿基因组信息^[9]。

2 胎儿游离 DNA 与 NIPT

当胎儿出现染色体异常时,其释放入孕妇外周血中的 cffDNA 会使相关染色体的比例发生变化,通过高通量测序的方法对这种变化进行检测即可对胎儿的染色体异常情况进行评估,这也即是 NIPT 的基本原理^[10]。为确保对胎儿染色体异常评估的准确性,充足的 cffDNA 是必要条件^[11,12]。不同检测平台对 FF 最小阈值的设定略有差异,一般介于 2%~4% 之间,低于设定阈值,则判定为检测失败^[13]。

3 胎儿游离 DNA 浓度低相关的因素

任何可能影响母体或胎盘 cfDNA 释放的因素均可能影响 FF,而通过促进母体 cfDNA 的升高和/

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.03.002

基金项目:郑州市科技惠民计划(2021KJHM0003)

*通信作者:孔祥东,Email:kongxd@263.net

或促进胎盘 cfDNA 的降低即可导致 FF 降低。与之相关的因素主要有生物因素和实验因素等。

3.1 生物因素 生物因素又分母体因素和胎儿因素。

3.1.1 母体因素 BMI: 诸多研究表明 FF 与孕妇 BMI 呈负相关, 过度肥胖的孕妇其自身因炎症和坏死的脂肪细胞更多, 使得母体来源的 cfDNA 增多, 而胎盘来源的 cfDNA 不变或者可能降低, 进而使得 cfDNA 的浓度降低^[14]。

年龄: 有的研究认为孕妇年龄与 FF 呈负相关^[15], 而有的研究则认为无影响^[16]。

人种: 来自美国的一项研究显示, 在低 FF 人群中, 非裔美国人明显占比更高^[17], 而澳大利亚的一项研究则显示南亚人群中更容易出现低 FF^[18]。但同时也有研究显示低 FF 与人种相关性不大^[19]。

辅助生殖: 有研究显示, 辅助生殖(in-vitro fertilization, IVF) 样本的 FF 要低于自然妊娠^[20], 这一方面可能与激素治疗或者胎盘功能损伤进而影响 cfDNA 的释放有关, 另一方面则可能与 IVF 导致孕妇自身 cfDNA 升高也有关^[21]; 丹麦的一项研究显示辅助生殖不仅可使 FF 降低, 且移植新鲜胚胎比冷冻胚胎的 FF 要低^[22]。但也有研究显示 IVF 对 FF 并无影响^[23, 24]。

血清学指标: PAPP-A 和 free β -hCG 水平和 FF 正相关, 检测失败人群中二者水平一般较低^[25], 这两者来源于胎盘的蛋白, 其水平反映了胎盘功能和胎盘体积以及胎盘与母体接触面积等情况^[26, 27]。

母体疾病: 系统性红斑狼疮^[28]、B12 缺乏^[29]等与 FF 低而反复检测失败有关, 而 FF 在治疗或抑制疾病后得到改善。

药物: 为了治疗母体某些疾病而使用的相关药物与低 FF 也被证明有一定的相关性, 如有研究报告抗凝剂如低分子肝素等的使用和低 FF 导致的检测失败率升高有关^[30, 31], 但也有研究表明导致 FF 降低的原因是低分子肝素所治疗的疾病本身, 而非低分子肝素的使用^[32]。

运动: 丹麦的一项研究显示, 在运动后和运动前相比, FF 降低了 1%~17%, 但 30 分钟后, 该影响即消失, 可能原因是运动提高了孕妇自身 cfDNA 的含量, 而 cfDNA 的量则未变^[33]。

妊娠期并发症: 低 FF 被发现与妊娠期并发症的风险增加有关, 荷兰一项研究显示低 FF 孕妇发生妊娠期高血压、晚发型先兆子痫和妊娠期糖尿病的概率升高, 而这些异常很可能与孕早期胎盘出现异常有关, 值得注意的是该研究显示低 FF 与早发型子痫前期无相关性, 但不能排除样本量对此结论的影响^[34]。美国的一项研究同样显示妊娠期高血压疾病和子痫前期风险增加的孕妇在妊娠早期 FF 较低^[35]。此外, 对于妊娠期糖尿病, 因 BMI 和低 FF 及妊娠期糖尿病都有关, 有研究显示在排除了 BMI 的影响后, 并未发现低 FF 和妊娠期糖尿病之间有关联^[36]。

3.1.2 胎儿因素 孕周: 孕周与 FF 呈正相关^[7]。

胎儿性别: 有研究显示女胎 FF 比男胎的高^[37]。

胎儿异常情况: 出生体重较低的胎儿其 FF 一般较普通胎儿的要低^[38], 也有研究显示宫内生长受限的胎儿其 FF 也较低^[39]。多项研究报告低 FF 的胎儿 13 三体、18 三体、45, X 以及三倍体的风险增高^[40, 41], 但与 21 三体风险不相关。这与胎盘大小可能有关, 有报道显示 13 三体、18 三体、45, X 和三倍体胎儿的胎盘一般较小, 其释放的 cfDNA 也就较少。而对于 21 三体胎儿, 有研究报告其胎盘质量则相对较大。当然, 这样的结论可能受到不同人群产诊率不同、不同平台不同定量方法等所影响^[41]。而也有研究得出不同的结论, 即低 FF 样本中最终发生染色体异常的风险并无增高^[42, 43]。

3.2 实验因素

3.2.1 采血管 用普通的 K3 EDTA 抗凝管采血, 其 FF 在第二天时降低 48.5%, 而在第 4 天时即可降低 80%^[44], 故样本若不能立即处理, 一般选用 cfDNA 专用保存管进行血液采集。

3.2.2 运输温度 一项研究显示当运输温度维持在 4℃ 左右, 母源 cfDNA 就会变多, 进而使总的 cfDNA 增多, 而 cfDNA 不变, 最终使 FF 降低^[45], 而运输温度过高也会影响 cfDNA 的组成^[46], 因此一般选用常温进行运输。

3.2.3 样本的保存方式 有研究显示冻融后的血浆, 其 FF 会降低^[47]。一项研究显示血浆中 FF 在 -25℃ 条件下保存 2 年后即会出现下降趋势。然

而,提取后的 cfDNA,在-25℃保存 18 个月后 FF 依然没有变化,但保存 3 年后,和立即检测相比,FF 增加了 27%^[48]。

3.2.4 FF 的计算方法^[49] FF 的计算一般皆基于母源 cfDNA 和 cffDNA 之间的不同之处,而用于 FF 的计算方法有很多种,主要有①基于 Y 染色体估算法:因孕妇血浆中的 Y 染色体序列只可能来自于胎儿,故基于此对男性胎儿的游离 DNA 进行准确计算,但其无法应用于女胎样本。②基于 SNP 的方法:选取父亲和母亲皆为纯合但基因型不同的位点,运用胎儿特异性的位点进行胎儿游离 DNA 浓度的计算,所得浓度准确,但需要获得父亲基因型。升级版的方法如 FetalQuant 和 FetalQuant^{SD},不需要父亲基因型,但需要提高测序深度或者构建适用于不同群体和平台的参数模型。③seqFF:基于胎儿游离 DNA 和母源游离 DNA 测序时所得数据的不同特点来进行,可直接利用 NIPT 测序过程中所产生的数据,但当 cffDNA 浓度低于 5%时准确性差。④基于甲基化的方法:基于胎儿游离 DNA 和母源游离 DNA 甲基化不同,但甲基化测序成本较高。⑤基于 cfDNA 长度差异:根据胎儿 cfDNA 片段较母体 cfDNA 片段短的特点来进行检测,但准确性一般。⑥基于核小体的方法:由于核小体的影响,母源游离 DNA 和胎儿游离 DNA 的测序序列各有自己的一些特点,基于此可进行游离 DNA 浓度检测,但其测定的准确性差,需进一步优化。

FF 计算方法多样,各有优缺点及适用场景,但不同方法之间计算有差异,同样的样品运用不同的方法所得到的浓度有不同,有研究显示运用基于 SNP 的方法计算浓度和基于 Y 染色体的方法相比,其浓度会降低 7%^[50],因此有研究建议可联合使用多种方法进行 FF 的计算,特别是对于 FF 低的样本,以避免由于计算方法误差导致的假性 FF 降低^[51]。

4 胎儿游离 DNA 浓度低后续处理

4.1 重采血 FF 随孕周升高而升高,因此在较大孕周再次采血可提高检测成功率,但重采血的成功率不同研究报道有差异,50%~94.12%不等^[13, 43]。

4.2 通过实验方法提高 cffDNA 浓度 通过在实验流程中对相关步骤进行优化,可在一定程度上提高 FF,如 cfDNA 的富集、测序条件的优化、生物信息学算法的改进等^[52, 53]。有研究从总 cfDNA 中筛选较短的 cfDNA 片段,使 FF 增加了 99%~359%^[53],但缺点是增加了检测成本。

4.3 侵入性产前诊断 因有研究表明 FF 低胎儿异常妊娠率会增高,故有些专家建议直接进行侵入性产前诊断^[54]。

4.4 选择其他联合筛查方式 若通过重采血等方式依然无法解决 NIPT 检测失败的问题,同时孕妇又拒绝侵入性产前诊断的方式,则只能选择目前已有的其他常用的筛查方式,如结合血清学筛查和超声等方式对胎儿的情况进行综合评估^[55],但若筛查结果伴随严重的结构异常等,仍需要进一步建议其进行侵入性产前诊断。

4.5 各个指南中的建议 目前国际上各个相关协会和组织针对 FF 低问题,也有相应的建议和指导。

国际产前诊断协会(International Society for Prenatal Diagnosis, ISPD)在 2015 年的声明中表示 FF 降低的意义仍在研究中,是否与染色体异常有关尚无明确结论,而选择重采血有 1/3 的失败率,故建议需结合孕周、超声结果以及孕妇个人意愿等重新评估选择是否重采血^[56]。2020 年发布的关于双胎 NIPT 检测的声明显示 FF 低选择重采血的成功率为 53%~83%,对 FF 低的建议是进行超声检测或者产前诊断,只有在时间允许情况下可考虑重采血^[57]。2023 年发布的最新声明显示,针对 FF 低样本可选择进一步详细的超声检查、重采血进行 NIPT 二次检测、其他的筛查方法或者产前诊断等方式^[58]。

美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)2016 年发布的指南建议 FF 低孕妇行产前诊断,而非重采血^[54],但其于 2023 年发布的最新指南则去掉了这一条,并未给出明确建议^[59]。

美国妇产科医师学会(American college of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)和母胎医学会(Society for Maternal-Fetal Medicine, SMFM)

于2015年和2020年发布的指南皆显示需告知NIPT检测失败孕妇胎儿染色体异常风险升高,需进一步接受综合的遗传咨询,并接受进一步的超声检测和诊断。是否选择重采血则需要结合胎儿的孕周以及其他的检测结果综合判定,若胎儿孕周较大可能影响后续的产诊或者超声已有提示较严重的异常,则不建议重采血^[60, 61]。

5 小结

随着相关研究的不断增多,和FF低相关的因素越来越多的被报道,其中和母体相关的因素有BMI、年龄、人种、辅助生殖、母体自身疾病、药物的使用以及血清学标志物如PAPP-A和free β -hCG水平等,和胎儿自身相关的因素则有孕周、胎儿性别以及胎儿的异常情况如18三体、13三体及宫内生长受限等,和NIPT检测过程中相关的因素有样本采集、运输、保存及FF的计算方法等。但其中也有诸多因素在不同的研究中有不一致的结论,如孕妇年龄、辅助生殖、人种及胎儿染色体异常情况等,因此未来需要更深入的研究来进一步探讨这些影响因素。而对于FF低的后续处理,一方面,实验室人员可通过优化实验流程如通过富集cffDNA提高FF、优化相关算法等方式降低因FF低而导致的失败率,另一方面,遗传咨询医生则需结合孕妇的孕周、超声等其他检测结果及其个人意愿进行咨询。在无严重超声异常及孕周适中的情况下,可选择重采血进行二次检测,反之,则建议进行侵入性产前诊断,当拒绝重采血和侵入性产前诊断时,则可通过联合其他如超声和血清学筛查的方式对胎儿的异常情况进行综合评估。

参考文献

[1] DENG C and LIU S. Factors Affecting the Fetal Fraction in Noninvasive Prenatal Screening: A Review[J]. Front Pediatr, 2022, 10: 812781.

[2] LUI YY, CHIK KW, CHIU RW, et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation [J]. Clin Chem, 2002, 48(3): 421-427.

[3] DIAZ LA, JR. AND BARDELLI A. Liquid biopsies: geno-

typing circulating tumor DNA[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(6): 579-586.

[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] FLORI E, DORAY B, GAUTIER E, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report[J]. Hum Reprod, 2004, 19(3): 723-724.

[6] ALBERRY M, MADDOCKS D, JONES M, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(5): 415-418.

[7] LO YM, TEIN MS, LAU TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum; implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775.

[8] YU SC, LEE SW, JIANG P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing[J]. Clin Chem, 2013, 59(8): 1228-1237.

[9] 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.

[10] CHIU RWK, CHAN KCA, GAO Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(51): 20458-20463.

[11] 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.

[12] TAKOUDES T and HAMAR B. Performance of non-invasive prenatal testing when fetal cell-free DNA is absent[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(1): 112.

[13] HUI L and BIANCHI DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing; What clinicians need to know[J]. Prenat Diagn, 2020, 40(2): 155-163.

[14] 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.

[15] 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.
- [16] HESTAND MS, BESSEM M, VAN RIJN P, et al. Fetal fraction evaluation in non-invasive prenatal screening (NIPS)[J]. *Eur J Hum Genet*, 2019, 27(2): 198-202.
- [17] KRISHNA I, BADELL M, LOUCKS TL, et al. Adverse perinatal outcomes are more frequent in pregnancies with a low fetal fraction result on noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(3): 210-215.
- [18] 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.
- [19] ASHOOR G, POON L, SYNGELAKI A, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation; effect of maternal and fetal factors[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31(4): 237-243.
- [20] KIMELMAN D AND PAVONE ME. Non-invasive prenatal testing in the context of IVF and PGT-A[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2021, 70: 51-62.
- [21] LEE TJ, ROLNIK DL, MENEZES MA, et al. Cell-free fetal DNA testing in singleton IVF conceptions[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(4): 572-578.
- [22] TALBOT AL, AMBYE L, HARTWIG TS, et al. Fetal fraction of cell-free DNA in pregnancies after fresh or frozen embryo transfer following assisted reproductive technologies[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(6): 1267-1275.
- [23] KALLIANIDIS K, DIMITROULIA E, MAVROGIANNI D, et al. Comparison of the Fetal Fraction of Cell-Free DNA in In-Vitro Fertilization (IVF) Versus Natural Conception Evaluation of the Fetal Fraction With IVF Parameters[J]. *Cureus*, 2022, 14(4): e24516.
- [24] LAMBERT-MESSERLIAN G, KLOZA EM, WILLIAMS J, 3rd, et al. Maternal plasma DNA testing for aneuploidy in pregnancies achieved by assisted reproductive technologies[J]. *Genet Med*, 2014, 16(5): 419-422.
- [25] CHAN N, SMET ME, SANDOW R, et al. Implications of failure to achieve a result from prenatal maternal serum cell-free DNA testing: a historical cohort study[J]. *BJOG*, 2018, 125(7): 848-855.
- [26] MANOKHINA I, SINGH TK, and ROBINSON WP. Cell-Free Placental DNA in Maternal Plasma in Relation to Placental Health and Function[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2017, 41(4): 258-264.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] SCHURING-BLOM H, LICHTENBELT K, VAN GALEN K, et al. Maternal vitamin B12 deficiency and abnormal cell-free DNA results in pregnancy[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(8): 790-793.
- [30] BURNS W, KOELPER N, BARBERIO A, et al. The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(11): 1125-1129.
- [31] 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. ahead of print.
- [32] 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.
- [33] SCHLUTTER JM, HATT L, BACH C, et al. The cell-free fetal DNA fraction in maternal blood decreases after physical activity[J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(4): 341-344.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] YUAN X, ZHOU L, ZHANG B, et al. Association between low fetal fraction of cell free DNA at the early second-trimester and adverse pregnancy outcomes[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2020, 22: 101-108.
- [37] MILTOFT CB, RODE L, EKELUND CK, et al. Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 51(4): 470-479.
- [38] 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.
- [39] CARRARA J, VIVANTI A, JANI JC, et al. Usefulness and reliability of cell free fetal DNA screening for main trisomies in case of atypical profile on first trimester maternal serum screening[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 398.
- [40] RAVA RP, SRINIVASAN A, SEHNERT AJ, et al. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X[J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1): 243-250.
- [41] 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.
- [42] LOPES JL, LOPES GS, ENNINGA EAL, et al. Most non-invasive prenatal screens failing due to inadequate fetal cell free DNA are negative for trisomy when repeated[J]. *Prenat Diagn*, 2022, 40(7): 831-837.
- [43] ZHAO G, DAI P, GAO S, et al. [The value of re-sampling for patients who had failed non-invasive prenatal testing due to low cell-free fetal DNA fraction][J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2022, 39(2): 135-138.
- [44] FERNANDO MR, JIANG C, KRZYZANOWSKI GD, et al. A novel approach to stabilize fetal cell-free DNA fraction in maternal blood samples for extended period of time[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208508.
- [45] HIDESTRAND M, STOKOWSKI R, SONG K, et al. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31(2): 122-128.
- [46] MEDINA DIAZ I, NOCON A, MEHNERT DH, et al. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166354.
- [47] XIE X, LI F, TAN W, et al. The Effect of Freezing on Non-invasive Prenatal Testing[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6962.
- [48] CLAUSEN FB, BARRETT AN, ADVANI HV, et al. Impact of long-term storage of plasma and cell-free DNA on measured DNA quantity and fetal fraction[J]. *Vox Sang*, 2020, 115(7): 586-594.
- [49] PENG XL and JIANG P. Bioinformatics Approaches for Fetal DNA Fraction Estimation in Noninvasive Prenatal Testing [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 453.
- [50] GRENDAR M, LODERER D, LAUCEKOVA Z, et al. Uncertainty of fetal fraction determination in Non-Invasive Prenatal Screening by highly polymorphic SNPs[J]. *J Biotechnol*, 2019, 299: 32-36.
- [51] VAN BEEK DM, STRAVER R, WEISS MM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(8): 769-773.
- [52] GENOVESE G, MELLO CJ, LOH PR, et al. Chromosomal phase improves aneuploidy detection in non-invasive prenatal testing at low fetal DNA fractions[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12025.
- [53] XUE Y, ZHAO G, QIAO L, et al. Sequencing Shorter cfDNA Fragments Decreases the False Negative Rate of Non-invasive Prenatal Testing[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 280.
- [54] GREGG AR, SKOTKO BG, BENKENDORF JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics[J]. *Genet Med*, 2016, 18(10): 1056-1065.
- [55] BARDI F, BET BB, PAJKRT E, et al. Additional value of advanced ultrasonography in pregnancies with two inconclusive cell-free DNA draws[J]. *Prenat Diagn*, 2022, 42(11): 1358-1367.
- [56] 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): 725-734.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] DUNGAN JS, KLUGMAN S, DARILEK S, et al. Noninvasive prenatal screening (NIPS) for fetal chromosome abnormalities in a general-risk population: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)[J]. *Genet Med*, 2023, 25(2): 100336.
- [60] American College of O, Gynecologists' Committee on Practice B-O, Committee on G, et al. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226[J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 136(4): e48-e69.
- [61] Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(3): e31-e37.

(收稿日期:2023-08-09)

编辑:刘邓浩