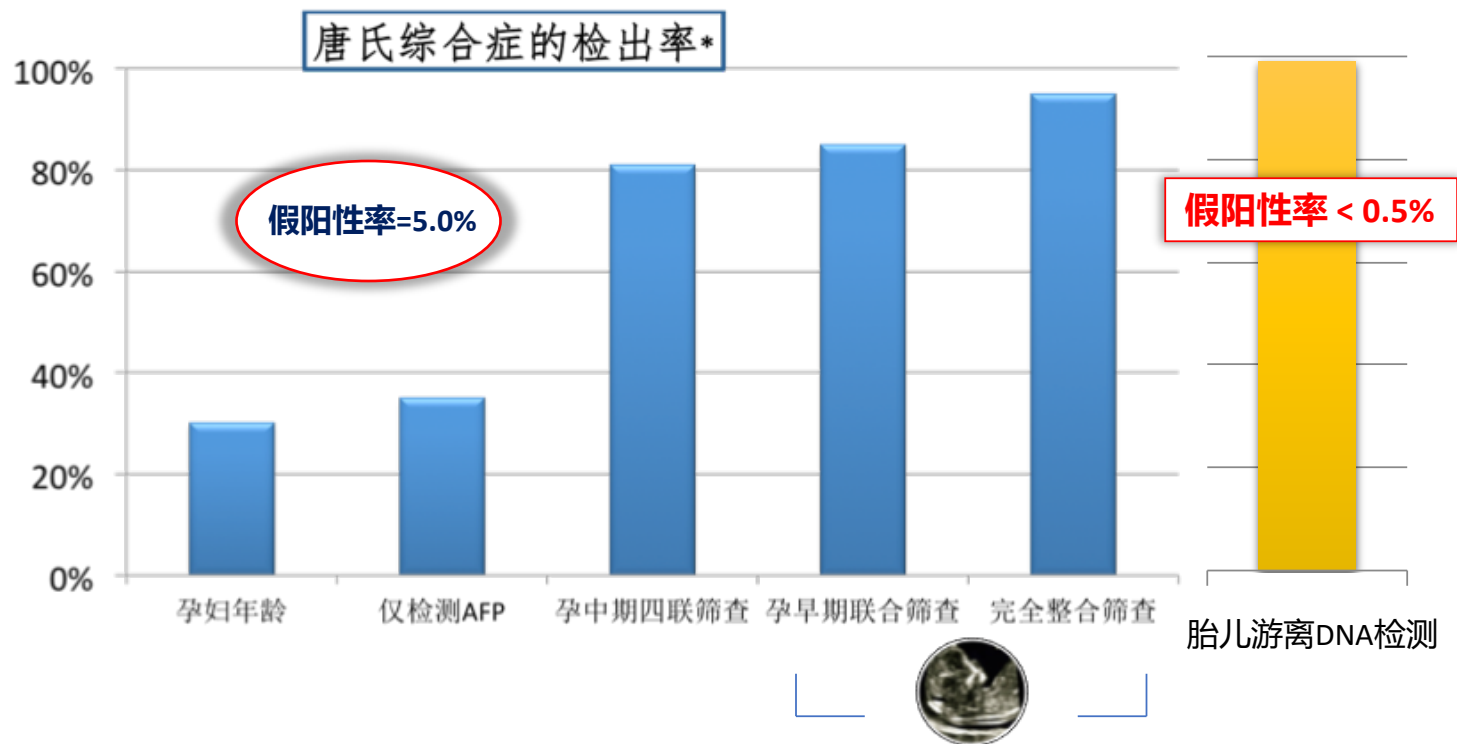


中国大陆辅助生殖技术成果应用三十周年学术研讨会

NIPT的实践，问题和思考

北京协和医院妇产科 蒋宇林

NIPT带来胎儿非整倍体产前筛查的整体进步



*ACOG practice bulletin no. 77, Obstet Gynecol 2007;109:217-27.

近期收集的几例NIPT假阴性病例

孕妇	年龄	血清学筛查	孕期超声	新生儿诊断
张XX	37	未做	NT4.2	21三体，房间隔缺损，动脉导管未闭
蒋X	24	临界风险	NT3.0 先天性心脏病	21三体，复杂性先心病，右耳失聪
方XX	40	低风险	羊水多，四肢短小	21三体，卵圆孔未闭，房缺
李X	34	高风险	胎儿发育迟缓	18号长臂部分缺失，先天性心脏病，耳聋
陈XX	35	高风险	四肢短小，心脏强回声	21三体，先天性心脏病，甲低
王XX	33	早期高风险，中期临界风险	曾有多项软指标异常	21三体，复杂先心病，发育迟缓，右耳失聪

这样的假阴性病例其实都是可以避免的

国家卫生和计划生育委员会办公厅文件

国卫办妇幼发〔2016〕45号

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

各省、自治区、直辖市卫生计生委，新疆生产建设兵团卫生局：

为推动落实全面两孩政策，满足广大孕妇对产前筛查与诊断分子遗传新技术服务的需求，规范有序开展以胎儿21三体综合征、18三体综合征和13三体综合征为目标疾病的孕妇外周血胎

不适用人群

有下列情形的孕妇，可能严重影响结果准确性。包括：

- (一) 孕周<12⁺0周
- (二) 有染色体异常胎儿分娩史或夫妇一方有明确染色体异常
- (三) 1年内接受过异体输血、移植手术或免疫治疗等
- (四) 胎儿超声检查提示有结构异常，需进行产前诊断
- (五) 各种基因遗传病高风险
- (六) 孕期合并恶性肿瘤
- (七) 医生认为有明显影响结果准确性的其他情形

除外上述不适用情形的，孕妇在充分知情同意情况下，可选择孕妇外周血胎儿游离DNA产前检测

检测前后咨询的不足 — 关于NIPT的常见错误观念

- NIPT和羊水穿刺一样准确
- NIPT可以查胎儿各种各样的染色体异常
- NIPT检测结果如果不正常，胎儿基本上就“判死刑”了

NIPT是羊穿的另一种选择，结果是一样的？

结果是这样吗—2016年多个研究的荟萃分析

	T21		T18		T13	
	低危	高危	低危	高危	低危	高危
检出率	95.9%	97%	86.5%	93%	77.5%	95%
假阳性率	0.1%	0.3%	0.2%	0.3%	0.1%	0.1%
阳性预测值	82%	91%	37%	84%	49%	87%
阴性漏检率	1:5570	1:1054	1:7194	1:930	1:8506	1:4265

Taylor-Phillips S, et al. BMJ Open 2016;6:e010002. doi:10.1136/bmjopen-2015-010002

北京协和医院2017年NIPT数据分析

	总数	阳性	Chr13	Chr18	Chr21	性染色体
高危例数	6505	80	4	12	27	37
高危病例 诊断结果			2例假阳性 1例拒绝诊断 1例确诊阳性	10例T18高风险 4例真阳性 3例母体微重复 1例拒绝诊断 1例CPM 1例假阳性	25例真阳性 1例假阳性 1例母体微重复	13例真阳性 18例假阳性 3例母体因素 3例拒绝诊断
				2例18-高风险 1例假阳性 1例引产拒绝诊断 (结肠肿瘤)		
NIPT阳性率		1.23%	0.06%	0.18%	0.42%	0.57%
阳性预测值			25%	40%	92.60%	35.13%
除去拒绝诊断 /待诊断后的 阳性预测值			33.3%	44.40%	92.60%	38.23%

什么是NIPT的假阳性和假阴性？

- 假阳性：结果提示异常高风险。但胎儿是正常的（误判为高风险）
 - NIPT的结果提示非整倍体高风险，但胎儿是正常的（二倍体）或其他异常核型结果
- 假阴性：结果提示是低风险的，但胎儿存在染色体异常的问题（误判为低风险）
 - NIPT的结果提示是非整倍体低风险，但胎儿核型是非整倍体异常或其他异常结果，与之不相符合

NIPT有不准确的吗？我院的一例假阴性病例

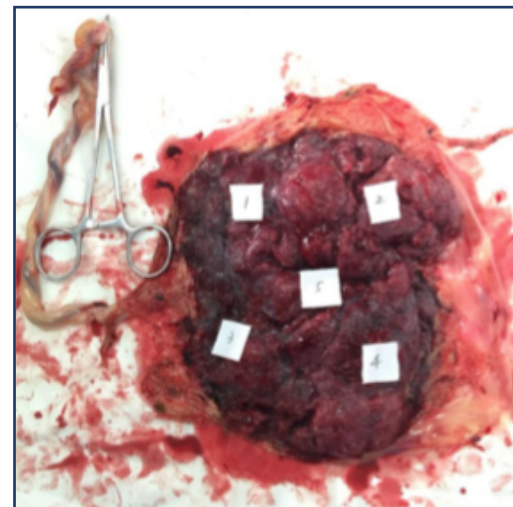
- 薛某，33岁。宫内孕27周
- 我院早孕期NT测定1.2mm，中孕期唐氏筛查T21/T8均低风险（ $<1/1000$ ）
- 中孕期超声提示双侧脉络膜囊肿，双手握拳姿势可疑
- 自行外送两家较大检测机构检测NIPT Z值为 - 1.4及3.3
- 25周我院行脐穿胎儿为47，XN，+ 18
- 引产后胎儿外观略符合18三体外观，病理解剖提示存在主动脉瓣口的增厚和狭窄
- 多点留取胎盘 / 脐带进行病理及遗传检测



胎儿典型的握拳姿势



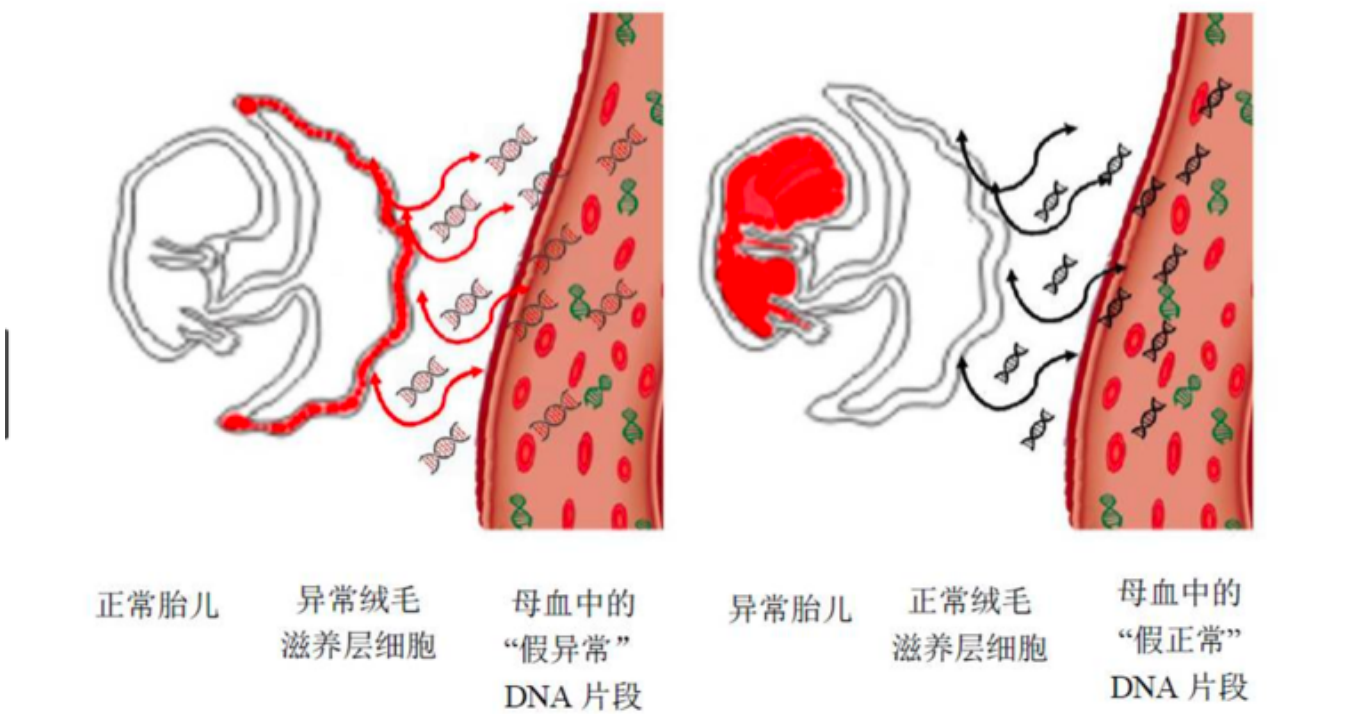
胎儿典型的握拳姿势



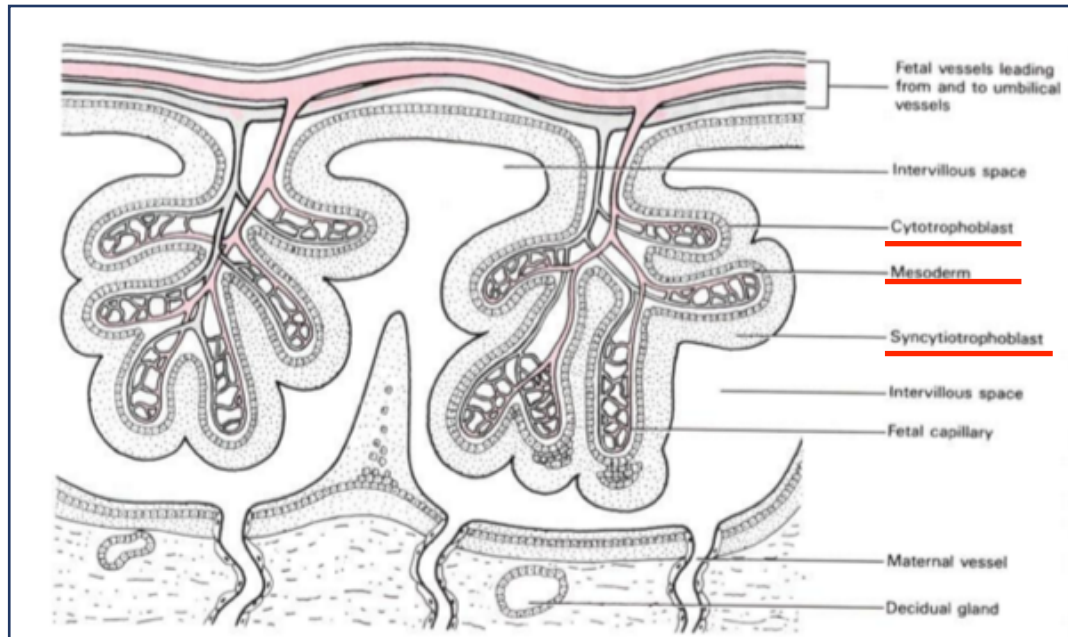
胎盘多点活检进行遗传学诊断

- 脐带多点活检均为18三体
- 胎盘胎儿面及母体面均为正常二倍体

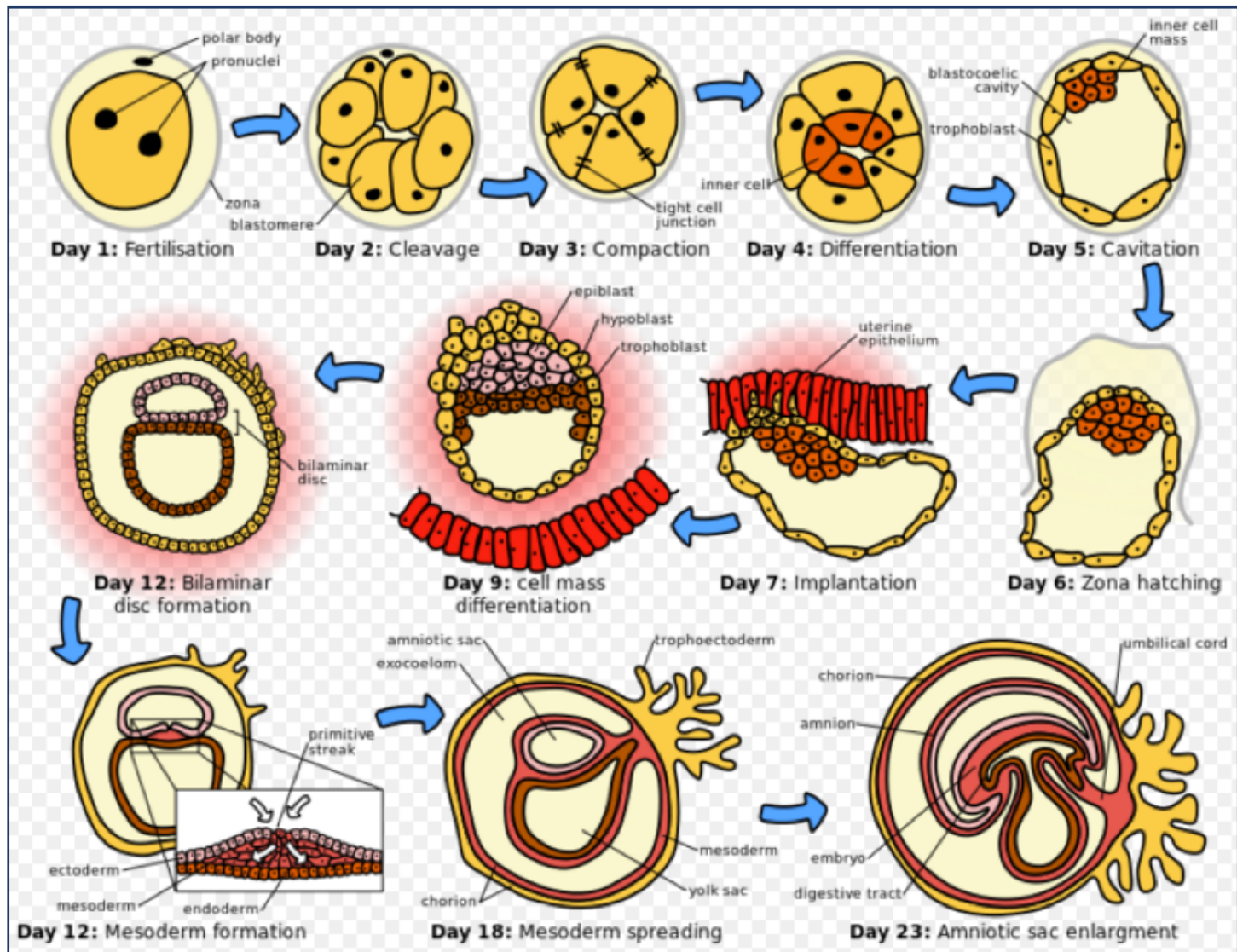
所谓的胎儿游离DNA其实绝大多数来源于胎盘绒毛外层细胞



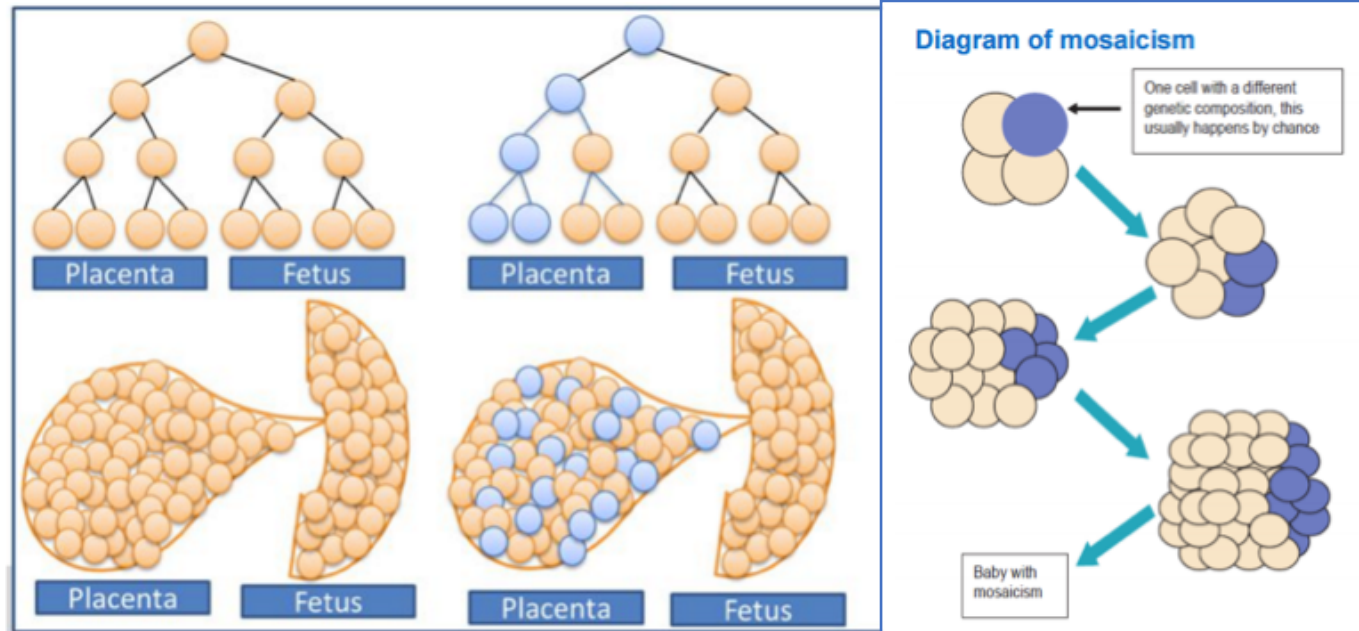
NIPT检测的胎儿细胞来源—绒毛外层滋养细胞



胎盘绒毛结构



原因之一：胎儿／胎盘染色体不一致（CPM）



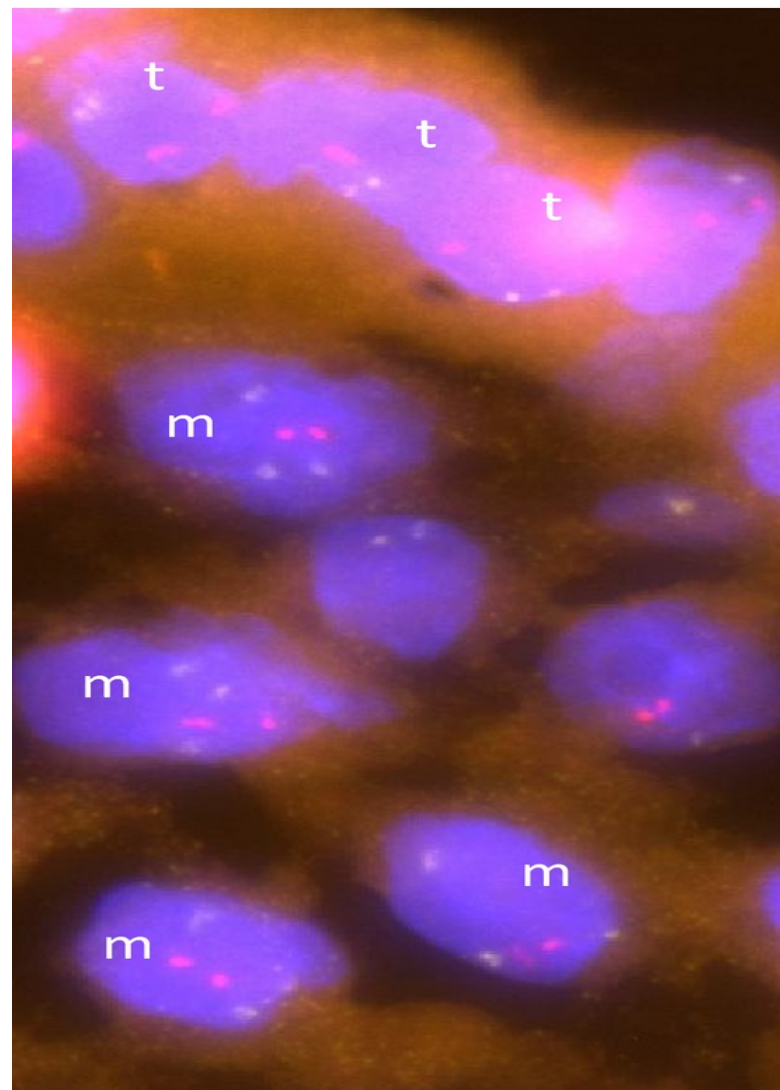
胎盘局限性嵌合

胎儿真性嵌合

假阴性病例二

绒毛细胞的嵌合导致假阴性的确切证据

- 30岁孕妇，G1P0
- 孕13周, NT测定4.8毫米伴有脐疝突出
- 绒毛膜取样和细胞培养：47,XY，+18
FISH检测，结果一致
- 孕16周，B超发现胎儿严重的发育迟缓、脐疝、心脏畸形等
- 外周血NIPT：chr18的Z值为2.42，chrY的Z值为35.6
- 孕17周，孕妇行终止妊娠术，术后病理检查
- 脐带组织全部为18三体细胞
- 胎盘组织分成10份，
- 胎盘外滋养层细胞中，7/10份含少量（3.6%）的18三体细胞
- 剩余3份组织显示大概有74%的18三体细胞
- 胎盘间叶细胞中，10份组织中大部分（74%）为18三体细胞



假阳性案例

年龄：23岁

孕周：17w+5

无创结果：T13嵌合

其他检测：唐筛风险值1/187

羊水结果：正常

脐带中间段	正常
-------	----

脐带根部	正常
------	----

整个胎盘中心	53.05% T13
--------	------------

母亲面胎盘中心	47.35% T13
---------	------------

母亲面胎盘边缘	46.15% T13
---------	------------

假阳性案例

年龄：21岁

孕周：25w+

无创结果：T21

羊水结果：正常

脐血结果：正常

脐带中间段	正常
-------	----

脐带根部	正常
------	----

整个胎盘中心	23.18% T21
--------	------------

母亲面胎盘中心	43.19% T21
---------	------------

母亲面胎盘边缘	正常
---------	----

假阳性案例

年龄：27岁

孕周：18w+

无创结果：45X

其他检测：唐筛风险值1/220

羊水结果：正常

脐带中间段	XXX嵌合
-------	-------

脐带根部	XO嵌合
------	------

整个胎盘中心	XO嵌合
--------	------

母亲面胎盘中心	XO嵌合
---------	------

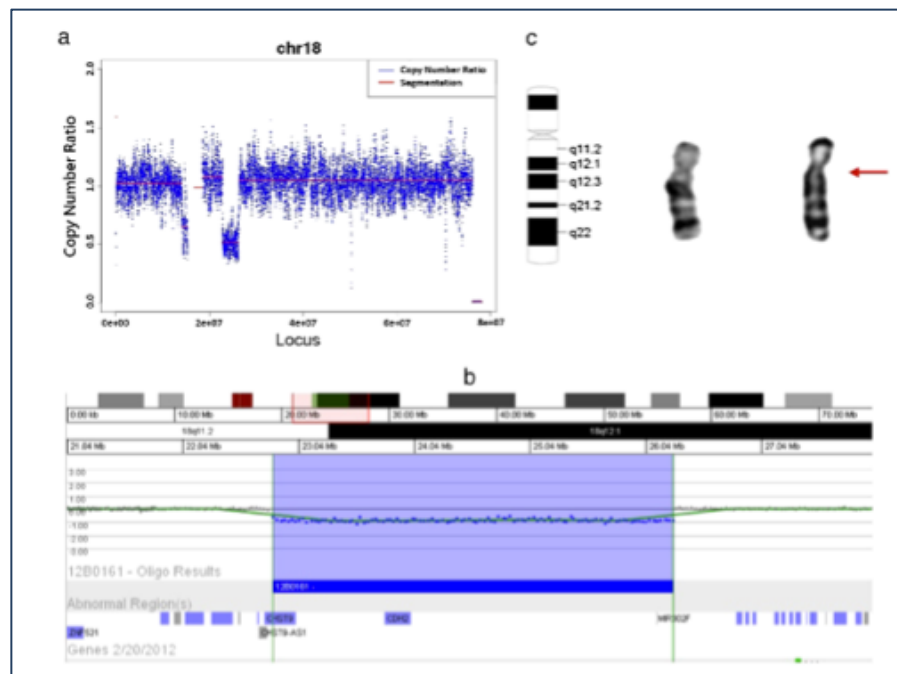
母亲面胎盘边缘	XO嵌合
---------	------

这种胎盘嵌合引起的假阳性／阴性情形能避免吗？

- 胎盘局限性嵌合在妊娠中的发生率约在1-2%
- 这种异常比例的分布是无法避免和减少的
- 由于这种CPM的存在，NIPT作为一种筛查的定位将长期明确
- 如果NIPT提示高风险，一定需要进行介入性产前诊断明确

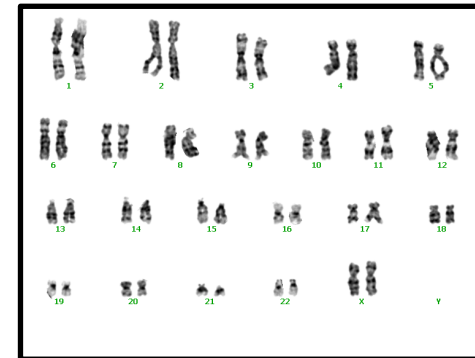
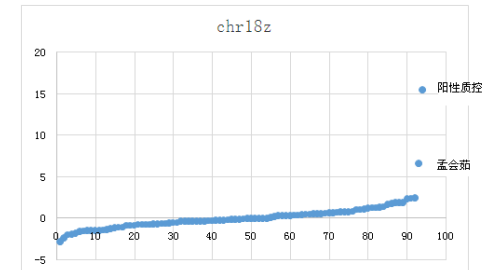
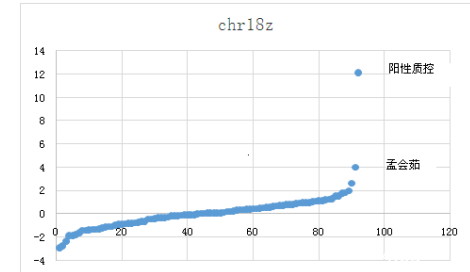
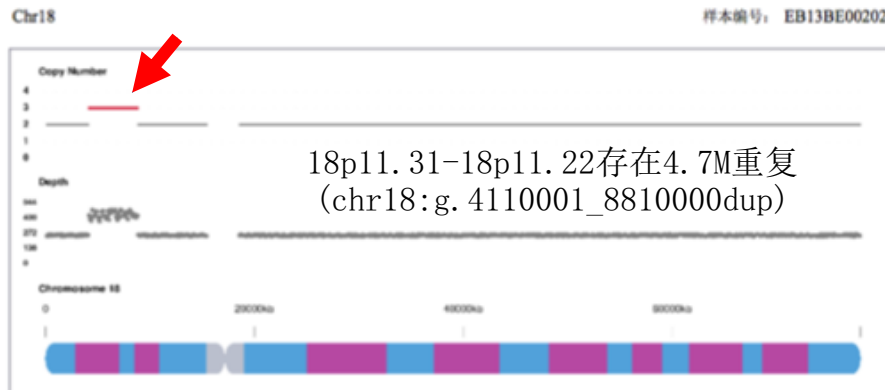
还有别的原因吗？一例由母体自身染色体片段改变（CNV）引起的NIPT假阳性

- 38岁，G1P0
- 早孕期超声NT正常
- 12⁺⁴周NIPT提示T21/18低风险，T18 t-score -3.22
- 17⁺²周行羊水穿刺核型及CMA提示胎儿正常核型（46，XX）
- 抽取母亲外周血检查核型及CMA提示: Chr18q 3.5M（18q11.2–18q12.1）缺失
- 该部分的缺失无相关临床意义

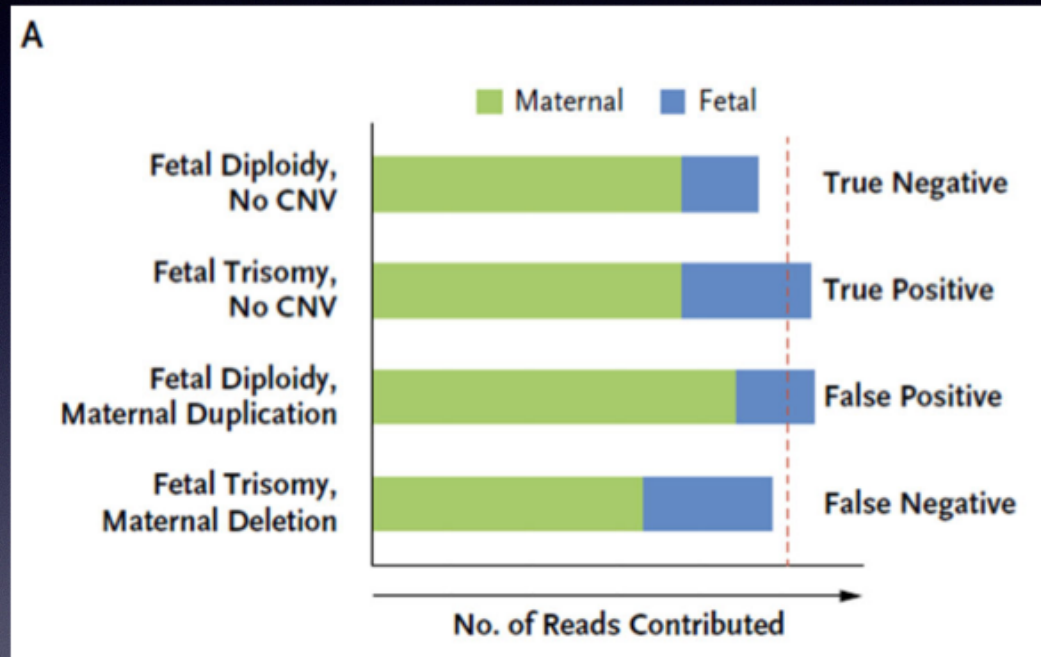


我院的另一例病例

- 孟某，37岁，G2P0
- 早孕期NT正常1.7mm
- 中孕期我院第一次NIPT T18 Z-score 4.03
- 19周我院羊水穿刺结果正常（46.XX）
- 此后复查母亲外周血NIPT T18 Z-score 6.66
- 本人抽取外周血进行全基因组染色体片段测序



母体存在染色体片段的改变 — NIPT假阳性 / 假阴性



母亲携带的CNV会对胎儿染色体非整倍性的计算带来巨大影响。

假阳性的原因之二 – 母体嵌合

Clinical Chemistry 60:1
251–259 (2014)

Molecular Diagnostics and Genetics

Maternal Mosaicism Is a Significant Contributor to Discordant Sex Chromosomal Aneuploidies Associated with Noninvasive Prenatal Testing

Yanlin Wang,^{1,2†} Yan Chen,^{2†} Feng Tian,³ Janguang Zhang,³ Zhuo Song,³ Yi Wu,² Xu Han,² Wenjing Hu,²
Duan Ma,¹ David Cram,^{3*} and Weiwei Cheng^{2*}

~8.6%

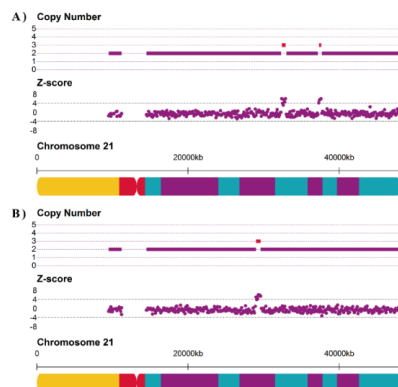
	X染色体非整倍体		总数
	ChrX+	ChrX-	
NIPT异常结果	63	124	187
母体嵌合人数	6	10	16
母体嵌合人数的比例	9.52%	8.06%	8.56%

母体CNV引起的假阳性能够避免或减少吗？



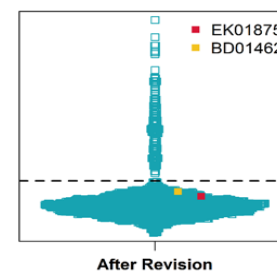
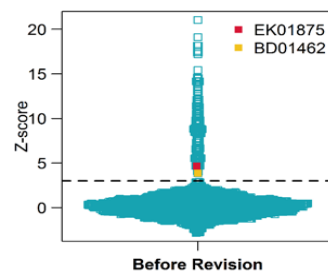
Statistical Approach to Decreasing the Error Rate of Noninvasive Prenatal Aneuploid Detection caused by Maternal Copy Number Variation

2例孕妇在21号染色体携带CNV



样本EK01875 :
500 Kb (21q22.11)
350 Kb (21q22.12)

样本BD01462 :
700 Kb (21q23.1)



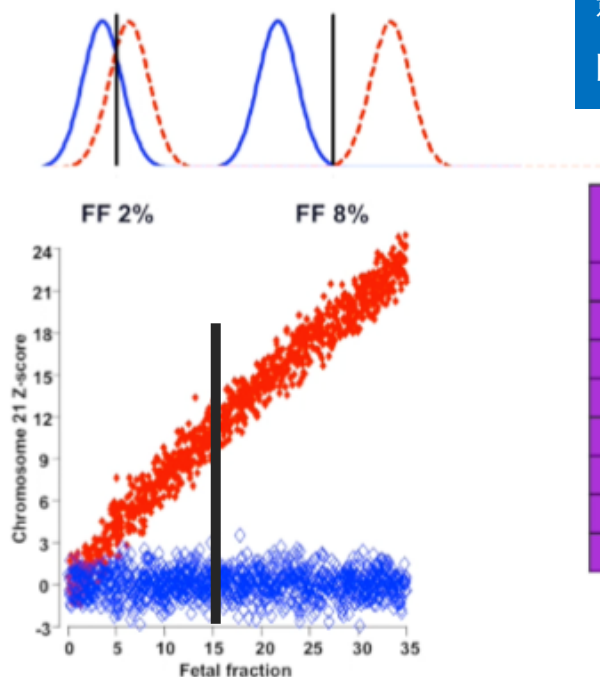
EK01875 Z值 : 4.66 → 1.83

BD01462 Z值 : 3.87 → 2.3

6

排除母体因素干扰，降级NIPT假阳性率

导致NIPT假阳性 / 假阴性的另一个因素--胎儿游离DNA浓度

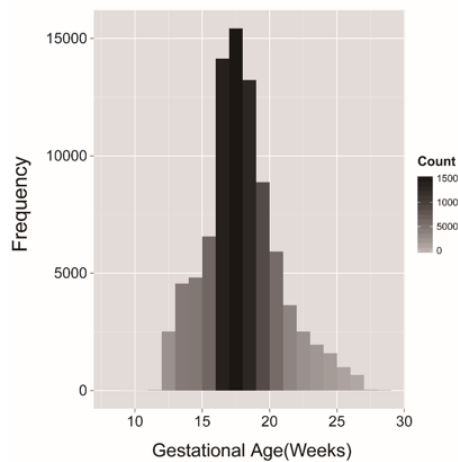


影响胎儿游离DNA浓度的因素：孕周，体重，双胎，IVF-ET妊娠，个体素质，免疫系统疾病，阿司匹林……

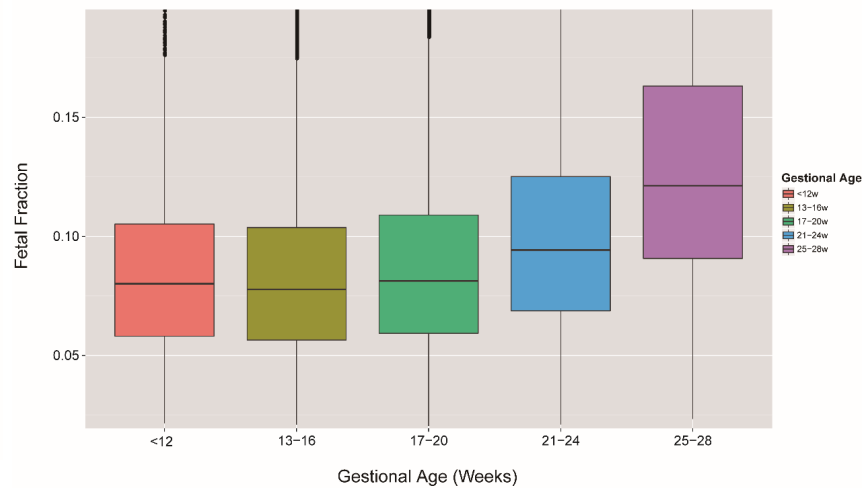
Fetal fraction	cfDNA test		Likelihood ratio	
	FPR (%)	DR (%)	+ve	-ve
4%	0.1	62.1	620	3
5%	0.1	87.4	870	8
6%	0.1	97.6	980	42
7%	0.1	99.8	990	410
8%	0.1	100	1,000	7,350
9%	0.1	100	1,000	>10,000
≥10%	0.1	100	1,000	>10,000
All	0.1	99.0	990	100

Wright D, Wright A, Nicolaides KH: A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies. Ultrasound Obstet Gynecol 2015; 45: 48-54

中国人群数据 — 孕周对胎儿游离DNA的影响



孕周主要分布在17-20周



胎儿浓度随孕周增加而增加

母体体重对于胎儿游离DNA的影响

PRENATAL DIAGNOSIS

Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma

Maternal weight bin (kg)	n	Pregnancies with $\geq 4\%$ fetal cell-free DNA (%)
<50	809	99.8
$\geq 50 < 60$	4825	99.6
$\geq 60 < 70$	6224	99.2
$\geq 70 < 80$	4313	98.8
$\geq 80 < 90$	2574	98.2
$\geq 90 < 100$	1608	96.3
$\geq 100 < 110$	921	93.9
$\geq 110 < 120$	508	89.8
$\geq 120 < 130$	298	87.9
$\geq 130 < 140$	172	81.4
≥ 140	132	71.2

$\geq 4\%$ 胎儿浓度比例随体重升高而减少，降低NIPT检测准确性。

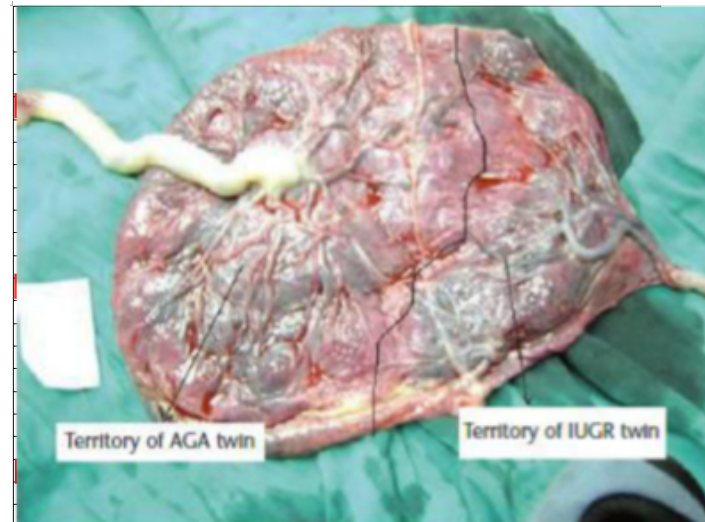
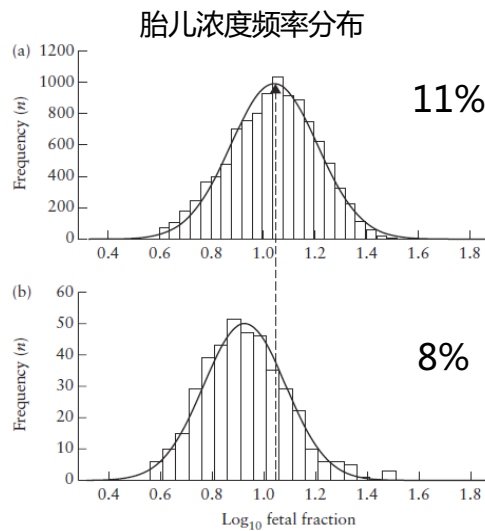
孕妇体重组 (kg)	胎儿DNA含量小于4%的比例
60	0.7%
100	7.1%
120	55.1%

孕11-13周孕妇体重对ffDNA的影响

双胎

ULTRASOUND
in Obstetrics & Gynecology

Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies

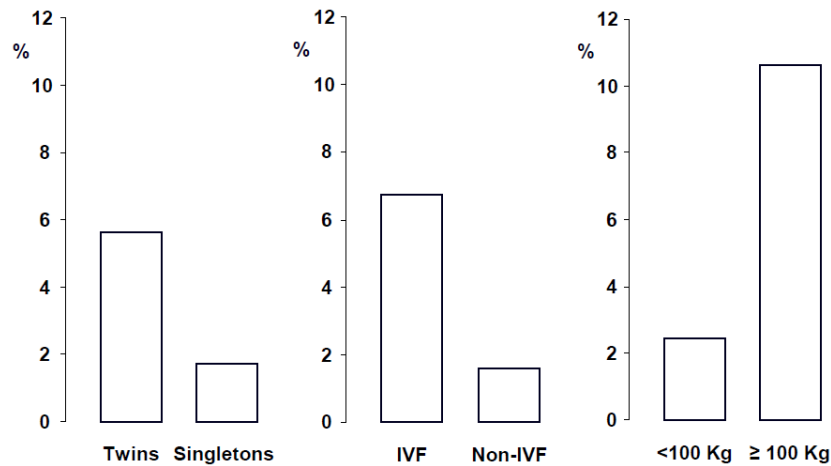


双胎胎儿浓度显著低于单胎胎儿浓度，多因素分析显示
双胎胎儿浓度与BMI、IVF和绒毛膜性相关。

双胎

ULTRASOUND in Obstetrics & Gynecology

Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies



515例双胎妊娠孕妇和
1847例单胎妊娠孕妇，
NIPT检测失败率分别为
5.6%和1.7%；

双胎妊娠与单胎妊娠孕妇相比，NIPT检测失败的重要因素包括双胎妊娠，IVF怀孕方式和母体体重。

辅助生殖妊娠对于胎儿游离DNA浓度的影响

- 辅助生殖妊娠的胎儿游离DNA含量较正常自然妊娠为低
- 检测失败率偏高
- 具体作用机制还不清楚
- 部分原因与多个胚胎植入，存活单胎时其他未发育胚胎的游离DNA干扰有关
- 在NIPT检测规范中属于“慎用人群”，应该做好知情同意

胎儿游离DNA含量不足引起的NIPT假阳性 / 假阴性如何避免？

- 提倡实验室检测并报告胎儿游离DNA浓度
- 目前已经有多种方法可以进行胎儿游离DNA含量的测定
- 但缺乏方法之间的比对研究，没有形成统一的意见
- 国内主流平台基本没有针对游离DNA浓度进行检测
- 方法学的选择和检测成本是主要的问题

Y染色体估算方法

胎儿SNP分型方法

基于SNP的深度靶向测序法

基于SNP的低深度测序 / CMA

基于cfDNA片段数目

基于甲基化标记的方法

基于cfDNA片段长度差异

基于核小体印迹法

进行胎儿游离DNA含量测定方法

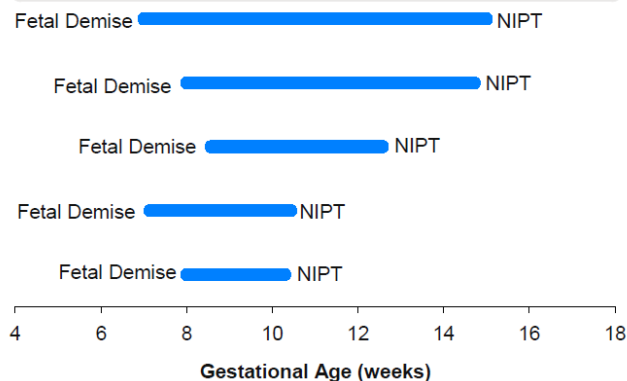
NIPT假阳性 / 假阴性原因之四：双胎一胎胎停育



Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism–based noninvasive prenatal test

外源性或特殊游离DNA干扰

Graphical representation of time elapsed between estimated fetal demise and detection by NIPT for 5 confirmed vanishing twin cases



Case details for confirmed vanishing twin cases

Case	GA at demise, wk	GA at NIPT, wk	Time from demise to NIPT, wk	Fetal fraction
1	8.0	10.3	2.3	11.7%
2	7.1	10.4	3.3	4.6%
3	8.6	12.6	4.0	12.8%
4	8.0	14.7	6.7	11.8%
5	7.0	15.0	8.0	8.1%

10周超声检测一胎心脏跳动消失；
11周NT检测（normal 2.5mm，消失胎儿3.1mm）；
17+2 NIPT阳性；38+2 NIPT正常；
出生，消失胎儿组织核型 47，XX,+21；
胎盘、胎儿脐血、母亲外周血无嵌合

双胎NIPT检测中，消失胎儿影响NIPT准确性

原因之五：合并母体肿瘤



Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies

Table 1. Clinical Details on the 8 Cases of Maternal Cancer That Underwent Genome-wide Analysis

	Case 1*	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8
Aneuploidy detection by NIPT NIPT								
Chromosome 21	Not detected	Not detected	Not detected	Monosomy	Trisomy	Not detected	Not detected	Trisomy
Chromosome 18	Monosomy	Monosomy	Not detected	Monosomy	Monosomy	Trisomy	Monosomy	Trisomy
Chromosome 13	Trisomy	Not detected	Trisomy	Monosomy	Trisomy	Not detected	Not detected	Trisomy
Sex chromosomes	Not done	Not done	Not done	Not done	XY	XX	XXY	Monosomy X
No. of NIPT aneuploidies	2	1	1	3	3	1	2	4
Fetal/newborn status 胎儿核型								
Fetal karyotype	46,XY	Not done	46,XY	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY	46,XX
Pregnancy outcome	Term male	Term female	Term male	Term male	Preterm male, preeclampsia, 29 wk	Term female	Preterm male, 35 wk	Preterm female, 32 wk
Cancer characteristics 癌症特征								
Cancer type	Neuro-endocrine (unknown origin)	Non-Hodgkin (B-cell) lymphoma	Colorectal	Hodgkin lymphoma	Acute T-cell lymphoblastic leukemia	Non-Hodgkin (B-cell) lymphoma	Non-Hodgkin (B-cell) lymphoma	Anal
Stage at diagnosis	IV, metastatic	IVB	IIIC	IIA	NA	IV	II	IIIB

Abbreviations: GA, gestational age at time of NIPT blood draw as obtained from test request form; MRI, magnetic resonance imaging; NA, not applicable;

NIPT, noninvasive prenatal testing.

* Case previously published.¹³

NIPT检测出多条染色体非整倍体与母体潜伏性恶性肿瘤的相关性

我院NIPT除21/18/13/X/Y之外的意外发现病例统计

- 选取我院自2014年起收治的NIPT除外T21/18/13及性染色体异常的高风险诊断结果
- 入组病例150例
- 常见的NIPT异常分布在16， 7， 8， 9， 10， 11等染色体
- 所有诊断均采用核型分析及CMA技术
- 符合NIPT结果的诊断例数见表， 共计37例
- 总体确诊率 （检出率24.7%）

染色体	NIPT异常例数	CMA诊断相符例数	检出率%
1	2	0	0
2	6	1	16.7%
3	7	2	28.6%
4	10	3	30%
5	10	2	20%
6	1	0	0
7	12	1	8.3%
8	16	2	12.5%
9	14	3	21.4%
10	10	6	60%
11	10	6	60%
12	2	1	50%
14	2	0	0
15	7	2	28.6%
16	22	5	22.7%
17	0	0	-
19	1	0	0
20	9	0	0
22	9	3	33.3%
总计	150	37	24.7%

发现9例NIPT结果涉及多个染色体异常 (5.8%, PPV11.1%)

标本号	NIPT结果	CMA诊断结果
AF10305	18号染色体提示单体；2号染色体重复	正常
AF8805	2号染色体重复64.88Mb；8号染色体缺失15.15Mb	正常
AF13176	8号、14号染色体异常	正常
AF8611	3号、11号染色体有重复，X染色体有缺失	正常
AF9222	6、7号染色体微缺失	正常
AF12853	11号及20号染色体数目偏多	正常
AF4751	5号染色体微缺失及3号染色体微缺失	3号染色体3q26.33q29区段存在17.7Mb片段的重复 5号染色体5p15.33p15.1区段存在17.2Mb片段的缺失
AF13255	性染色体数目偏多伴有5号染色体重复	正常
AF10977	14号染色体数目偏多伴有性染色体偏少	正常

NIPT其它异常病例诊断发现的单亲二倍体（13例， 8.3%）

标本号	涉及的染色体	NIPT显示的异常类型	诊断结果
AF7073	1	缺失	UPD
AF5649	4	重复	UPD
AF7471	3	重复	UPD
AF7829	4	不确定	UPD
AF6170	15	重复	UPD
AF4347	5	重复	UPD
AF4977	2	重复	UPD
AF13122	16	重复	UPD
AF13124	16	重复	UPD
AF7168	16	重复	UPD
AF10163	9	重复	UPD
AF9257	9	重复	UPD
AF12682	8	重复	UPD

总结：产生NIPT假阳性 / 假阴性的原因（部分）

- 胎儿游离DNA含量过低

- 孕周过早
- 体重过重
- IVF-ET妊娠
- 双胎妊娠

- 胎儿／胎盘染色体不一致

- 局限性胎盘嵌合
- 胎盘正常，胎儿异常的情况

其他原因

- 测序深度
- 数据分析
- 人为错误

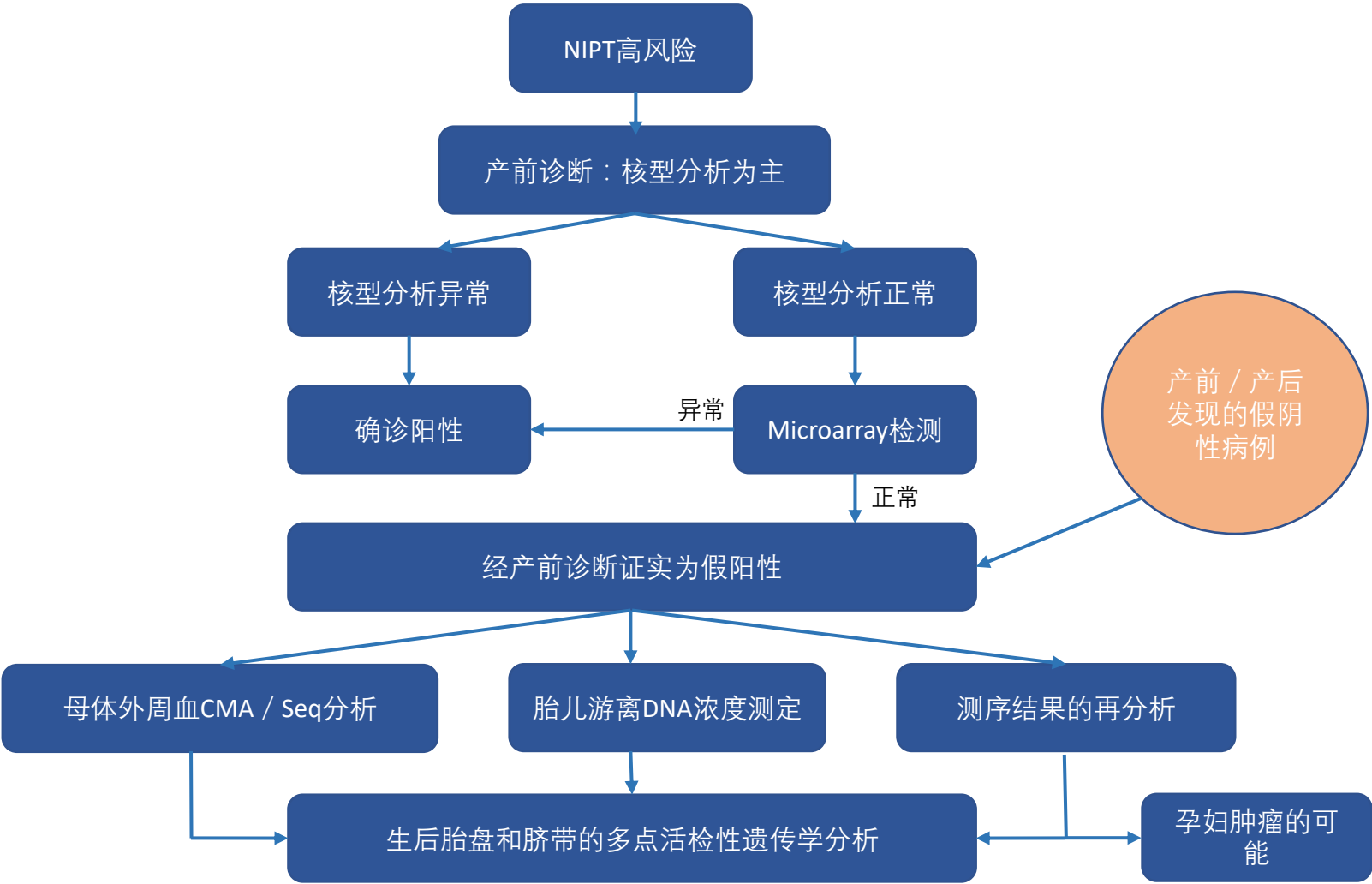
- 母体自身染色体CNV改变

- 母体自身染色体异常
- 母体自身染色体CNV异常改变
- 母体染色体嵌合体异常

- 外源性或特殊游离DNA干扰

- 双胎之一停育
- 外源性输血
- 淋巴细胞免疫治疗
- 母体肿瘤
- 母体自身疾病影响（免疫系统疾病等）

建议的NIPT假阳性 / 假阴性病例诊断流程



NIPT检测前需要和孕妇咨询什么

咨询关键点	描述
明确NIPT的检测目标疾病	提供目标疾病的名称及主要非整倍体异常疾病的描述性信息
提出咨询者的建议	• 有直接诊断指证应建议产前诊断（方式，获益，风险，流程） • 无直接诊断指证，提供各种筛查手段的选择以及相互比较
针对慎用或不适用人群的补充说明	针对慎用人群告知筛查的局限性，针对不适用人群解释不适用的原因
NIPT是一种筛查，而不是诊断	NIPT高风险和低风险的准确含义以及后续处理原则，造成假阳性 / 假阴性的主要原因
告知NIPT针对目标疾病的筛查效率	提供检测实验室对于三种目标疾病的临床敏感性和特异性
讨论NIPT意外发现的可能性及处理	讨论结果存在意外发现的可能性，以及后续的处理
讨论NIPT检测失败的可能性	讨论检测失败的可能，发生率，发生原因以及后续对策
告知NIPT的检测流程	进行NIPT的费用，过程，结果反馈

Thank you !

NIPT检测后需要和孕妇咨询什么

- 高风险的病例尽快在产前诊断机构进行后续咨询及产前诊断
- 检测失败或意外发现的病例也应在产前诊断机构开展后续遗传咨询
- 结果为低风险的病例
 - 告知21，18，13三体的风险很低（漏检率千分之一以下）
 - 提醒不能涵盖所有的其他染色体异常
 - 建议常规产检，特别是中孕期系统超声的重要性



微信扫描二维码可下载本次幻灯文件