

T/GDPMAA

广东省精准医学应用学会团体标准

T/GDPMAA 0004—2020

基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序 无创产前筛查胎儿基因组病技术标准

Technical standards for noninvasive prenatal
screening of pathogenic copy number variants by
high-throughput sequencing of maternal plasma
cell-free DNA

(本稿完成时间：2020-11-23)

2020-11-28 发布

2020-11-28 实施

广东省精准医学应用学会 发布

广东省精准医学应用学会（GDPMAA）是广东省组织开展精准医学学术交流、国际交流、人才培养、出版刊物、科技创新、产学研相结合等活动的省级社会团体。制定广东省精准医学应用学会标准（以下简称：粤精准医标准），满足企业需要，推动企业标准化工作，是广东省精准医学应用学会的工作内容之一。中国境内的团体和个人，均可提出制、修订粤精准医标准的建议并参与有关工作。

粤精准医标准按《广东省精准医学应用学会团体标准管理办法(试行)》进行制定和管理。

粤精准医标准草案经向社会公开征求意见，并得到参加审定会议的 75%以上的专家、成员的投票赞同，方可作为粤精准医标准予以发布。

考虑到本标准中的某些条款可能涉及专利权，广东省精准医学应用学会不负责对其任何该类专利权的鉴别。

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给广东省精准医学应用学会，以便修订时参考。

该标准为广东省精准医学应用学会制定，其版权为广东省精准医学应用学会所有。除了用于国家法律或事先得到广东省精准医学应用学会文字上的许可外，不许以任何形式再复制该标准。

广东省精准医学应用学会地址：广东省广州市越秀区天河路 45-21 号

邮政编码：510075 电话：020-87001157 传真：020-87001157

网址：www.gdpmaa.com 电子信箱：pm@gdpmaa.com

目 次

前 言	IV
引 言	V
基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术标准	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 制定 NIPS 筛查胎儿基因组病技术标准的必要性说明	3
5.1 NIPS 筛查胎儿基因组病(pCNV)的临床意义和前景	3
5.2 NIPS 筛查胎儿基因组病的国内外指南、声明	3
5.3 国内开展 NIPS 筛查胎儿基因组病的现状及存在的问题	3
5.3.1 缺乏技术规范	3
5.3.2 检测平台多样化	3
5.3.3 检测和报告 pCNV 范围的不一致性	4
5.4 制定 NIPS 高通量测序筛查胎儿基因组病技术标准的必要性	4
6 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的目标疾病和意外发现	4
6.1 基于 NIPS 高通量测序筛查胎儿基因组病的目标疾病	4
6.1.1 基因组目标疾病的纳入标准	4
6.1.2 目标疾病	5
6.2 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病意外发现	6
7 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的检测前知情告知和检测前咨询	6
7.1 临床适应症和适用检测孕周	6
7.1.1 适宜时间	6

7.1.2 适用人群或临床适应症	6
7.1.3 慎用人群	6
7.1.4 不适用人群	7
7.2 检测前咨询要点	7
7.3 申请单和知情同意书签署	8
8 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病标准化实验流程	8
8.1 孕妇基本资料信息的采集	8
8.2 标本的采集	8
8.2.1 标本采集前信息核对	8
8.3 实验室检测的关键步骤及注意事项	10
8.4 关键实验步骤 SOP 和记录	12
9 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的质量控制	13
9.1 NIPS 筛查胎儿基因组病的质量控制指标	13
9.2 室内质控	14
9.3 室间质评或实验室间的能力验证	15
9.4 季度性数据及验证结果的统计及分析	16
9.5 假阳性和假阴性结果分析	16
9.6 对检测失败标本的季度性数据分析及随访结果汇总	19
10 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查的数据分析及技术参数标准	20
10.1 数据分析流程	20
10.2 临床应用必须达到的参数标准	27
11 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查报告内容	27
11.1 目标疾病常规检测报告包括内容	27
11.1.1 检测方法和检测平台	27
11.1.2 筛查的目标疾病明细清单（包括 PPV/NPV、其临床意义、外显率等）	27
11.1.3 方法局限性和残余风险	27
11.1.4 遗传咨询意见	27
11.1.5 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查常规报告模板（见附录）	28

11.2 意外发现补充报告内容	28
11.2.1 意外发现结果及报告建议	28
12 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查检测后遗传咨询及随访	28
12.1 筛查高风险报告的遗传咨询	29
12.2 筛查低风险报告和遗传咨询	29
12.3 意外发现补充报告遗传咨询及进一步产前诊断	29
12.4 报告发放后的随访	30
12.4.1 随访内容	30
12.4.2 随访时间	30
12.4.3 随访率要求	30
12.5 对可能失访的应对措施及处理	30
附 录 1	32
附 录 2	34
附 录 3	36
附 录 4	38
附 录 5	39
附 录 6	40
附 录 7	41
附 录 8	42
附 录 9	43
附 录 10	44
附 录 11	46
附 录 12	49
附 录 13	50
附 录 14	51
参考文献	52

前 言

本标准按GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由广东省妇幼保健院提出，由广东省精准医学应用学会归口。

本标准起草单位：广东省妇幼保健院、广州医科大学附属第三医院、中山大学附属第三医院、中南大学生科院遗传系、浙江大学医学院附属妇产科医院、空军军医大学第一附属医院、郑州大学第三附属医院暨河南省妇幼保健院、宁夏医科大学总医院、北京贝瑞和康生物技术有限公司、东莞博奥木华基因科技有限公司、深圳华大基因股份有限公司、安诺优达基因科技（北京）有限公司、因美纳（中国）科学器材有限公司、北京优迅医学检验实验室有限公司、深圳市人民医院、深圳市第二人民医院、深圳市妇幼保健院、深圳市龙岗区妇幼保健院、深圳南山区妇幼保健院、东莞市妇幼保健院、惠州市第一妇幼保健院、中山市博爱医院、江门市妇幼保健院、广东省人民医院、粤北人民医院、清远市人民医院、广州医科大学附属第一医院、暨南大学附属第一医院、南方医科大学附属珠江医院、东莞市人民医院、阳江市妇幼保健院、茂名市人民医院、佛山市第一人民医院。

主要起草人：尹爱华、刘维强、杨洁霞、章钧、卢建、陈样宜、向嘉乐、朱红敏、王游声、汪敏、王娟、伍启熹

参与修改人：邬玲仟、董旻岳、崔世红、张建芳、张琳琳、潘丽华、彭智宇、任志林、张建光、殷晓燕、黄永清、齐一鸣、张静波、郭辉、赵卫华、谢建生、魏凤香、张静、刘彦慧、何怡、陈剑虹、王德刚、唐佳、李萍、范舒舒、谭卫荷、李志华、何志晖、查庆兵、闫瑞玲、江凌晓、杨芳、李婵、曾昭珊、刘传勇、黄淑瑜

本标准首次制定，将根据国内外行业最新发展陆续完善更新。

引 言

基于孕妇血浆胎儿游离DNA进行高通量测序无创产前筛查（Noninvasive prenatal screening, NIPS）胎儿罹患21三体、18三体、13三体综合征风险的技术已在临床广泛开展。相对于常规的血清学筛查方法，NIPS具有高阳性预测值（positive predictive value, PPV）、高敏感性（sensitivity）和高特异性（specificity）等优势，为出生缺陷防控提供了强有力的方法学支持。

针对NIPS技术的临床应用，国内外专业团体、学会已出台相关指南和共识[1-3]。我国于2016年以国家卫健委办公厅文件形式下发了国卫办妇幼发【2016】45号文件[4]，对NIPS的临床应用提出了明确的管理要求并出台了技术规范。对目标疾病（13、18、21三体综合征）以外的其他高风险等意外发现，【2016】45号文指出产前诊断机构应当告知孕妇本人或其家属进行进一步的咨询和诊断，但并没有对此部分内容进行更详细的描述。

除外染色体数目异常，基因组病亦即致病性染色体微缺失微重复综合征（或称致病性拷贝数变异，pathogenic copy number variants, pCNV），也是出生缺陷的一个重要的遗传学因素，是NIPS筛查三条目标染色体疾病以外的高频检出变异。有研究表明，在孕妇群体中，胎儿携带pCNV的比例可高达1.6%-1.7%[5, 6]，这个比例已远高于21三体的发生率，因此，开展胎儿无创pCNV筛查对预防出生缺陷有非常重要的意义。

随着NIPS检测和生物信息分析技术的日趋完善以及大样本数据的积累，基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病已尝试在临床应用，但目前国内对NIPS筛查pCNV缺乏相应的管理和规范指导文件。此技术在临床应用前、后如何遗传咨询，究竟筛查哪些pCNV疾病、意外发现如何处理等均没有统一的参考标准，对NIPS筛查pCNV的质量控制及实验室流程、报告内容及随访内容等更亟需出台具体细节文件以指导此技术的规范开展。鉴于此，国内多家省级产前诊断技术指导中心以及在NIPS技术研发、应用领域经验丰富的相关单位共同参与，参考国内外最新指南和专家共识，结合pCNV的人群发病率、导致疾病的严重程度，前期已积累的临床大数据以及NIPS筛查pCNV的敏感性、PPV等指标，明确拟筛查的目标疾病，并就此技术的全流程临床规范应用细节达成技术层面共识，以期达到NIPS高通量测序筛查胎儿基因组病技术在产前筛查及诊断中规范应用的目的。

基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术标准

1 范围

本标准规定了基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术在临床应用中，筛查的目标疾病、对意外发现的报告范围、检测前后的遗传咨询要点、筛查的实验室标准流程及记录明细、实验流程的质量控制及数据分析和技术参数标准、筛查的报告内容、对假阳性、假阴性、检测失败标本的分析及规范化随访流程等。

本标准适用于具备临床产前遗传学诊断资质的医院、与产前诊断机构签署合作协议的具资质的第三方医学检验实验室等使用高通量测序技术开展基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病项目的全流程规范化临床应用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 34798-2017 核酸数据库序列格式规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

3.1

胎儿游离 DNA cell free fetal DNA

在孕妇外周血中存在来自胎儿胎盘来源的游离 DNA。胎儿游离 DNA 主要来自于胎盘滋养层细胞程序性死亡后释放的短的 DNA 片段或胎盘微粒进入母体血液循环时胎儿 DNA 的断裂片段，通常片段小于 200 bp，其在母体血浆中的浓度可随着孕周变化。

3.2

无创产前筛查 noninvasive prenatal screening, NIPS

应用高通量测序等分子遗传技术检测孕期母体血浆中胎儿游离 DNA 片段，以评估胎儿常见染色体非整倍体风险，主要目标疾病为 21 三体综合征、18 三体综合征和 13 三体综合征。基于此技术同时也可检出其他染色体非整倍体高风险及基因组病（pCNV）高风险等。

3.3

高通量测序 high-throughput sequencing

也称为下一代测序技术（next-generation sequencing, NGS），指通过大规模平行测序等技术对包括人类外显子或者全基因组序列等进行测序，同时产生数千条至数百万条测序片段，然后通过生物信息处理与标准参考基因组序列比对等，得到序列变异、非整倍体、拷贝数变异（copy number variants,CNV）等信息。

3.4

唯一比对序列 unique reads

通常指高通量测序过程中产生的几十个到几百个碱基的短的测序片段只能唯一比对到标准基因组序列的某个位置上，这些与参考基因组序列唯一比对上的测序片段称为唯一比对序列。长片段测序技术中唯一比对序列也可长达几千个碱基。

3.5

基因组病 Genomic disorders

由人类基因组重排而非 DNA 序列碱基变异引起的疾病，也称为染色体微缺失、微重复综合征。

3.6

拷贝数变异 copy number variation /copy number variants, CNV

由基因组发生重排而导致的、一般指长度为 50 bp 以上的基因组片段的拷贝数增加或者减少。主要表现为亚显微水平的染色体微缺失和微重复，是人类疾病的重要遗传学致病因素之一。

3.7

染色体三体综合征 trisomy syndrome

是染色体病的一种。指一个个体在 1 到 22 号染色体及性染色体上的某一号染色体数目额外增加了一条，使染色体数目从正常的 46 条变成 47 条。常染色体三体综合征是导致严重的出生缺陷及胚胎停育、早期流产、胎死宫内的重要遗传学原因。

4 缩略语

以下缩略语适用于本文件

NIPS——无创产前筛查 (noninvasive prenatal screening)

Cff-DNA——游离胎儿脱氧核糖核酸 (cell free fetal Deoxyribonucleic acid)

Cf-DNA——游离脱氧核糖核酸 (cell free Deoxyribonucleic acid)

ACOG——美国妇产科医师学会 (American College of Obstetricians and Gynecologists)

ISPD——国际产前诊断学会 (International Society for Prenatal Diagnosis)

NT——颈项透明层 (Nuchal Translucency)

PCR——聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

BMI——身体质量指数 (Body Mass Index)

Chr——染色体 (Chromosome)

SNP——单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism)

STR——短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)

SOP——标准操作流程 (Standard Operation Procedure)

DECIPHER——人类基因组变异和表型数据库 (DatabasE of genomIc variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)

OMIM——在线人类孟德尔遗传数据库 (Online Mendelian Inheritance in Man)

DGV——人类基因组结构变异数据库 (Database of Genomic Variants)

ACMG——美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics)

ClinGen——临床基因组资源 (The Clinical Genome Resource)

ISCN——人类细胞遗传学术语国际命名体制 (International System for Human Cytogenomic Nomenclature)

HGVS——人类基因组变异协会 (Human Genome Variation Society)

FISH——荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization)

PPV——阳性预测值 (Positive Predictive Value)

NPV——阴性预测值 (Negative Predictive Value)

bp ——碱基对(Base pair)

Mb ——一百万个碱基, DNA 或 DNA 片段的长度单位之一 (Mega base)

Kb——一千个碱基, DNA 或 DNA 片段的长度单位之一 (Kilo base)

ml——毫升, 一种体积计量单位 (milliliter)

PDCA——由 Plan(计划)、Do(执行)、Check(检查) 和 Action(处理) 组成的质量管理循环

5 制定 NIPS 筛查胎儿基因组病技术标准的必要性说明

5.1 NIPS 筛查胎儿基因组病(pCNV)的临床意义和前景

研究表明, 基因组水平的微缺失微重复在人群中的携带率可达 1/270[3], 孕妇群体中其胎儿携带具临床意义 pCNV 的比例可达 1.6%-1.7%, 远高于 21、18、13 三体综合征 0.2% 的发生率[7], 并且 pCNV 是导致先天畸形、智力障碍等出生缺陷的重要遗传原因之一, 因此开展胎儿 pCNV 的产前筛查及产前诊断对出生缺陷的防控有重大意义。

NIPS 技术自临床应用以来已为超过 1000 万名孕妇筛查胎儿罹患非整倍体风险。除了 21、18、13 三体综合征外, 基于全基因组高通量测序的 NIPS 技术还同时筛查到了大量的其他常染色体、性染色体和 pCNV 的高风险, 在 pCNV 的产前筛查上已积累了大量的临床数据和应用经验[8-10]。研究表明, 对于片段大于 6 Mb 的 pCNV, NIPS 的筛查效率已可达 83%-90.9%[11, 12], 并且随着胎儿游离 DNA 浓度富集及加大测序深度、生物信息分析流程的进一步优化等, 诸如 DiGeorge 综合征等 3 Mb 左右的 pCNV 的 PPV 也可达 92.9%[10], 因此利用 NIPS 高通量测序筛查胎儿基因组病在技术上已具备临床应用可行性。

5.2 NIPS 筛查胎儿基因组病的国内外指南、声明

对于 NIPS 筛查基因组病或 pCNV, 国外权威学术机构如 ACMG、ISPD 均以指南或声明的形式指出, 在做好知情同意, 明确待检测 pCNV 的检出率、特异性、PPV、NPV 等指标前提下, 可以针对临床意义明确、表型严重的 pCNV 进行筛查[2, 13]。2020 年 ACOG 关于筛查胎儿染色体异常的临床声明中虽然因临床验证数据的不充分而暂不推荐开展 pCNV 的筛查, 但同时指出 NIPS 如果发现 pCNV 应该进行后续验证[3]。因此, 从临床应用角度来看, 在临床前期实验数据充分、各项关键指标明确的前提下, 可以对发病率高、致病性严重的 pCNV 进行 NIPS 筛查。

5.3 国内开展 NIPS 筛查胎儿基因组病的现状及存在的问题

5.3.1 缺乏技术规范

如前所述, 国内外目前均没有针对 NIPS 筛查胎儿基因组病发布过相关技术规范或指导文件。

5.3.2 检测平台多样化

目前 NIPS 临床应用有多种技术平台，不同的技术平台测序原理不一致，产生的数据量不一致，相同的平台和检测方法也可能参考不一致的技术标准。因此如果没有统一的技术标准，不同平台、不同方法进行 NIPS 筛查 pCNV 的效能就可能会出现不一致。

5.3.3 检测和报告 pCNV 范围的不一致性

目前对 NIPS 筛查 pCNV 目标疾病和报告范围尚没有形成共识，筛查和报告的 pCNV 从 7 种到 88、100 种甚至几百种。对这些拟筛查和报告的 pCNV，绝大部分缺乏临床循证证据，没有进行筛查效能（检出率、假阴性、假阳性、PPV、NPV 等）评估，容易导致大量经济和医疗资源浪费及引发潜在的医疗纠纷。

5.4 制定 NIPS 高通量测序筛查胎儿基因组病技术标准的必要性

由于 NIPS 筛查的是来源于胎盘的游离 DNA，受疾病发生率、假阳性率、胎儿游离 DNA 浓度、测序深度、pCNV 片段大小等多种因素的影响[14, 15]，NIPS 筛查 pCNV 无法达到筛查 21 三体的效能，仍有很多 pCNV 不能有效筛出[10]，需要在检测前充分告知。同时 NIPS 也可筛出大量的临床意义未明 CNV[16] 或对胎儿产生的影响不严重的 pCNV，这类 CNV 均不建议纳入到筛查和报告范围内。

综上，NIPS 筛查胎儿基因组病在技术层面已具备条件，针对一些临床后果严重、疾病发生率高且前期数据积累证明其检出率、PPV 均较理想的 pCNV 开展临床应用对防控出生缺陷具有重要的意义，但亟需出台详细的技术标准，明确筛查的目标疾病及全流程质量控制要点，规范此技术的临床应用。

6 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的目标疾病和意外发现

6.1 基于 NIPS 高通量测序筛查胎儿基因组病的目标疾病

6.1.1 基因组目标疾病的纳入标准

(1) 目前已知的染色体微缺失微重复综合征超过 300 多种[17]，对胎儿期存在超声结构异常的可疑染色体微缺失微重复综合征，应产前诊断。进行基于染色体微阵列芯片（chromosomal microarray analysis, CMA）或基于高通量测序技术的基因组拷贝数变异测序（copy number variation sequencing, CNV-seq）等遗传学检测[18, 19]。

(2) 对于孕早期超声未见异常或因孕周偏小、胎儿超声暂未发现异常的孕妇，仍有 1% 的可能携带 pCNV[6]。如果孕妇自愿 pCNV 筛查，或符合 7.1 条款的临床适应症时，可以在知情同意、详细告知、孕妇及家属自愿承担风险的情况下酌情进行。

(3) 纳入 NIPS 筛查基因组目标疾病的临床数据依据

NIPS 筛查基因组目标疾病的纳入依据之一为参考基于大数据临床样本的已发表文献。研究证实，从 PPV 指标来看，NIPS 筛查 22q11.2 微缺失综合征可达 93%，Prader-Willi/Angleman 综合征达 75%，Cri du Chat 综合征达 50%，大于等于 10 Mb 的 pCNV 的 PPV 为 32%[10]。因此临床前期已经证实 NIPS 筛查效能较好且疾病后果严重的 pCNV 是此次团体标准拟纳入的筛查目标疾病的一个重要参考依据。

(4) 目标疾病纳入标准的主要参考依据

① 疾病的严重程度：可导致严重致死、致残、致愚等后果的 pCNV，疾病目前尚无有效治疗方法。

② 疾病在活产儿中的发病率：极罕见疾病或发病率低于 1/100000 的 pCNV 疾病不建议纳入目标疾病。

③ 前期大数据(含未发表数据)已证实 NIPS 可有效检出的 pCNV (如检出率大于 70%，目标疾病复合 PPV 大于 30%)。目前研究对 pCNV 的片段大小检出范围界定从 1 Mb[9]至 10 Mb[10]，大多选择 3-5Mb 作为 NIPS 筛查 CNV 的检测敏感下限[6, 15, 20]。NIPS 筛查小片段 pCNV 的效能尚未有大数据证据支持。由于筛查方法的灵敏度，不建议对小于 3 Mb 的 pCNV 进行筛查和报告。

④ pCNV 外显率(对低外显率，如小于 10%，且表型不严重的 pCNV 疾病不建议纳入)。

综合以上标准以及参考人类基因组变异和表型数据库 DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/disorders/syndromes/list>)及临床基因组资源 ClinGen (https://dosage.clinicalgenome.org/pathogenic_region.shtml)等数据库中已收录的疾病特性非常明确的 pCNV，本团标拟确定以下 5 种染色体疾病及 10 种 pCNV 疾病作为基于 NIPS 高通量测序无创筛查胎儿基因组病的目标疾病。

注：随着临床数据的积累，对其他 pCNV 的临床检测效能符合临床应用要求时，可以对目标疾病目录进行更新。

6.1.2 目标疾病

- (1) 21、18、13 号染色体三体综合征。
- (2) Turner 综合征、Klinefelter 综合征。
- (3) 10 种基因组病。目标基因组病列表见表一。

表一 NIPS 高通量测序无创筛查胎儿基因组病的目标疾病

基因组病目标疾病 /OMIM 编号	染色体位置/变异类型	新生儿发病率*	pCNV 片段大小 #	主要表型
22q11.2 微缺失综合征 OMIM #188400	22q11.2 缺失	1/4000-1/10000	3 Mb (90%) , 1.5Mb (7-8%)	先天性心脏病、免疫缺陷、认知和精神异常，生长发育异常等
PWS/Angelman 综合征 (1 型) OMIM #176270 (PWS) OMIM #105830 (AS)	15q11.2-q13 缺失	PWS: 1/10000-1/30000 AS: 1/12000-1/20000	5-7 Mb	PWS:新生儿肌张力低下，婴儿期喂养困难，儿童期后肥胖，生长发育迟缓，智力迟钝，行为问题 AS:共济失调，癫痫，严重智力落后，严重发育迟缓和语言缺陷
Smith-Magenis 综合征 OMIM #182290	17p11.2 缺失	1/15000-1/25000	3.5 Mb	颅面部异常、发育迟缓、认知障碍、轻到中度智力障碍，自我伤害行为
Wolf-Hirschhorn 综合征 OMIM #194190	4p16.3 缺失	1/20000-1/50000	2-30 Mb	特殊面容、小头畸形、癫痫、生长发育和精神发育迟滞
Cri du Chat 综合征 (5p 缺失综合征) OMIM #123450	5p15.2-5p 缺失	1/15000-1/50000	10-45 Mb	严重智力障碍、精神发育异常、小头畸形、特殊面容
1p36 缺失综合征 OMIM #607872	1p36.33-p36.13 缺失	1/5000-1/10000	1.5Mb 到 大于 10Mb	语言障碍、精神行为异常、特殊面容、肌张力低下
9p 缺失综合征 OMIM#158170	9p 缺失	1/50000	-43Mb	颅面部畸形、发育迟缓、智力障碍、语言发育落后、心血管系统异常等
18p 缺失综合征 OMIM#146390	18p 缺失	1/50000	部分或全部 18p 缺失	智力障碍(程度不一)，语言发育迟滞，颜面部畸形
18q 缺失综合征 (末端微缺失) OMIM#601808	18q22.3-q23 (关键区域) 缺失	1/10000	4.3 Mb (关键区域)	智力落后、肌张力减退、身材矮小、发育迟缓、身材矮小、生长激素缺乏、听力丧失和外耳异常、智膈部缺陷、面部畸形、骨骼异常等
Jacobsen 综合征 (11q 缺失综合征) OMIM#147791	11q 缺失	1/100000	7-20 Mb	生长发育迟缓、智力低下，先天性心脏病、多系统先天畸形

* 疾病发生率参考梁德生、邬玲仟教授主编的基因组拷贝数变异与基因组病，西安交通大学出版社，2015年5月发表以及 [genereviews](http://genereviews.ncbi.nlm.nih.gov/books/) 网站 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

因断点不同，同一目标基因组病 pCNV 片段可大小不一，当筛查的目标疾病 pCNV 在血浆中的片段小于 3 Mb 时，需在知情同意中告知存在漏检的风险并取得知情同意

6.2 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病意外发现

除目标疾病外，发现以下高风险时可作为 NIPS 筛查胎儿基因组病的意外发现结果进行补充报告。

(1) NIPS 发现染色体末端的重复和缺失，且孕妇夫妻双方的表型正常情况下，提示孕妇夫妻之一可能为染色体平衡易位携带者。

(2) 目标疾病以外的片段大于 10 Mb 的 pCNV。

(3) 检出其他常染色体数目异常时，结合孕周、超声情况进行遗传咨询。对于其他常染色体非整倍体，由于大多属于不可存活三体（nonviable trisomy），多在孕早期发生自发性流产，因此建议综合孕周、胎儿游离 DNA 浓度、风险值（Z 值）、是否有超声异常等进行遗传咨询、进行羊水 FISH 检测等，以排除胎儿存在染色体三体嵌合体可能。

(4) 对多条染色体异常的意外发现：同时检出多条染色体异常提示母源性肿瘤风险增加[21]。

7 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的检测前知情告知和检测前咨询

7.1 临床适应症和适用检测孕周

7.1.1 适宜时间

NIPS 筛查 pCNV 的临床适宜时间段为孕 12⁺⁰ 周至孕 22⁺⁶ 周，对超过适宜孕周的且孕妇自愿进行 NIPS 筛查 pCNV 且自愿承担风险的，可放宽到孕 28 周。考虑到本方法为筛查技术，筛查高风险后需进行产前诊断，诊断异常后的临床处理等对孕周时间要求较严，大于孕 28 周的不建议进行 NIPS 筛查 pCNV。

7.1.2 适用人群或临床适应症

依据国卫办妇幼发【2016】45 号文件中关于孕妇外周血游离 DNA 产前筛查与诊断技术规范[4]，基于 NIPS 高通量测序筛查 pCNV 临床适用人群包括：

(1) 血清学筛查显示胎儿染色体非整倍体风险介于高风险切割值与 1/1000 之间的孕妇。

(2) 有介入性产前诊断禁忌症者（如先兆流产、发热、出血倾向、慢性病原体感染活动期、孕妇 Rh 阴性血型等）。

(3) 孕 20⁺⁶ 周以上错过血清学筛查最佳时间，但要求评估 21 三体综合征、18 三体综合征、13 三体综合征风险及胎儿基因组病风险者。

(4) 在充分知情同意及告知后，自愿进行 pCNV 筛查且自愿承担风险的孕妇。

7.1.3 慎用人群

(1) 早、中孕期产前筛查高风险。

(2) 预产期年龄 ≥ 35 岁。

(3) 重度肥胖（体重指数 > 40）。

(4) 通过体外受精-胚胎移植方式受孕。

(5) 有染色体异常胎儿分娩史、但除外夫妇染色体异常的情形。

(6) 双胎妊娠。

(7) 医师认为可能影响结果的其它情形（如双胎之一消失或停止发育）。

(8) 单个超声软指标异常：包括 15-20 周胎儿颈后皮层增厚 ≥ 6 mm；中孕期肾盂增宽大于 4 mm 且小于 10 mm；胎儿肠管回声增强；股骨短（小于 2.5 百分位数）；胎儿心内强光斑；单侧或双侧脉络丛囊肿；迷走左/右锁骨下动脉；单脐动脉等。

7.1.4 不适用人群

- (1) 孕周 $<12^{+0}$ 周。
- (2) 夫妇一方有明确的染色体异常或明确携带 pCNV。
- (3) NT 大于 3.0 mm 或胎儿超声提示有结构异常，应进行产前诊断[3]
- (4) 孕妇合并恶性肿瘤。
- (5) 有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患单基因病高风险。
- (6) 1 年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等。
- (7) 医师认为有明显影响结果准确性的其他情形。

7.2 检测前咨询要点

7.2.1 告知检测的目标疾病，基于目前临床大数据统计的目标疾病 pCNV 的检测敏感性（检出率）、特异性、PPV/NPV 等指标[22]。

7.2.2 咨询医生应当明确告知该检测是一种筛查方法，如果检测结果高风险需要进行进一步产前诊断以排除胎儿染色体异常或基因组病。

7.2.3 告知本实验室 NIPS 筛查 pCNV 的检测方法、阳性率、该方法局限性包括检查效能不如 21、18、13 三体高风险筛查，存在假阳性、假阴性风险，检测失败重采血可能（1%）以及检测失败退费可能等[3]。

7.2.4 告知筛查方法发现的 pCNV 可能与产前诊断检出 pCNV 存在片段大小的不一致性，pCNV 可因外显不全等因素导致不出现超声异常表型或出生后不一定出现表型等。

7.2.5 告知影响检测结果的可能因素（BMI 过高、双胎之一消失、体外受精试管婴儿、孕妇本人染色体异常、母体疾病如恶性肿瘤[21, 23]以及孕妇自身免疫病或孕期使用肝素等）。

(1) BMI 过高：BMI 过高孕妇由于外周血容量增加，外周血中 cfDNA 浓度被稀释，另外孕妇脂肪组织坏死和凋亡也会释放游离 DNA，均可导致胎儿 cfDNA 浓度低而达不到质控要求[24]。

(2) 双胎之一消失或停止发育：双胎之一消失或早期胚胎停止发育或早期减胎后行 NIPS，虽然有文献进行了相关研究[25]，但目前仍缺乏大数据的循证证据支持，需慎用。

(3) 体外受精试管婴儿：接受辅助生殖受孕的孕妇行 NIPS 相对自然妊娠检测失败风险增加 3.8 倍[26]。

(4) 孕妇本人携带 pCNV：孕妇本人携带 pCNV 可致母体背景增加，导致 NIPS 检测假阳性结果。

(5) 自身免疫病或孕期使用肝素：孕妇有自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮或孕期使用肝素治疗可能增加检测失败概率[27, 28]，其原因为孕妇自身免疫性疾病或孕期使用肝素使外周血游离 DNA 片段较短和增加富含 GC 的游离 DNA 片段比例所致。

(6) 孕妇自身肿瘤：孕妇已确诊肿瘤，包括恶性肿瘤如乳腺癌、淋巴瘤、白血病以及卵巢癌、多发性骨髓瘤、消化癌、恶性黑色素瘤或肉瘤等和良性肿瘤（多发性子宫肌瘤、乳腺纤维瘤等），肿瘤来源的循环肿瘤 DNA（circulating tumor, ctDNA）释放到孕妇外周血中导致 NIPS 检测失败。

7.2.6 详细填写申请单和签署知情同意书。

7.3 申请单和知情同意书签署

7.3.1 开展 NIPS 筛查 pCNV 的知情告知同意书应至少涵盖以下内容：

- (1) 检测方法和检测目的。
 - (2) 检测目标疾病和不适宜检测人群。
 - (3) 基于目前大样本统计的目标 pCNV 的检测敏感性、特异性、各自的 PPV/NPV 等关键指标。
 - (4) 可能出现假阳性(概率约 0.5%左右)和假阴性结果。
 - (5) 检测失败重采血可能(约 1%)，检测失败退费可能(约 0.05%) [25]。
 - (6) 告知该检测是一种筛查方法，如果检测结果高风险需要进行进一步产前诊断排除胎儿染色体异常；检测结果低风险不等于没有风险，有一定漏诊残余风险，应当结合孕期超声等其他检查综合考虑是否需要进一步产前诊断。
 - (7) 在不涉及病人隐私及利益以及符合国务院颁布的《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》的前提下，样本和数据有可能用于非盈利目的的医学研究、科研课题申报及论著发表。
 - (8) 知情告知及拟开检查申请单的临床咨询医生、孕妇分别签字。
- 申请单和知情同意书参考模板见附录 1。

7.3.2 NIPS 筛查 pCNV 检测申请单：

申请单应涵盖但不限于以下内容：

- (1) 基本信息：医院抬头、受检者姓名、年龄、身高、体重、唯一识别号（如诊疗卡号）、联系电话、申请科室和医生、申请日期、样本类型、临床初步诊断（如有）等。
- (2) 妊娠信息：末次月经、孕周、妊娠方式等。
- (3) 病史信息：孕产史、既往史、不良孕产史、家族史等。
- (4) 辅助检查结果：胎儿数、双胎需明确绒毛膜性质、血清学筛查结果及夫妻双方染色体结果等。

8 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病标准化实验流程

开展 NIPS 筛查胎儿基因组病项目，需严格按国家卫生健康委员会办公厅，国卫办妇幼发【2016】45 号文件[4]和国卫办妇幼函【2019】847 号文件[29]要求开展。涉及第三方医学检验实验室的，应以产前诊断机构为核心，医学检验实验室受产前诊断机构委托，向产前诊断机构提供检测结果和技术支持，严格进行全流程管理和质量控制。

8.1 孕妇基本资料信息的采集

8.1.1 临床医生在与孕妇进行检测前咨询时，应明确孕妇或其丈夫本身是否存在基因组病或染色体病，是否属于不适用人群。

8.1.2 临床医生在检测前咨询并知情同意后，开具检测申请单时应依据申请单内容收集包括但不限于以下孕妇信息：孕妇姓名、年龄、临床检测指征、本次妊娠是否使用辅助生殖技术、孕产史、孕周、身高体重、既往史、不良孕产史、本次妊娠是单胎还是双胎、双胎的绒毛膜性质（单卵双胎/双卵双胎等）、超声信息（如有）、血清学筛查结果（如有）、夫妻双方染色体情况（如有）。对超过适宜孕周的孕妇且孕妇本人强烈要求强求进行 NIPS 筛查的，应签署补充知情同意书。

8.1.3 如超声提示胎儿具有明显的结构异常，应产前诊断[3,17,18]。

8.2 标本的采集

8.2.1 标本采集前信息核对

标本采集前必须对被采集人进行身份信息核对,采血管、送检单上贴上标本唯一条码,核查申请单、抽血条码、知情同意书有无孕妇签名等。

8.2.2 标本采集中的注意事项

- (1) 核查采血管类型,使用正确的采血管。
- (2) 核查采血管有无裂缝、是否在保质期内。
- (3) 粘贴标签时应使条码与采血管的管长平行,字母朝管口方向,不要完全包围环绕采血管而无法看到管内标本情况。
- (4) 粘贴条码时务必牢固,不会脱落。
- (5) 根据采血要求采集 5-10ml 左右孕妇外周血,采集标本后立刻缓慢颠倒混匀 5-10 次(根据不同采血管要求),置于室温或 4 度环境保存(根据不同采血管要求,见表二)。

表二: 标本采集及储存、运输要求

采血管类型	采血量	储存/运输条件	送检时间
EDTA 抗凝管	5mL	2~8℃	8h 内
血浆游离 DNA 专用采血管	5~10mL	室温 (6~35℃)	按说明书要求,一般不超过 96h

8.2.3 标本采集后的信息登记及再次核对

标本采集后,再次核对申请单、采血管上唯一条码,在登记本上登记被采血者信息及采血时间和标本的状态。

8.2.4 标本的交接

实验室应每天定时前往标本采集处接收标本,核对标本的状态(有无溶血、采血管有无裂痕、有无血液溢出等),核对采血管及申请单信息的唯一条码是否一致等,核对接收的标本数量,在交接本上签名并记录交接时间。

8.2.5 标本院内转送

与采血科室交接后,将标本置于牢固的运输盒内的试管架上,运输过程中保持标本直立。如对本标本有低温保存要求,在运输盒内可放置冰袋。接收标本后,尽快运回实验室。

8.2.6 标本从采血机构转送到产前诊断机构或第三方医学检验实验室

- (1) 为保证样本运输安全及防止温度的剧烈变化,对运送的包装盒建议用不易损坏的厚泡沫箱。
 - (2) 标本在运输过程中用气泡袋固定住,与送检单一起运输至检测实验室。
 - (3) 运送过程中保证合适的温度及保持温度稳定。
 - (4) 控制运输的时效性。
- 标本的运输条件等见表三。

表三: 样本运输条件分类表

样本类型	采血管	运输前处理	运输条件
全血	EDTA 抗凝管	暂存 4℃ 保存	8 小时内 4℃ 运输

	血浆游离 DNA 专用采血管	常温（6-35℃）保存	96 小时内常温运输
血浆	按要求分装在 2 mL 离心管中	一周内-20℃暂存，避免反复冻融	干冰运输

8.2.7 拒收或重新抽取标本

标本接收时如果发现标本存在溶血、脂血或血液凝固、采血管出现裂痕、采血管出现血污、标本量不能达到实验要求（外周血量不少于 5 ml）、标本接收时已超过标本保存有效期、未按温度等要求保存和运输标本、标本信息与申请单唯一条码不符等情况时，以及存在影响检测结果的重要信息不完善，如孕妇的孕周、是否是肿瘤患者、是否接受过异体输血等信息不完善且无法联系到孕妇获取信息的，实验室可以拒绝接收标本。

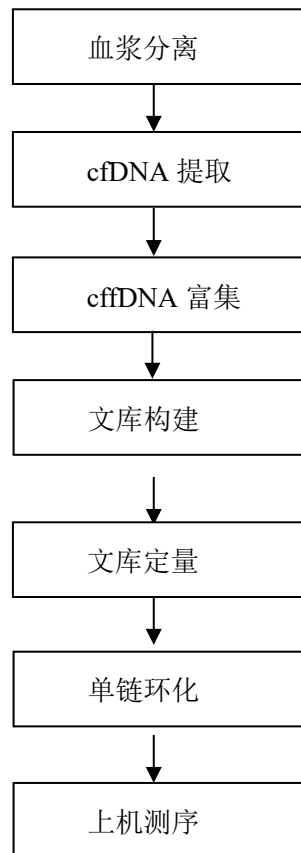
8.2.8 实验室确认接收标本

实验室对确认合格的标本签字接收，按实验流程做好接收标本的再次核对。

8.3 实验室检测的关键步骤及注意事项

8.3.1 基于纳米球测序技术的关键实验步骤及注意事项

(1) 关键实验步骤（流程如下图）



(2) 关键步骤注意事项

① 血浆分离。在血浆分离之前，先确认样本管完好、样本无渗漏，如果出现样本管破损、样本渗

漏，不能进行血浆分离。离心是关键环节，应注意离心机需要先预冷至 2℃-8℃，离心之后应对样本是否发生溶、凝血进行判断，重度溶血及凝血样本不能进入下一步检测环节。吸取血浆过程中应注意不能吸到中间层的白细胞及红细胞，如果不慎吸到细胞成分，应将吸取的血浆重新置回管中，重新离心后再进行血浆分离。血浆分离之后应立即用于 cfDNA 提取，或置于-20℃中暂存。血浆长期保存条件为-80℃。

② cfDNA 提取。cfDNA 提取的血浆起始量不低于 200 μl。提取磁珠使用前需平衡至室温。提取后的 cfDNA 样本需于 2℃-8℃ 保存并在 7 天内进行处理，-20℃±5℃ 条件下可冷冻保存 3 年。于-20℃±5℃ 条件下低温运输不超过 7 天，提取后 cfDNA 样本冻融次数不超过 5 次。

③ cfDNA 富集。富集磁珠在使用前需平衡至室温。

④ 文库构建。孕妇外周血浆中 cfDNA 的含量较低，低血浆量提取的 cfDNA 需要进行 PCR 扩增。扩增循环数不低于 12 个循环（未富集）或 17 个循环（富集）。

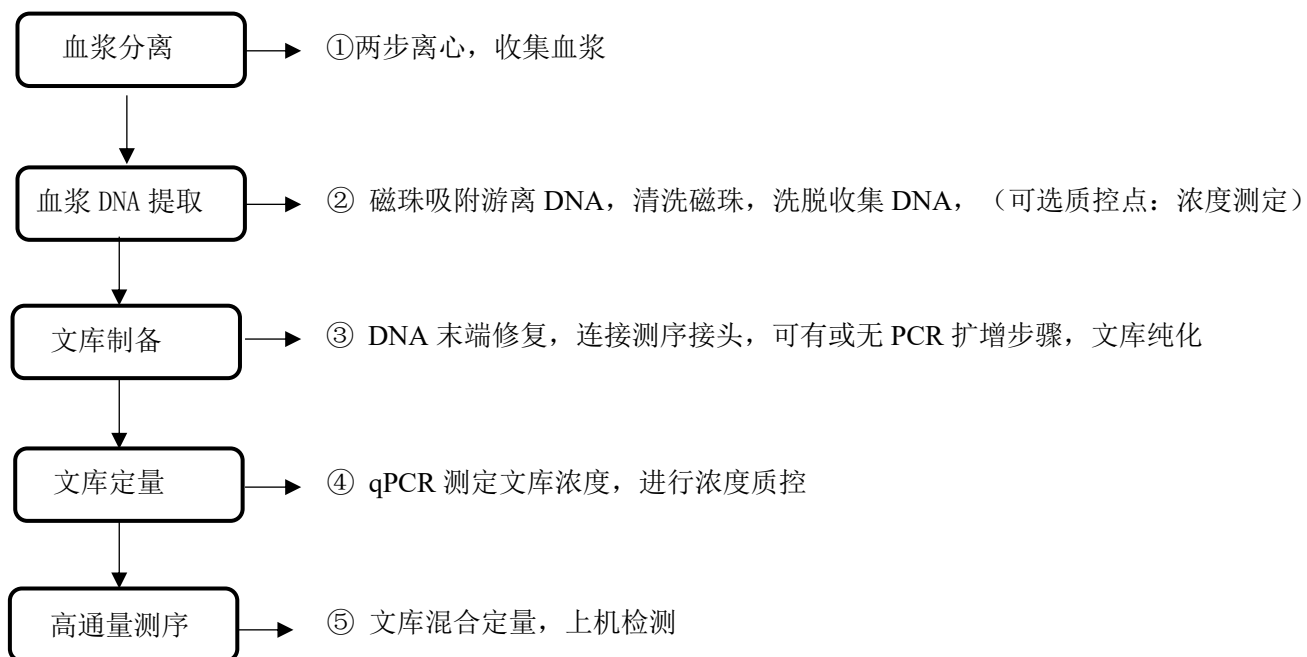
⑤ 文库定量。文库构建完成后进行文库定量，文库定量浓度要求大于等于 2ng/μl，空白质控浓度小于 0.6 ng/μl。

⑥ 单链环化。在上机前需要进行单链环化，单链环化完成后进行制备 DNA 纳米球（DNB）浓度需要大于等于 8 ng/μl。

⑦ 上机测序。上机测序的策略为单端测序，测序 reads 长度为 35 bp。

8.3.2 基于边合成边测序技术的关键实验步骤及注意事项

(1) 关键实验步骤（流程如下图）



(2) 关键步骤注意事项

① 血浆分离过程应注意吸取血浆时不要吸到白细胞；分离后的血浆肉眼观察应为淡黄色，严重凝血、溶血样本应反馈重新采血。

② 血浆 DNA 提取过程应注意磁珠使用前需平衡至室温；吸弃上清时应注意不要吸到磁珠；提取后的游离 DNA 应为无色透明状液体，无肉眼可见的固体悬浮物或沉淀物。孕妇外周血浆中 cfDNA 的含量较低，一般难以检测提取产量。当样本起始用量较多（不少于 600ul）时，可对提取产物浓度进行检测质控。1.2ml 血浆提取后 42ul 洗脱液 DNA 浓度检测值范围应为 0.05-0.7ng/μL，若浓度不在该范围内，则再次提取，2 次提取均不符合标准，需重新采血。

③ 文库的制备过程中，磁珠使用前需平衡至室温；纯化时磁珠的加入量需特别准确；所有步骤中

室温孵育时间均为 10 分钟，确保DNA与磁珠的结合。PCR仪运行过程需注意盖紧热盖；酒精晾干需达到磁珠表面出现磨砂形态且孔内其他位置无明显液体残留。对样本起始量较低或经富集筛选后的样本，可选择进行PCR扩增，获得足够的文库产物进行后续测序检测。

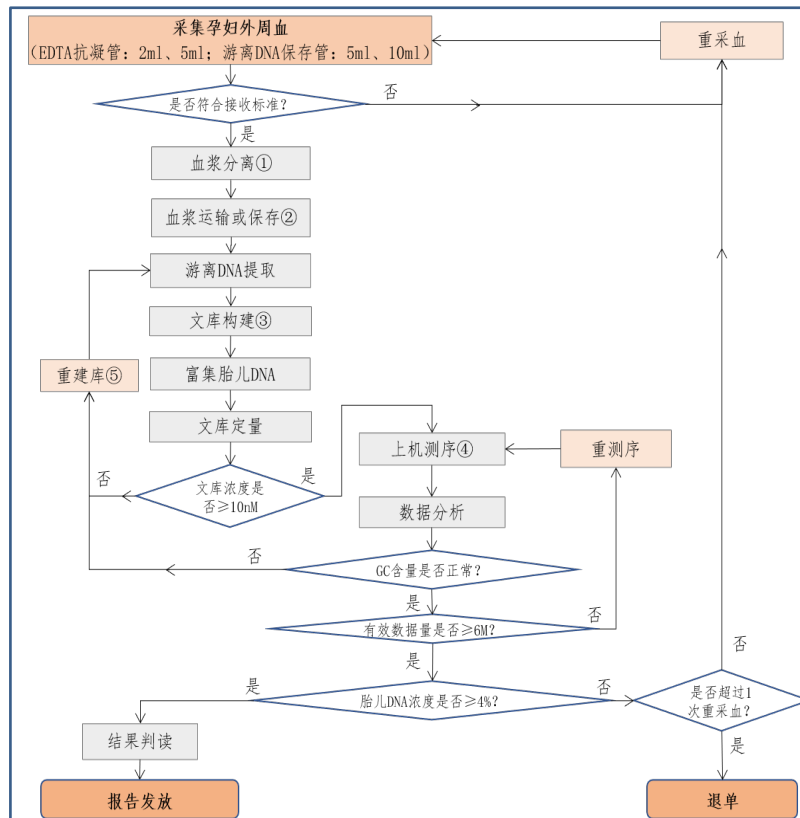
④ 文库定量结果浓度应 ≥ 20 pM，荧光定量PCR溶解曲线无双峰。

⑤ 文库pooling过程需要按照等物质质量混样规则计算各文库的pooling体积，Pooling结束后需测定混合文库浓度，测定浓度与理论浓度差异不得大于 20%，否则重新进行文库pooling。

⑥ 文库上机策略可采用单端或双端测序。

8.3.3 基于半导体测序技术的关键实验步骤及注意事项

(1) 关键实验步骤（流程如下图）



(2) 关键步骤注意事项

① 血浆分离过程中须严格核对样本编号、确保编号唯一，避免样本混淆。

② 运送过程中保证合适的温度及保持温度稳定。

③ 文库构建过程加入唯一标识的特异性序列标签时注意核对，以免因加错标签导致样本混淆。

④ 在导入样本编号时注意标签与样本编号一一对应。

⑤ 对于非人为失误导致重建库 2 次依然不满足文库浓度质控要求的情况，建议进行退单处理或与孕妇沟通后重采血处理，以免耽误孕妇接受产前诊断的时间。

8.4 关键实验步骤 SOP 和记录

8.4.1 NIPS 筛查基因组病实验室关键步骤的 SOP 建议应包括不限于以下

序号	实验环节	SOP 文件名称	记录表格
1	样本采集	NIPS 检测项目样本采集标准操作规程	样本采集记录表
2	样本转送	NIPS 检测项目样本转送流程标准操作规程	标本转送流程记录表
3	样本接收	NIPS 检测项目样本接收标准操作规程	样本接收检查表 不合格样本记录及标本拒收回执单
4	血浆分离	NIPS 血浆分离操作标准操作规程	血浆分离记录表
5	血浆保存	NIPS 血浆保存标准操作规程	血浆保存记录表
6	游离 DNA 提取	NIPS 检测项目游离 DNA 提取标准操作规程	血浆游离 DNA 提取记录表
7	文库构建	NIPS 文库构建标准操作规程	文库构建记录表
8	文库质控	NIPS 检测项目文库检测判定标准操作规程	文库定量记录表
9	上机测序	NIPS 上机标准操作规程	测序实验记录表 室内质控记录表、失控记录分析表
10	数据分析	NIPS 数据分析及审核标准操作规程 NIPS 数据生物信息分析标准作业指导书	NIPS 数据分析、审核记录表
11	报告发放	报告发放标准作业指导书	报告发放登记表 高风险报告发放、异常情况登记表
12	随访及总结	随访标准操作规程 实验室质量控制程序文件	随访登记表 季度、年度分析记录表 假阳性、假阴性样本记录、分析表
13	孕妇及数据信息的保密与安全	孕妇信息及数据信息安全程序文件	信息安全、数据安全记录表
14	标本的销毁	标本销毁的标准操作规程	标本销毁审批表及记录表

主要步骤记录表格参考模板见附录 7-附录 14。

9 基于 NIPS 筛查胎儿基因组病的质量控制

9.1 NIPS 筛查胎儿基因组病的质量控制指标

9.1.1 对 21、18、13 三体的各项质控指标参考国卫办妇幼发【2016】45 号文件。

9.1.2 目标基因组病的复合检出率不低于 70%。

9.1.3 假阳性率：pCNV 的假阳性率不高于 0.5%。

9.1.4 阳性预测值：总体 pCNV 的复合 PPV 不低于 30%。

9.1.5 检测失败率不超过 5%。

9.2 室内质控

9.2.1 质量控制要求

(1) 检测前质量控制

① 制定送样手册，向客户提供详尽的受检者标准，包括：适用人群、慎用人群以及不适用人群。样本采集要求，包括被采血者准备、识别、采集方法、采样耗材、采血人员、样本采集后处理、样本运输方式、生物安全防护措施以及样本收录标准等。指导医务工作人员按要求采集合格的原始样本，规范样本采集全过程。

② 样本采集。必须保证样本信息准确性和样本保存完整性。样本采集要求包括采集方法、样本采集后处理、样本运输方式、生物安全防护措施等，规范样本采集全过程。

③ 样本运输。根据样本运输要求，采用规定的外包装样式，使得样本运输达到规定标准，处于受控状态，并符合相关法规及生物安全要求。

④ 样本接收。样本到达实验室后，与样本接收人员进行样本交接，检查样本数量、核查样本状态，发现样本质量问题（样本标识不清；抗凝管/剂使用不正确；采血量不足；严重溶血或有血凝块；采血管破裂及开盖；样本未按照规定保持及运输；受检信息不完善或受检者不符合本实验检测要求等）立即反馈，并将每个样本信息录入到信息系统。每个样本在实验室流转中，采用唯一的条形码进行识别和区分，最大限度避免样本的混淆和保护客户或患者的个人信息。

(2) 检测中质量控制

实验过程中，需要达到各项质控指标要求及检测参数要求的数值，低于质控指标值应停止或重新实验（参见 9.2.3 部分）。

(3) 检测后质量控制

所有实验结果数据的分析均采用双人复核，然后由专人负责审核出报告（报告需由副高以上职称并具备产前诊断资质的临床医师签名发放），采用“双人复核+专人审核”的机制，确保每个检测结果的正确性。保证提供报告结果 100%与检测结果一致，就诊者信息 100%与临床信息一致，所有的报告在信息系统或者原始记录中均可查询。

9.2.2 室内质控品的制备

(1) 质控品用于实验过程中的质量控制，阳性质控品包括试剂盒检测范围内的 2 种染色体变异类型，即染色体数目异常（非整倍体）和染色体结构异常（微缺失/微重复）。可以适当考虑在每批检测过程中插入 2%的重复样本用来监测重复性。

(2) 质控品由试剂生产企业提供，建议从游离DNA提取开始到上机测序数据分析进行全流程覆盖的质量控制。

(3) 每次上机测序需同时进行阳性质控、阴性质控、空白质控品同步检测，对 10 种目标疾病pCNV可每次选择一种pCNV质控品检测。

9.2.3 室内质控具体参数指标

	技术平台	具体参数	参数不达标的处理情况	备注
文库	纳米球测序平台	2 ng/uL	重建库	/
	边合成边测序平台	文库浓度应 ≥ 20 pM, qPCR溶解曲线无双峰	浓度或峰图不达标均进行重建库	/
	半导体测序平台	≥ 10 nM	重建库，若仍不合格，建议重抽血；重抽血后样本如两次建库仍不合格，退费	/
胎儿游离DNA浓度	纳米球测序平台	$\geq 3.5\%$	重抽血或退费	有富集步骤
	边合成边测序平台	$\geq 4\%$	重建库或重抽血，如果重抽	有富集步骤

	台		血仍不合格则建议退费	
	半导体测序平台	≥4%	重抽血。如果重抽血仍不合格则建议退费	有富集步骤
测序数据量	纳米球测序平台	唯一比对序列数 ≥10 M	重建库/重测序	
	边合成边测序平台	唯一比对序列数 ≥10M	有效数据量不足进行重建库或重上机	唯一比对序列数≥7M (双端测序) 唯一比对序列数≥6M (基于胎儿富集PCR 建库法)
	半导体测序平台	唯一比对序列数 ≥6M	重测序	样本富集的胎儿 DNA 浓度大于 20%时,有效 数据量可适当降低为 ≥3.5M。
GC含量	纳米球测序平台	38%-42%	重建库/重测序	/
	边合成边测序平台	37%-42%	如果超出范围进行重建库或重上机	PCR-free 建库法 GC 为非评估指标
	半导体测序平台	38%-45%	重建库, 如仍不合格, 建议重抽血; 重抽血后样本如两次建库仍不合格, 退费	/
Q20/Q30	纳米球测序平台	Q30>80%	重建库/重测序	/
	边合成边测序平台	Q30>85%	重建库/重测序	
	半导体测序平台	Q20>50%	重建库/重测序	测序读长平均大于 100bp
阳性质控品	纳米球测序平台	目标疾病及 pCNV 检测结果 为阳性	实验重做/更换质控品。两次 复检质控品均不通过暂停实 验, 排查原因	/
	边合成边测序平台			
	半导体测序平台			
阴性/空白质控品	纳米球测序平台	目标染色体检测 结果为阴性, 空 白质控阴性	阳性样本全部复检, 更换质 控品。排查原因	/
	边合成边测序平台			
	半导体测序平台			

9.3 室间质评或实验室间的能力验证

9.3.1 开展 NIPS 筛查胎儿基因组病的产前诊断机构及第三方医学检验实验室必须每年度参加国家卫生健康委临床检验中心组织的室间质评, 成绩满意。

9.3.2 国家卫生健康委临床检验中心暂未开设本项目的室间质评时, 应开展对 NIPS 筛查胎儿基因组病的实验室间能力验证, 实验室应制订年度能力验证计划、SOP 等。

9.3.3 开展实验室间能力验证的质控品准备、运输, 结果比对及能力验证评估

- (1) 建议同城市内两家医院开展能力验证, 由发起方实验室负责质控品的准备。
- (2) 质控标本由专人负责冷链运送到待比对实验室。

(3) 待比对实验室接收标本，安排比对实验。

(4) 双方实验室进行比对结果，进行能力验证。

(5) 建议进行能力验证的产前诊断机构或第三方医学检验实验室开展NIPS筛查胎儿基因组病项目的全流程比对，包括对结果的分析 and 报告的撰写，报告应包括但不限于以下：标本胎儿游离DNA浓度、Z值、检测出pCNV的染色体位置、大小及对pCNV的解读等。

(6) 比对结果存在差异时进行原因分析。

9.4 季度性数据及验证结果的统计及分析

9.4.1 对行 NIPS 筛查胎儿基因组病检测的数据及随访结果建议在每年 3 月底、6 月底、9 月底和 12 月底进行季度数据统计和分析。

9.4.2 对检测数据的统计和分析

(1) 统计一个季度内的检测标本例数、目标疾病的阳性检出例数、确诊例数以及报告时效性等。按以下检测指征统计：

- ① 高龄妊娠（ ≥ 35 岁）。
- ② 血清学筛查高风险/临界风险。
- ③ 超声软指标异常。
- ④ 双胎/IVF-ET妊娠。
- ⑤ 错过其他筛查时机。
- ⑥ 自愿要求。
- ⑦ 介入性手术禁忌症。
- ⑧ 其他。

(2) 结合随访结果，分析季度性及年度数据

① 以四格表格式统计季度性目标疾病检出率、阳性预测值、阴性预测值、假阳性率、失败率等指标。

② 以年度为单位，统计目标疾病的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、复合阳性预测值、复合阴性预测值、假阳性率、失败率等指标。

③ 对各数据值的总结分析。

④ 对验证阳性结果、特别是外显不全pCNV的胎儿表型追踪随访及妊娠结局随访。

⑤ 对假阳性/假阴性结果的验证分析（见 9.5）。

⑥ 对检测失败标本的追踪随访及原因分析（见 9.6）。

9.5 假阳性和假阴性结果分析

9.5.1 对假阳/假阴性结果的回顾性分析

(1) 假阳性/假阴性结果原因：除了人为实验错误导致假阳性/假阴性结果外，NIPS由于技术局限性，检测的物质来源于胎盘游离DNA，可由于以下常见原因导致假阳性/假阴性结果：限制性胎盘嵌合体（CPM），即胎儿、胎盘DNA不一致；双胎之一早期消失或停止发育；孕妇自身染色体异常或自身疾病，例如恶性肿瘤或多发性子宫肌瘤等。假阴性结果还与胎儿游离DNA浓度低相关。假阳性结果一般通过介入性产前诊断即可明确诊断。一旦明确为假阳性结果建议结合检测分娩后胎盘组织、脐带血以及孕妇外周血细胞排查导致假阳性的原因。对假阴性结果，需进行详细原因分析并撰写分析报告。

(2) 对假阳/假阴性结果的复核和分析包括但不限于以下（图一、图二）

① 对假阳/假阴性标本的原始申请单、原始采血管、分装的血浆管、文库等原始标本信息溯源核对。

- ② 对留存血浆标本的再次验证。与孕妇外周血DNA进行个体识别，排除标本错误可能。
- ③ 假阳性/假阴标本胎儿游离DNA浓度。
- ④ 假阳性/假阴pCNV片段大小，羊水或外周血pCNV是否存在嵌合。
- ⑤ 假阳性/假阴标本的数据有效测序深度。
- ⑥ 假阳性/假阴标本的GC含量。
- ⑦ 母体CNV、肿瘤、自身疾病的影响。
- ⑧ 是否二胎之一停育。
- ⑨ 有无外源性输血、干细胞治疗等。

对假阳性、假阴性结果，应尽可能取得胎盘或脐血标本进行查因。撰写假阴性病例分析报告，实验室进行PDCA总结分析。

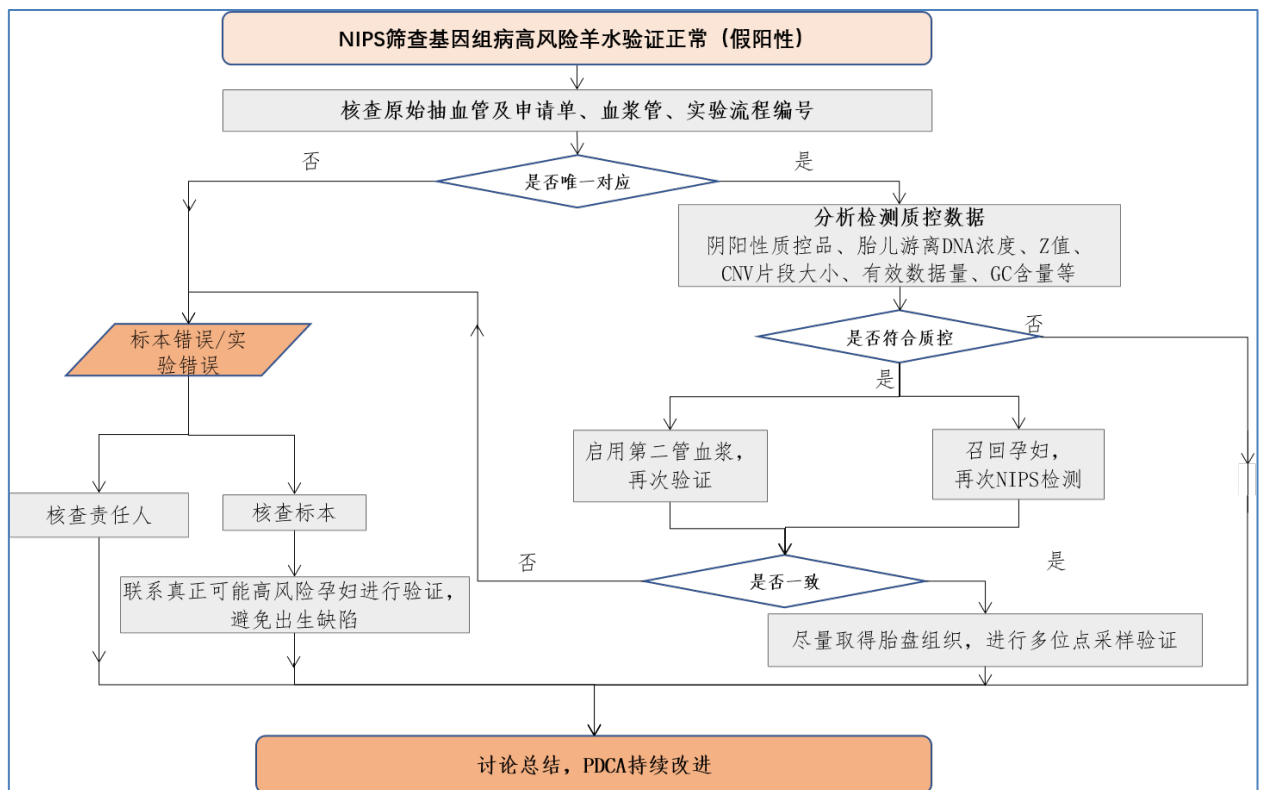


图1 假阳性原因分析流程

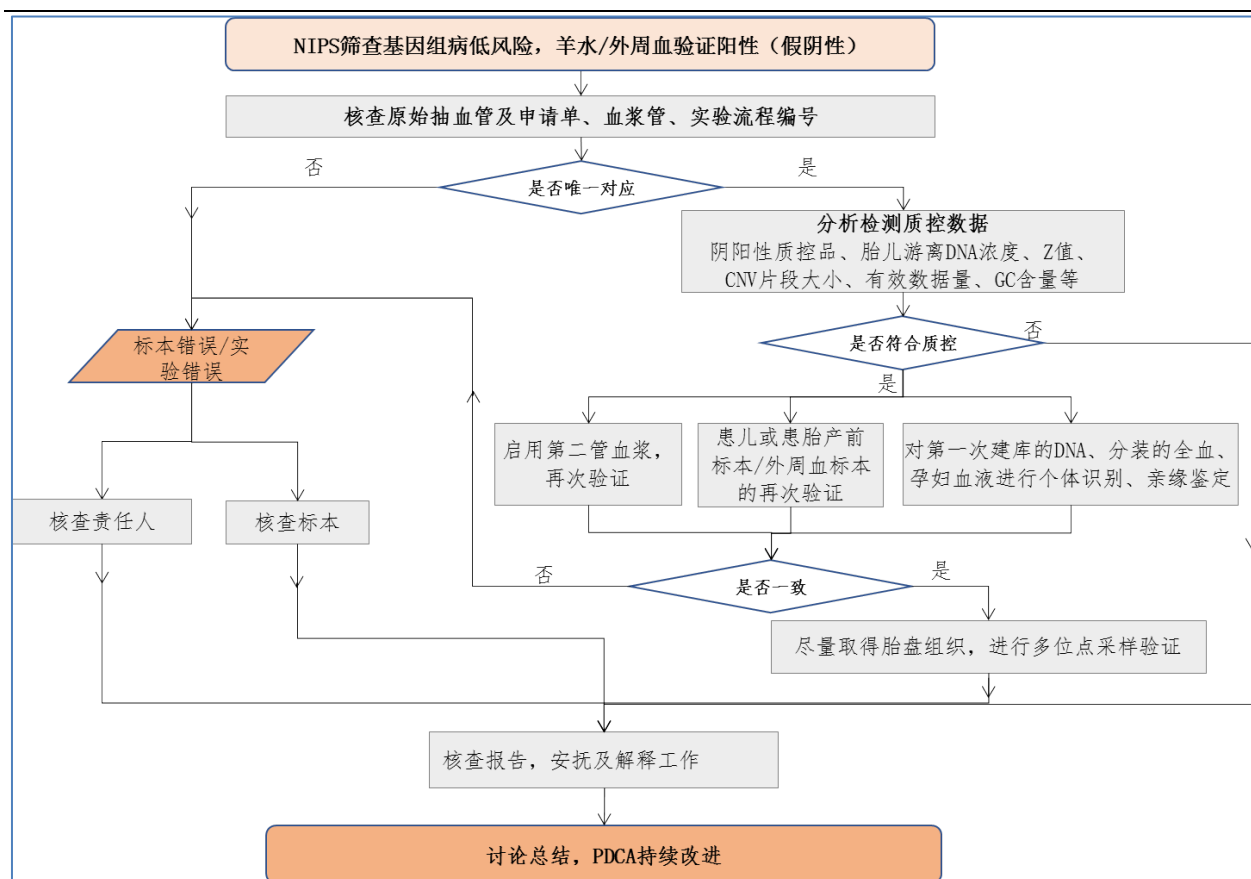


图2 假阴性原因分析流程

9.5.2 假阳性、假阴性结果进行胎盘验证的标本采集及检测要点

(1) 标本取样要求：胎盘的胎儿面和母体面对称位置分别在一定位置表层获取 2 个黄豆大小的胎盘组织（如图 3 示例）用少量生理盐水洗净母血，分别按标注置于对应的 2.0 ml 无菌 EP 管中。

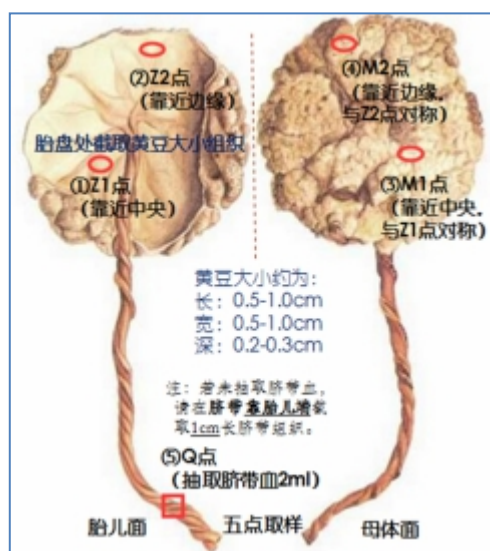


图3 胎盘采集示意图

(2) 标本采集方法

① 选择自然流产/引产/正常分娩的胎盘，以脐带为中心点，分别在胎盘母面、胎儿面的中心和边缘

各取 2 份组织（也可在中心、中段和边缘分别取 3 份组织）；在近胎盘端采集 1 份脐带组织。

② 共采集 5 份组织标本，每份含有约黄豆大小的绒毛组织（长 0.5-1.0cm，宽 0.5-1.0cm，深 0.2-0.3cm），须在管壁上做好“母面-中心”、“母面-边缘”、“胎儿面-中心”、“胎儿面-边缘”、“脐带”的相应采样位点标记。

③ 用少量生理盐水洗净母血，若采用不含组织保护液的保存管，将样本直接放入管内，盖好管盖，将管子放进密封袋，封好密封袋后干冰运输；若采用含有组织保护液的保存管，样品放入样品管后，旋紧管盖，颠倒 2 次，检查管盖密封良好，且保证样本浸没在保存液中或组织表面完全被保护液湿润，装入密封袋并密封。

④ 如有胎儿脐带血及夫妻双方外周血，各 2 ml 分别置于 3 支 EDTA 管内（即查血常规的紫头管）。

(3) 标本保存运输：上述样本均置于 -30℃~-10℃ 冰箱保存；如果采用含有组织保护液的保存管采集的组织则放置在 2~8℃ 的冰箱保存。夏季（或室外温度超过 30℃）冰袋运输，其他季节可常温运输。

(4) 标本采集注意事项

① 采样位置为表层，以免采样样本出现胎儿面和母体面组织的交叉混合。

② 中段位置为中心和边缘两者中间的位置。如有采中段位置，须在管壁上做好“母面-中段”、“胎儿面-中段”。

③ 在胎盘母面、胎儿面和近胎盘端脐带处采集的 5 份胎盘组织须做好相应位点采样标记，以便分析结果。

④ 运输样本时须做好缓冲装置，避免样本管被冰袋或干冰冰块击碎；对于干冰运输的样本，确保样本送达时有干冰剩余，对于有组织保护液的样本，确保样本 5 天内到达实验室。

9.5.3 假阳性/假阴性的标本、记录保存要求

(1) 假阳性标本、记录保存要求

① 假阳性标本：包括孕妇外周血血浆样本、外周血细胞、脐带血或胎盘组织标本，按照国家 NIPS 技术规范保存不少于 3 年。

② 假阳性记录保存要求：包括孕妇申请单和知情同意书、相关实验记录等，按照国家 NIPS 技术规范保存不少于 3 年。

(2) 假阴性标本、记录保存要求

① 假阴性标本：包括孕妇外周血血浆样本、外周血细胞、患儿产前诊断（绒毛/羊水/脐血）标本或患儿外周血样本、胎盘组织标本等，建议长期保存。

② 假阴性记录保存要求：包括孕妇申请单和知情同意书、相关实验记录、假阴性病例分析报告等，建议长期保存。

9.6 对检测失败标本的季度性数据分析及随访结果汇总

(1) 检测失败原因的分析包括但不限于以下

① 胎儿游离 DNA 浓度。

② 有效测序数据量。

③ Z 值灰区（若有）。

④ GC 含量。

⑤ 孕妇自身原因（如妊娠年龄、孕周、BMI 指数、有无肝素治疗等）。

⑥ 其他可能导致检测失败的原因分析。

(2) 对检测失败标本的季度性数据统计

按 9.4.2 检测指征分别统计检测失败标本数，并登记失败原因。

(3) 对检测失败标本的随访

① NIPS 检测失败后孕妇进行产前诊断的率。

② 产前遗传诊断的方法，产前诊断结果。

- ③ 产前诊断异常率。
- ④ pCNV的占比。
- ⑤ 妊娠结局。
- ⑥ 失访或拒访、拒绝产前诊断原因。

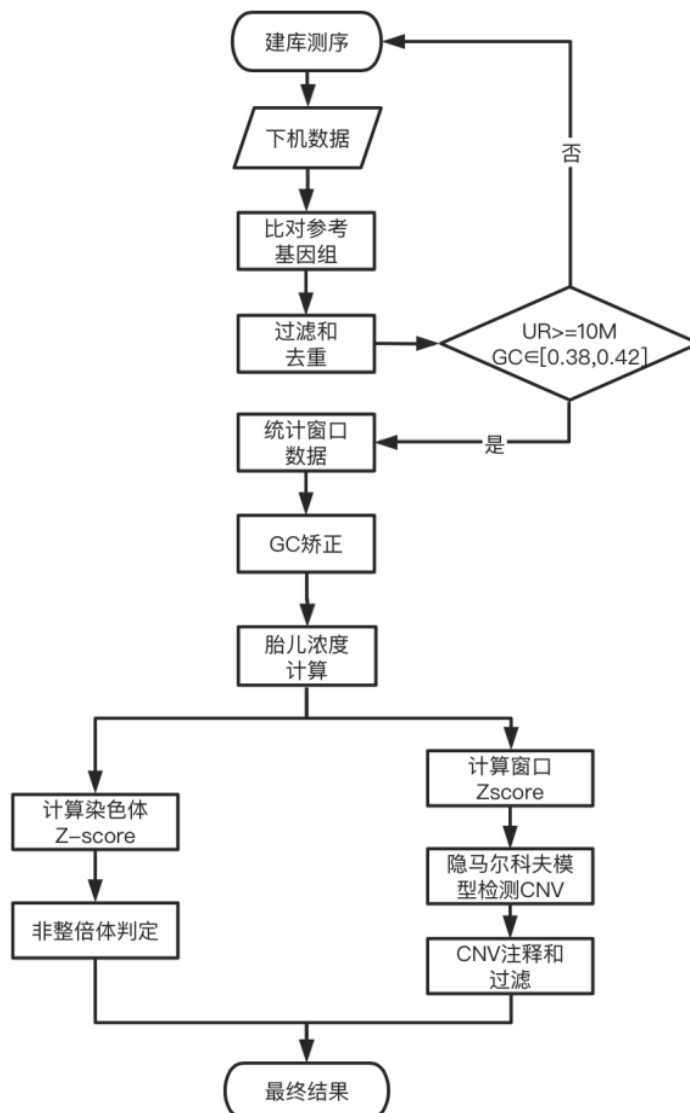
10 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查的数据分析及技术参数标准

10.1 数据分析流程

10.1.1 纳米球测序平台

NIPS下机数据分析前应当检查完善运行环境和必备数据库，以纳米球测序技术平台为例，应当在数据分析前具备完整的运行环境，如Linux操作系统、比对软件、参考基因组、注释数据库等，各个软件和数据库应当备注版本号和日期。

从下机数据开始，使用比对软件将测序数据比对到参考基因组；对比对后的文件进行过滤，去除非唯一比对和重复序列；统计基因组窗口的序列数并进行GC校正；检测染色体非整倍体异常和染色体拷贝数变异。分析流程简图如下：



(1) 序列对比和过滤

通过BWA软件将测序数据回帖至人类参考基因组（GRCh37/hg19），去除重复序列，保留唯一比对到基因组的序列（Unique Reads，简称UR）。

(2) GC含量与有效数据量的矫正

利用hg19的信息，按照一定长度(如 20Kb,60Kb, 100Kb)对整个基因组上的每条染色体划分相邻的窗口，窗口之间无覆盖；计算UR落在每个窗口中的数量(记作UR_o)、序列GC含量(记作GC_o)以及hg19在每个窗口上的GC含量(记作GC_r)。

对于每个样品，选择染色体上所有窗口，利用其UR_o与GC_r作三次样条插值拟合得到关系式： $\widehat{UR} = f(GC_r)$ ；由此关系式可以得到染色体每个窗口的UR拟合值 \widehat{UR} ，记染色体所有窗口的UR均值为 \overline{UR} ，则染色体上每个窗口的UR修正值 $UR_a = UR_o * (\overline{UR} / \widehat{UR})$ ；接着对染色体上每个窗口计算比率 $R = UR_a / \overline{UR}_a$ ， \overline{UR}_a 为染色体上所有窗口UR修正值的均值。

(3) 胎儿游离DNA浓度的判定（仅用于胎儿浓度计算，性别信息会进行屏蔽）

男胎的胎儿浓度可以通过Y染色体的占比来确定，Y染色体的窗口UR均值除以染色体的UR均值，再乘以2即为男胎的胎儿浓度。女胎的胎儿浓度可以通过利用胎儿游离DNA在基因组上的非均匀分布建立一个高维回归模型来进行估算。首先使用男胎的Y染色体方法估计的胎儿浓度作为训练模型的输入，利用神经网络机器学习的方法构建出回归模型，具体如下：

$$z_j^l = f\left(\sum_k w_{jk}^l z_k^{l-1} + b_j^l\right)$$

其中 l 为网络的层的序号，第一层为输入层，最后一层为输出层（只有一个神经元），中间为隐藏层。 z_j^l 为第 l 层第 j 个神经元的数值， z_k^{l-1} 为第 $l-1$ 层第 k 个神经元的数值， w_{jk}^l 为第 $l-1$ 层第 k 个神经元到第 l 层第 j 个神经元的连接权重， b_j^l 为第 l 层第 j 个神经元的输入偏差。函数 f 的最常用形式为 rectified linear unit，亦即 $f(x) = \max(0, x)$ 。 w 与 b 在训练模型时得到。应用模型时，按照以上公式逐层计算神经元的数值，最后一层的神经元数值即为胎儿浓度模型预测值。

(4) 非整倍体异常的分析

落在常染色体每个窗口的唯一比对序列数 UR 服从二项分布(窗口数较大时近似于泊松分布或正态分布)，对于正常样本，每个窗口的分布是没有差别的，对于异常样本则存在微小的差异（受胎儿浓度影响，胎儿浓度越大差异越大），利用 Z 检验即可判断出一定胎儿浓度下的胎儿染色体非整倍体异常。

(5) 性染色体异常的分析

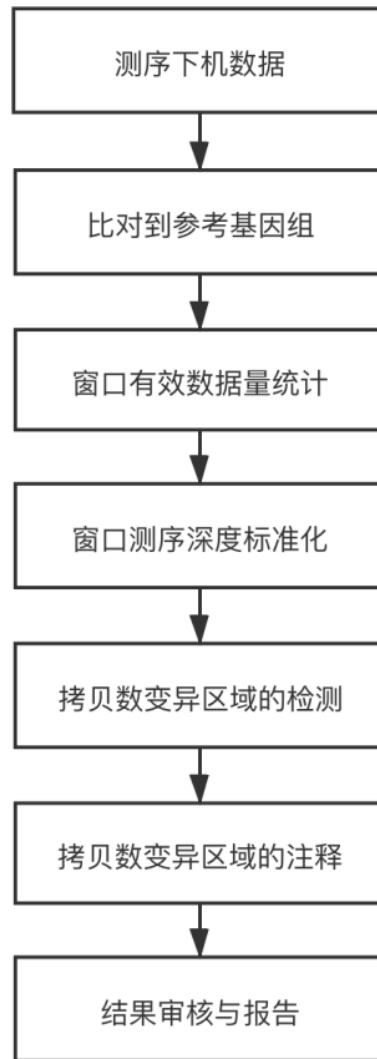
通过 X 和 Y 染色体的 UR 平均值与常染色体的 UR 均值的比较计算可以得到 X 和 Y 染色体的浓度值，比较两者的关系可以判定出 45, X(特纳氏综合征)、47, XXY(克氏综合征)。

(6) CNV 疾病分析

将检测样本的窗口 UR 值与正常对照样本的窗口 UR 进行主成分分析（PCA）去除噪音，计算每个窗口的 Z-score，使用隐马尔科夫模型（HMM）检测是否存在拷贝数异常（CNV）以及 CNV 的边界。将鉴定得到的 CNV 与已知的致病 CNV 疾病库作比较，最终判定是否为阳性检出。

10.1.2 边合成边测序技术平台

数据分析流程简图如下



(1) 测序数据的序列比对

将测序数据比对到参考基因组，保留唯一比对序列用于后续的分析。

(2) 窗口有效数据量统计

按照一定长度(如 20K、60K、100K)对整个基因组上的每条染色体划分相邻的窗口，窗口之间无覆盖，计算每个窗口的唯一比对序列数目（有效数据量）。

(3) 样本数据质控

根据游离 DNA 的唯一比对序列数目计算样本的有效数据量和胎源 DNA 比例。如果样本的有效数据量或测序 Q30 比例未达到质控指标，需要重新测序。如果样本胎源 DNA 比例未达到质控指标，需要重新采血建库。

(4) 窗口测序深度标准化

对每个窗口的测序深度进行归一化，消除下机数据量不同造成的影响。对每个窗口的归一化深度进行标准化，得出每个窗口的 Z 值。Z 值的计算方法为：

$$Z = \frac{RD_{sample} - \overline{RD}_{reference}}{SD(RD_{reference})}$$

(5) 拷贝数变异区域的检测

得到每个窗口的标准化 Z 值之后，使用信号处理方法平滑噪音，检出潜在拷贝数变异区域。对变异

类型相同的相邻潜在变异区域进行合并，并重新计算合并后区域的 Z 值。

对潜在拷贝数变异区域，根据其区域所覆盖窗口数量，及比对序列数波动情况，计算出该潜在变异区域的变异结果为阴性的 Z 值置信区间。如果该潜在变异区域的 Z 值处于置信区间之外，则保留该拷贝数变异区域。

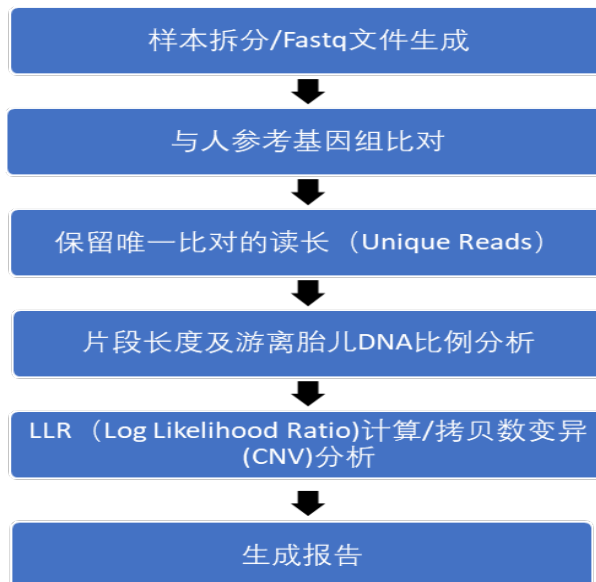
(6) 染色体变异（非整倍体和 CNV）的注释和报出

使用拷贝数变异分级解读流程，注释拷贝数变异与染色体疾病的关系，最后报出染色体非整倍体和大片段缺失/重复综合征相关变异。

对于性染色体非整倍体情况，将 22 条常染色体的唯一比对序列数与 X 染色体的唯一比对序列数相除，可得出 22 个比值，通过线性回归模型计算出胎源 DNA 百分比预测值 FF_{xr}；将 22 条常染色体的唯一比对序列数与 Y 染色体的唯一比对序列数相除，可得出 22 个比值，通过线性回归模型计算出胎源 DNA 百分比预测值 FF_{yr}。使用 FF_{xr} 和 FF_{yr} 这两个数值，判定样本是否出现特纳氏综合征或克氏综合征。

(7) 基于双端测序，结合游离 DNA 片段大小信息的分析方法

基于双端测序结合游离 DNA 片段大小进行数据分析的流程简图如下



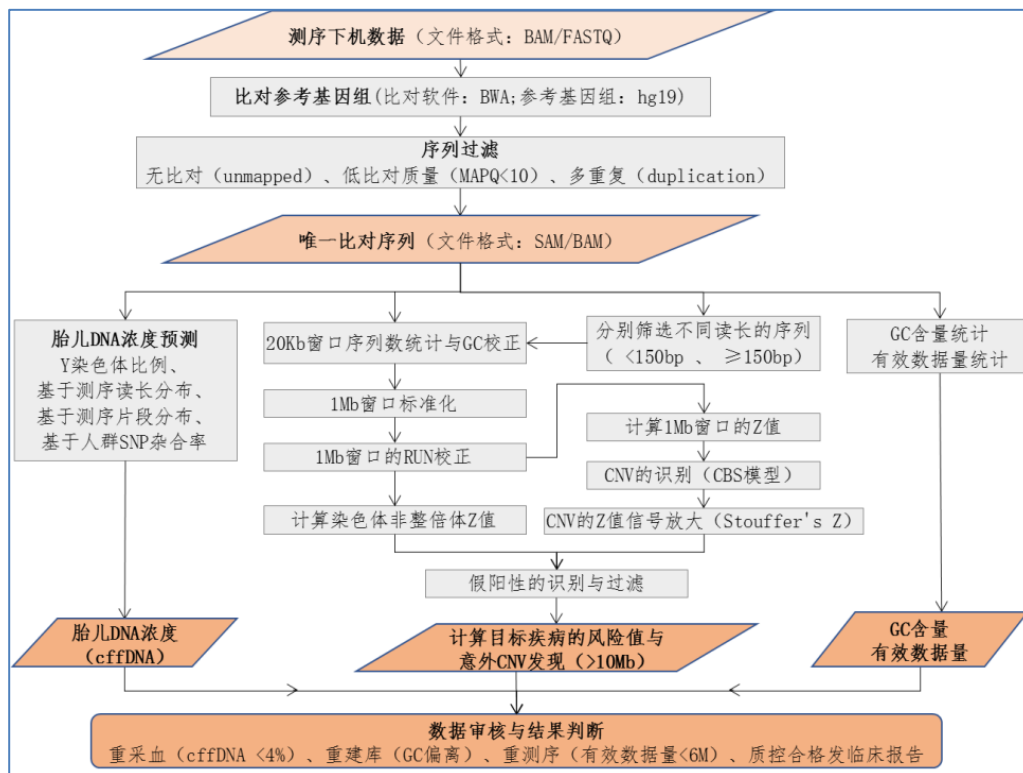
全基因组范围内的双端测序数据在和人类参考基因组比对并且去冗余后，得到的唯一比对序列以 100kb 为窗口单元 (bins) 进行计数，并结合区间 GC 含量和深度进行归一标准化处理，生成类似 Z 值的标准染色体值 (normalized chromosome value, NCV)。因为采用双端测序策略，能够通过分析血浆游离 DNA 片段大小分布，结合母体和胎儿游离 DNA 测序深度，准确计算出胎儿游离 DNA 百分比 (浓度) [30]。

通过整合胎儿游离 DNA 浓度、总体和短片段 (更可能源于胚胎) 的 NCV 值以及样本的测序深度信息，计算出 Log Likelihood Ratio (LLR) 值。如下图公式所示，T_{short}, T_{long} 代表依据 NCV 数值的染色体非整倍体打分，ff_{est} 代表胎儿游离 DNA 浓度，q(ff_{total}) 代表胎儿游离 DNA 浓度密度分布 (通过训练集数据对胎儿浓度校正，以降低误差)。通过此分析方法获得每条染色体的 LLR 值，在全基因组层面进行分析和评价。

$$LLR = \frac{\sum_{ff_{total}} q(ff_{total}) * p_1(T_{short}, T_{long} | ff_{est})}{p_0(T_{short}, T_{long})}$$

10.1.3 半导体测序技术平台；

半导体高通量测序平台测序时在半导体芯片的微孔中固定 DNA 链，DNA 聚合酶以该单链 DNA 为模板，按碱基互补原理，合成互补的 DNA 链，DNA 链每延伸一个碱基时，就会释放一个质子，导致局部 pH 变化，系统检测 pH 变化，将化学信号转换成数字信号，达到实时判读碱基。通过对所有测序信号的分析，实现对 DNA 序列片段的序列判定；结合生物信息学分析方法，对各染色体分辨率窗口内所属的序列数量进行统计，将统计的结果与大量正常样本构成的参考集合相比较，即可获得检测样品中目标疾病的拷贝数是否存在异常，从而实现对染色体非整倍体综合征和染色体微缺失微重复综合征进行产前筛查。分析流程简图如下。



(1) 序列比对和过滤

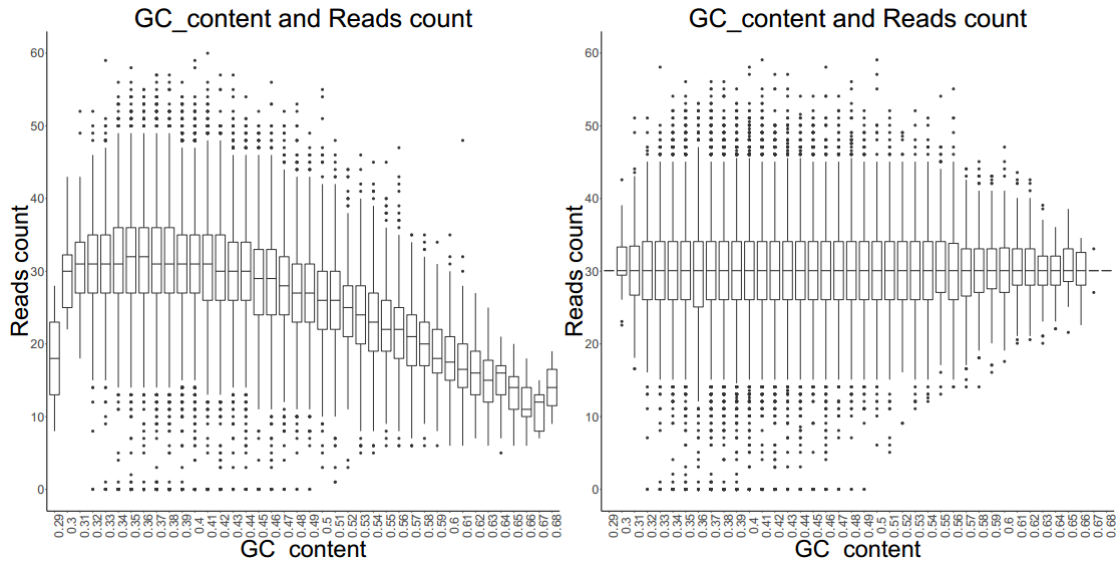
序列比对是利用高通量测序数据进行无创产前检测的基础，选择合适的比对软件（如 BWA）将测序获得半导体测序仪获得原始序列数据（FASTQ 文件或 BAM 文件）与人类基因组参考序列（比如 GRCh37/hg19 版本）进行序列比对，然后过滤无比对（unmapped）、低比对质量（MAPQ<10）和多重复比对等对系统变异系数影响较大的序列，获得有效测序数据[31]。

(2) GC 校正

文库构建和测序模板制备等实验过程中均可能涉及了 PCR 扩增的过程，为了消除 PCR 扩增造成的 GC 偏好，应选择合适的方法进行 GC 校正[32]。统计基因组中每个固定大小的区间窗口（如 20Kb）的有效序列数值（Usable reads number, UR），并进行 GC 校正，获得校正后的序列数值。以半导体测序法为例，首先统计每 0.1% GC 范围内的所有 20Kb 窗口的序列数值（UR）并利用 LOESS 算法计算获得 UR_{loess} ，再通过所有 20Kb 窗口获得期望的序列数值 UR_e ，最后校正后的序列数值 $UR_{corrected}$ 经如下公式计算得到：

$$UR_{corrected} = UR - (UR_{loess} - UR_e)$$

对 20Kb 窗口序列数值校正前后的 GC 统计图如下图所示：



基于半导体测序法的 GC 校正前分布图（左边）与校正后分布图（右边）

(3) 统计每个分辨率窗口（如 1Mb）的序列数值并归一化

由于 GC 校正的窗口一般设置的区间较小，噪声较大，胎儿 DNA 浓度不高的情况下不易观察到显著的异常信号，因此建议对 GC 校正的窗口进行合并得到合适的分辨率窗口，如 1Mb 大小的窗口[15]。对每个分辨率窗口，利用每个 GC 校正的窗口中经校正后的序列数值，可以统计出比对到该分辨率窗口的序列数值（reads number, RN）。然后对分辨率窗口的序列数值进行归一化处理得到每个分辨率窗口区段的比例（R）值。

$$R = \frac{RN}{\sum_{i=1}^n RN_i/n}$$

公式中的 n 表示基因组的 n 个分辨率的窗口。

(4) 对分辨率窗口（如 1Mb）的比例（R）值进行 RUN 内校正

对同批次测序的数据进行 RUN 内校正有利于进一步降低系统的噪声，提高检出率。对每个分辨率窗口区段的比例值（R），利用同批次上机样本的同一染色体区段的比例值集合，可以进行校正得到每个区段的 RUN 内校正后相对比例（CR）值。

$$CR = \frac{R}{\sum_{i=1}^k R_i/k}$$

公式中的 k 表示同批次上机样本中剔除异常值后的有效 R 值数。

(5) 计算分辨率窗口（如 1Mb）窗口的 Z-score 值

根据每个分辨率窗口的 RUN 内校正后相对比例（CR）值，以及该区域在普通人群样本中 CR 值的均值与标准差，我们可以进一步计算当前样本在该区域的 Z-score。

$$Z_i = \frac{CR_i - \text{Mean}_{\text{ref}}}{SD_{\text{ref}}}$$

(6) 计算目标疾病的 Stouffer's Z-score[9]

染色体拷贝数变异的类型、区间和大小主要根据分辨率窗口的 Z 值结合机器学习算法如均值漂移

模型 (MSB)、循环二元分割模型 (CBS)、隐马尔科夫模型 (HMM) 等进行识别。当胎儿 DNA 浓度较低时, 微重复区域的通常会在[0, 3]之间, 微缺失区域的通常会在[-3, 0]之间, 真阳性的拷贝数异常信号显著性不强。对大于 2Mb 的微重复/微缺失可观察到相邻的多个区域的 Z-score 同时上升或者下降的现象, 在这种情况下, 分析软件可采用对这些真阳性区域的 Z-score 进行放大, 提高系统的敏感性。

$$\text{stouffer's } Z = \frac{\sum_{i=1}^m Z_i}{\sqrt{m}}$$

公式中的 m 表示用于放大信号的连续点的个数。

(7) 胎儿 DNA 浓度 (fc) 预测

其中胎儿 DNA 浓度是利用游离 DNA 进行胎儿染色体拷贝数变异检测的关键性指标之一[15], 胎儿 DNA 浓度主要使用的模型包括 Y 染色体比例的线性回归模型[32, 33]、基于游离 DNA 长度分布信息的线性回归模型[15, 33]、基于测序的片段分布的多元线性回归模型[34]和基于人群多态性位点杂合频率的线性回归模型[35]等方法计算得到。应用胎儿 DNA 浓度的预测模型时应进行充分的研究验证, 确保预测值可用于结果分析。

(8) 基于测序读长的胎儿 DNA 浓度富集方法

对半导体高通量测序法得到的游离 DNA 序列片段, 如果测序 FLOW 数超过一定值 (如 FLOW \geq 300) 时, 通过对序列的读长分选小于一定长度 (如 150bp) 的比对结果和大于一定长度 (如 150bp) 的比对结果, 获得本次样本测序的高胎儿比例数据对应的目标疾病的 Z-score 值 ZH 和低胎儿比例数据对应的目标疾病 Z-score 值 ZL。利用这两个 Z 值可辅助判断目标疾病的灰区结果。

(9) 目标疾病的阳性判断值及参考区间

常染色体非整倍体 13 三体, 18 三体和 21 三体的阳性判断值

利用已知核型结果的阴性样本和阳性样本检测得到相应的参考值研究结果进行设置, 例如以 Z_p (如 $Z_p=4$) 为阳性阈值, Z_n (如 $Z_n=2.58$) 为阴性阈值, 则参考区间设置如下:

染色体非整倍体 Z 值	判定
$<Z_n$	阴性
$[Z_n, Z_p)$	灰区
$\geq Z_p$	阳性

Z 值处于 $[Z_n, Z_p)$ 则对应该染色体三体为灰区结果, 利用读长小于 150bp 的序列计算的 ZH 与读长大于等于 150bp 的序列计算的 ZL, 两者之差 Z_d ($ZH-ZL$) 的如果大于阈值 (如 1.96), 则判为阳性; Z_d 小于小于阈值 (如 1.96) 则判为阴性。如果系统没有获得更多信息 (如 Z_d) 作为辅助判断的情况下, 应进行复检, 如复检结果仍为灰区则应结合临床信息进一步检查。

(10) 染色体 CNV 综合征目标疾病的阳性判断值

利用目标疾病结果明确的阴性样本和阳性样本进行检测得到相应的参考值研究结果进行设置, 例如以 Z_p (如 $Z_p=4$) 为阳性阈值, Z_n (如 $Z_n=2.58$) 为阴性阈值, 则参考区间设置如下:

stouffer's Z 值的绝对值	判定
$<Z_n$	阴性
$[Z_n, Z_p)$	灰区
$\geq Z_p$	阳性

Z 值大于等于 Z_p , 对应该区域的 CNV 阳性, 如果 Z_p 大于 0, 则为微重复阳性, 如果 Z_p 小于 0 则为微缺失阳性;

Z 值小于 Z_n , 对应该区域的 CNV 阴性;

Z 值处于 $[Z_n, Z_p)$ 则对应该区域的 CNV 为灰区结果, 利用读长小于 150bp 的序列计算的 ZH 与读长大于等于 150bp 的序列计算的 ZL, 如果 ZH 与 ZL 之差 Z_d ($ZH-ZL$) 的绝对值大于阈值 (如 1.96),

则判为阳性；Zd 的绝对值小于阈值（如 1.96）则判为阴性。如果系统没有获得更多信息（如 Zd）作为辅助判断的情况下，应进行复检，如复检结果仍为灰区则应结合临床信息进一步检查。两者之差 Zd(ZH-ZL) 的如果大于阈值（如 1.96），则判为阳性；Zd 小于小于阈值（如 1.96）则判为阴性。如果系统没有获得更多信息（如 Zd）作为辅助判断的情况下，应进行复检，如复检结果仍为灰区则应结合临床信息进一步检查。

(11) 假阳性的识别

以 1Mb 分辨率的全基因组拷贝数变异分析为例，每个样本都有约 3000 个 1Mb 的分析区域，相当于每个样本都进行了 3000 次独立的 Z 检验。在这种情况下，如果按通常的 Z 值的绝对值大于 3 为阳性判断阈值，则每次检测由于 Z 值随机波动就会出现若干个区域的阳性信号。

在胎儿 DNA 浓度（fc）给定的情况下，某个区域 Z-score 期望值的绝对值 Ze 可以根据胎儿 DNA 浓度和该区域的变异系数（CV）计算所得。如果 Z 值的绝对值与 Ze 之差大于一定的阈值（如>3），可判定该信号为假阳性。

$$Z_e = \frac{fc\%}{2 * CV}$$

10.2 临床应用必须达到的参数标准

见质控指标部分

11 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查报告内容

11.1 目标疾病常规检测报告包括内容

11.1.1 检测方法和检测平台

- (1) 报告中需明确检测平台和检测方法。
- (2) 报告中需告知该标本胎儿游离 DNA 浓度。

11.1.2 筛查的目标疾病明细清单（包括 PPV/NPV、其临床意义、外显率等）

明确列出筛查目标疾病病种清单，筛查疾病的临床意义，并附上每种疾病基于大数据或本实验室数据的 PPV/NPV，如果纳入病种涉及外显不全的情况需明确写明外显率。

11.1.3 方法局限性和残余风险

(1) 报告中需明确 NIPS 筛查胎儿基因组病是一种筛查手段，检测结果提示高风险者应当进行产前诊断，行染色体核型分析或 CMA/CNV-seq 等遗传学检测；检测结果提示低风险者，应当结合孕期其他检查如超声监测等综合考虑是否需要进一步产前诊断。

(2) 报告中需明确本检测技术原理是基于孕妇外周血的胎儿游离 DNA（主要来源于胎盘），胎盘嵌合等可能造成假阳性或假阴性结果，因此该检测有一定的漏诊残余风险。

(3) 报告中需明确孕妇重度肥胖（体重指数>40）、通过体外受精-胚胎移植方式受孕、双胎妊娠等慎用人群进行筛查时，筛查效果可能有一定程度下降。

(4) 报告中需写明此方法无法检测：染色体多倍体异常（三倍体、四倍体等）；染色体平衡易位、倒位、环状；单亲二体；单/多基因疾病；胎儿嵌合型异常等。

11.1.4 遗传咨询意见

(1) 高风险结果遗传咨询意见：此检测结果提示胎儿为***综合征的风险为高风险，建议做侵入性产前诊断确诊。（举例：此检测结果提示胎儿为 Pader-Willi 综合征的风险为高风险，建议做侵入性产前

诊断确诊)

(2) 低风险结果遗传咨询意见：此检测结果提示胎儿患 21-三体、18-三体、13-三体的风险均为低风险，胎儿患 Turner 综合征、Klinefelter 综合征的风险为低风险以及筛查目标 pCNV 为低风险，但不排除因限制性胎盘嵌合、技术局限性等原因导致的假阴性，建议定期产检严密超声监测胎儿发育情况。

11.1.5 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查常规报告模板（见附录）

建议基于 NIPS 胎儿基因组病筛查报告至少应该涵盖以下几个要点

(1) 完整的报告抬头。

(2) 基本信息部分：样本编号；受检者姓名；孕妇年龄；唯一身份识别号；送检科室；申请医生；样本状态；送检时间；胎儿数；是否 IVF 妊娠等。

(3) 检测范围：报告中明确筛查目标疾病病种清单，筛查疾病的临床意义，并附上每种疾病基于大数据或本实验室数据的 PPV/NPV，如果纳入病种涉及外显不全的情况需写明外显率。

(4) 检测平台和检测方法：包括标本胎儿游离 DNA 浓度。

(5) 检测结果：包括检测结果以及结果描述。

(6) 结果说明：说明该方法局限性和残余风险。

(7) 遗传咨询意见：针对检测结果给出遗传咨询意见。

(8) 具有产前诊断分子遗传资质实验室技师、具有产前诊断资质且副高以上的遗传咨询医师签名、报告日期。

筛查高风险、筛查低风险模板见附录 2-附录 3。

11.2 意外发现补充报告内容

11.2.1 意外发现结果及报告建议

除了上文中规定需要检测及报告的目标疾病外，NIPS 检测中测算出的其他染色体数目或片段异常均属于意外发现；意外发现的染色体非整倍体及 pCNV 在报告时需注意以下情况：

(1) 目标疾病以外的其他染色体水平的 pCNV 如符合 6.2 条款中的意外发现结果，如片段长度大于 10 Mb 的致病性或可能致病性 CNV，且为临床外显率高及表型严重的大片段重复/缺失，可以以补充报告的方式体现。片段过小、或致病性欠明确、或临床表现轻微的 pCNV 不建议报告。

(2) 补充报告需明确说明：限于技术本身的局限性，NIPS 意外发现的准确性及可靠性 (PPV、NPV) 均比正式报告的检测项目偏低；阳性结果有可能是由于母亲本身、胎盘或胎儿中一方/多方异常；阴性结果也并不表示完全排除了胎儿罹患 pCNV 的可能性。

(3) 补充报告中建议对 pCNV 或非整倍体异常可能导致的表型进行简单描述，如孕妇存在相似表型时，建议完善孕妇的相应检测。

(4) 如检测到目标疾病以外的其他染色体非整倍体异常，建议在补充报告中提示不排除胎儿存在染色体非整倍体嵌合异常的可能性，说明嵌合体的表现，建议必要时采用 FISH、QF-PCR、CMA、核型分析等对胎儿、母亲进行嵌合体检测。

(5) 如检测到 6 号、7 号、11 号、14 号、15 号、20 号染色体的非整倍体，除建议提示非整倍体嵌合风险外，建议在补充报告中提示胎儿可能存在同源或异源单亲二体 (UPD) 嵌合的可能性，说明 UPD 的表现，建议采用含 SNP 探针的 CMA 平台或 STR 连锁分析等方法进行家系分析或甲基化多重连接探针扩增 (MS-MLPA) 等排除 UPD 疾病。

(6) 如检测到 pCNV 位于染色体末端，除提示 CNV 异常风险外，还需在补充报告中提示不排除胎儿父母双方中存在染色体平衡易位的可能性，并说明平衡易位的表现和对生育的影响，建议必要时采用核型分析等方法进行父母检测。

(7) 如检测到多条染色体非整倍体、大片段异常，建议在补充报告中体现，并注明该情况提示母源性肿瘤的风险增高，建议专科就诊。

基于 NIPS 胎儿基因组病筛查补充报告模板见附录 4-附录 6。

12 基于 NIPS 胎儿基因组病筛查检测后遗传咨询及随访

12.1 筛查高风险报告的遗传咨询

遗传咨询医师应当耐心详细地解释检测结果并提供咨询意见。

由于孕母血浆游离 DNA 主要来自于胎盘滋养层细胞，胎盘和胎儿可能存在 DNA 不一致情况[36]，胎盘 DNA 并不能完全代表胎儿，因此该检测有假阳性风险，必须要进一步产前诊断行胎儿染色体检查。考虑到绒毛组织存在胎盘相似来源原理不建议高风险孕妇进行绒毛取材产前诊断。建议通过穿刺手术取材羊水或脐带血进行核型、CMA 或 CNV-Seq 等检测。

如果经产前诊断明确为假阳性结果，鉴于可能存在限制性胎盘嵌合，建议定期超声监测胎儿生长发育。

遗传咨询及结果解释包括但不限于以下：

12.1.1 NIPS 筛查胎儿基因组病为筛查技术，不是产前诊断，假阳性结果不能完全避免。NIPS 筛查 pCNV 的效能（检出率、PPV、NPV）不如筛查 21 三体高风险。

12.1.2 对高风险孕妇及家属需详细告知目标疾病及 pCNV 的基于大数据或本实验室数据的各项筛查指标（检出率、PPV、假阳性率等）。

12.1.3 对高风险目标疾病临床意义的遗传咨询（pCNV 导致的疾病、是否外显不全、表型和预后的严重性）。

12.1.4 为高风险孕妇提供产前诊断，建议行 CMA 或 CNV-seq 检测。

12.1.5 对穿刺验证结果的随访和遗传咨询。

12.2 筛查低风险报告和遗传咨询

由于基于 NIPS 胎儿基因组病筛查是一种筛查技术，医师应告知检测结果提示低风险，只是说明胎儿患目标疾病的风险低，并不代表完全没有风险，应当结合孕期其他检查如超声监测等情况综合考虑是否需要进一步产前诊断。

12.2.1 明确告知此技术的局限性，目前的筛查方法只是针对一小部分 pCNV 进行筛查，且 pCNV 断点不同造成片段大小不一、胎儿游离 DNA 浓度偏低等多因素均可导致漏诊的风险。

12.2.2 低风险结果只是代表目前胎儿患目标基因组病的风险降低，并不能保证胎儿完全正常，胎儿可能存在目前筛查方法不能发现的遗传疾病，如果后期超声发现问题仍需要进行产前诊断。

12.2.3 建议孕妇定期开展产前检查，在孕 18-24 周时进行超声大排畸，对超声发现异常的，仍需进行产前诊断。

12.2.4 如果 NIPS 筛查胎儿基因组病筛查结果低风险，后期超声发现胎儿单个软指标异常，包括 15-20 周胎儿颈后皮层增厚 ≥ 6 mm，中孕期胎儿鼻骨缺失或发育不良，中孕期肾盂增宽大于 4mm，胎儿肠管回声增强，股骨短（小于 2.5 百分位数），胎儿心内强光斑，单侧或双侧脉络丛囊肿等，可以不考虑产前诊断。

12.3 意外发现补充报告遗传咨询及进一步产前诊断

通过 NIPS 高通量测序无创筛查胎儿基因组病可同时发现除外目标疾病的其他高风险，遗传咨询医师应当耐心详细地解释检测结果以及咨询意见，告知检测方法对目标疾病之外的意外发现的 PPV，建议进一步产前诊断，特殊情况可能需要结合孕妇及配偶外周血染色体检测综合判断结果。

如果经产前诊断明确为假阳性结果，鉴于可能存在限制性胎盘嵌合，建议定期超声监测胎儿生长发育。

12.3.1 对除外 21、18、13 三体外的其他常染色体高风险，由于此类三体大多属于不可存活三体(nonviable trisomy)，多在孕早期（12 周前）发生自发性流产，因此建议综合孕周、胎儿游离 DNA 浓度、风险值（Z 值）、是否有超声异常及进行羊水原位荧光杂交实验等进行综合评估和检查，以排除通胎儿潜在的染色体三体嵌合风险。

12.3.2 对多条染色体异常的意外发现：同时检出多条染色体提示母源性肿瘤的风险增加，此时 NIPS 无法出具报告，建议与孕妇沟通，了解孕妇身体状况并建议行额外检测（如核磁共振 MR 扫描、肿瘤标志物检测等）。

12.4 报告发放后的随访

12.4.1 随访内容

建立完善的随访体系，追踪母胎妊娠结局，高风险结果要详细记录产前诊断结果以及妊娠结局，低风险结果要详细记录孕期超声检测有无异常、有无孕期并发症以及妊娠结局。对 pCNV 胎儿建议在出生后一年、三年随访发育情况、语言能力及智力情况等（详见附录 7-附录 8）。

12.4.2 随访时间

随访时间须根据检测结果分阶段进行，高风险结果须在报告发出尽快随访召回产前诊断（一般建议报告发出后 2 天内通知）；另须在报告发出后 1-3 个月（根据检测时孕周计算）随访询问产前诊断结果；高风险和低风险结果均须在胎儿分娩后 12 周（根据检测时孕周计算）随访妊娠结局，具体随访时间见下表：

结果类型	随访时间		
	报告发出后 2 天内	报告发出后 1-3 个月	胎儿分娩后 12 周
高风险结果	✓	✓	✓
低风险结果			✓

*对 pCNV 胎儿且孕妇选择继续妊娠、分娩的，建议在分娩后 12 周及出生后 1 年、3 年各随访一次

12.4.3 随访率要求

(1) 高风险结果：对高风险孕妇的随访率必须达到 100%，产前诊断率必须达 95%以上。另高风险结果经产前诊断明确诊断后保留胎儿，建议随访可保持到患儿 3 岁。

(2) 低风险结果：对低风险孕妇的随访率必须达到 90%以上，应至少在分娩后 12 周及出生后 1 年各随访一次。

12.5 对可能失访的应对措施及处理

应定期整理随访结果，对失访病例分析原因。目前主要通过电话随访，随访过程难免遇到失败病例，随访失访主要原因是随访电话被标记为骚扰电话而被拦截或拒听，另外一些原因还包括申请单保留电话错误，或由于随访周期长孕妇已更换电话号码等。

建议处理措施：

(1) 对随访电话进行标记命名，比如命名为某某单位来电，提高电话接听率。

(2) 留存夫妇双方电话号码。

(3) 建立随访扫码小程序，在申请单上印刷二维码，在开单时引导孕妇扫码进入随访小程序，以便于后期进行随访。

(4) 借助查询“省级妇幼卫生系统”进行胎儿妊娠结局追踪随访。

附 录 1
(规范性附录)
知情同意及申请书参考模板

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序无创产前检测胎儿基因组病申请单

受检材料：外周血 门诊号/住院号：_____ 送检单位：_____

孕妇姓名：_____ 手机号码：（建议填两个）_____ 临床诊断：_____

末次月经：__年__月__日 年龄：__岁 孕周：__周 身高：__cm 体重：__Kg

孕产史：_____ 妊娠方式：自然受孕 辅助生殖：AIH IVF-ET/ICSI PGD/PGS

既往史：无 有异体输血 无 有移植手术_____ 无 有干细胞治疗

无 有异体细胞治疗 无 有肿瘤：_____ 否 是传染病：_____

不良孕产史：无 有_____ 遗传病/先天病史（家族史）无 有_____

辅助检查：1.超声：单胎 双胎 DCDA MCDA MCMA 超声异常征象 无 有_____

2.母血清筛查：未做 已做 风险率：21-三体 1/_____ 18 三体 1/_____

3.夫妻双方染色体：未做 正常 异常_____

知情同意书

基于孕妇外周血筛查胎儿基因组病是通过采集孕妇外周血（10ml）提取游离DNA，采用高通量测序结合生物信息分析，得出胎儿患13、18、21三体综合征及基因组病的风险。该检测有以下要求及局限性：

- 需孕12周(超声推算或确认)以上进行检测，最佳检测孕周为12-22⁺⁶周。
- 该检测目标疾病仅针对13/18/21-三体综合征、Turner综合征、Klinefelter综合征、1p36缺失综合征、Wolf-Hirschhorn综合征、Cri du Chat综合征、9p缺失综合征、Jacobsen综合征、PWS/Angelman综合征(1型)、Smith-Magenis综合征、18p及18q缺失综合征、22q11.2微缺失综合征等15种染色体异常，检测范围外意外发现会以补充报告形式告知。
- 本检测仅能排除检测范围所示的染色体异常，无法完全检测以下异常：①染色体多倍体异常（三倍体、四倍体等）；②染色体平衡易位、倒位、环状；③单亲二倍体（UPD）；④单/多基因病；⑤胎儿嵌合型染色体异常等。
- 有下列情形的孕妇属于不适用人群。包括：①孕周<12⁺⁰周；②夫妇双方明确为同型地贫基因携带且有妊娠重度地贫患儿风险的孕妇或有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患单基因病高风险；③夫妇一方明确染色体异常或携带pCNV；④胎儿超声提示有结构异常；⑤孕期合并恶性肿瘤；⑥1年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等；⑦NT增厚大于3.0mm或两个以上软指标异常或孕妇年龄≥40岁的情况，应产前诊断；⑧医师认为可能影响结果准确性的其它情形。
- 由于孕妇个体差异导致的血浆胎儿游离DNA浓度过低，需要重新抽血取样；重新抽血取样后仍无法得到检测结果，则酌情给予退费。
- 本检测是一种筛查手段，检测结果提示高风险者应当进行有创产前诊断手术获取胎儿取材进行染色体CMA或CNV-seq检测；检测结果提示低风险者由于该检测有一定的漏诊残余风险，应当结合孕期其他检查如超声监测等情况综合考虑是否需要进一步产前诊断。
- 基因组病的筛查效能相对21三体等偏低，总体检出率只能达到70%，存在漏检的可能。
- 本检测技术原理是基于孕妇外周血的胎儿游离DNA（主要来源于胎盘），胎盘嵌合等可能造成假阳性或假阴性结果。

我承诺提供的个人资料真实可靠；我同意在去掉所有个人信息后，检测数据在符合国务院颁布的《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》前提下可供用于非盈利性科学研究数据分析并同意将我的检测样本用于非盈利性的科学研究。我已充分了解该检测的性质、预期目的、风险，对其中的疑问已得到医生的解答。知晓并同意医院对我的妊娠结局进行随访，经本人及家属慎重考虑愿意进行该项检测，并承担因检测带来的相关风险。

我已充分了解该检测局限性及可能漏诊风险,自愿进行检测。(孕妇抄写)

谈话医生（签字）：_____

孕妇同意（签字）：_____日期：____年____月____日

知情同意书补充条款款（孕周超过 22⁺⁶ 周的孕妇同时签署）

本人现孕周已超过 22⁺⁶ 周，已知晓会存在错过最佳介入产前诊断时间的风险。本人自愿要求进行该项检测并承担检测的风险及因错过介入产前诊断时间而无法进行进一步确诊所带来的后果。

孕妇同意（签字）：_____ 年____月____日

附 录 2
(规范性附录)
低风险报告参考模板

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序胎儿染色体无创产前检测报告

样本编号:

送检单位:

孕妇姓名: ***	年龄: **	住院/门诊号: *****
孕周: **	IVF-ET 妊娠: *	胎儿数: *
标本类型: 外周血	样本状态: 合格	送检日期: **
送检科室: ***	送检医生: *****	检测日期: ***

检测范围: 胎儿 21 三体、18 三体、13 三体、Turner 综合征、Klinefelter 综合征、1p36 缺失综合征、Wolf-Hirschhorn 综合征、Cri du Chat 综合征、9p 缺失综合征、Jacobsen 综合征、PWS/Angelman 综合征 (1 型)、Smith-Magenis 综合征、18p 及 18q 缺失综合征、22q11.2 微缺失综合征等 15 种染色体异常。

检测方法: 孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序

检测结果: cffDNA 浓度: ___%

筛查项目	检测值	参考范围	检测结果
13-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险
18-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险
21-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险

筛查项目	检测结果	结果描述
Turner 综合征	低风险	低风险
Klinefelter 综合征	低风险	低风险
10 种微缺失综合征	低风险	低风险

筛查结果说明:

1. 本检测是一种筛查手段, 检测结果提示高风险者应当进行有创产前诊断手术获取胎儿取材进行染色体 CMA 或 CNV-seq 检测; 检测结果提示低风险者由于该检测有一定的漏诊残余风险, 应当结合孕期其他检查如超声监测等情况综合考虑是否需要进一步产前诊断。
2. 本检测仅能排除检测范围所示的染色体异常, 无法完全检测: (1) 染色体多倍体异常 (三倍体、四倍体等); (2) 染色体平衡易位、倒位、环状; (3) 单亲二倍体 (UPD); (4) 单/多基因病; (5) 胎儿嵌合型染色体异常。
3. 该方法有以下不适用人群: 包括: ①孕周 < 12⁺⁰ 周; ②夫妇双方明确为同型地贫基因携带且有妊娠重度地贫患儿风险的孕妇或有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患单基因病高风险; ③夫妇一方明确染色体异常或携带 pCNV; ④胎儿超声提示有结构异常; ⑤孕期合并恶性肿瘤; ⑥ 1 年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等; ⑦ NT 增厚大于 3.0mm 或两个以上软指标异常和孕妇年龄 ≥ 40 岁的情况, 应产前诊断; ⑧ 医师认为可能影响结果准确性的其它情形。
4. 本检测技术原理是基于孕妇外周血的胎儿游离 DNA (主要来源于胎盘), 胎盘嵌合等可能造成假阳性或假阴性结果。
5. 孕妇重度肥胖 (体重指数 > 40)、通过体外受精-胚胎移植方式受孕、双胎妊娠等筛查效果可能有一定程度下降, 无创产前检测结果仅供参考。
6. 因受检者提供的用户资料不实或其它误导因素而导致检测服务的中断、结果不准确, 本实验室对此不承担责任。

检验者： 审核者： 报告时间：

遗传咨询意见：

此检测结果提示胎儿 21 三体、18 三体、13 三体的风险均为低风险，胎儿的性染色体数目增多/减少为低风险以及 10 种基因组病为低风险，建议定期产检严密超声监测胎儿发育情况。

医师签名：***

日期： 年 月 日

附 录 3
(规范性附录)
高风险报告参考模板

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序胎儿染色体无创产前检测报告

样本编号:

送检单位:

孕妇姓名: ***

年龄: **

住院/门诊号:

孕周: **

IVF-ET 妊娠: *

胎儿数

*

标本类型: 外周血

样本状态: 合格

送检日期:

**

送检科室: ***

送检医生: *****

检测日期:

检测范围: 胎儿 21 三体、18 三体、13 三体、Turner 综合征、Klinefelter 综合征、1p36 缺失综合征、Wolf-Hirschhorn 综合征、Cri du Chat 综合征、9p 缺失综合征、Jacobsen 综合征、PWS/Angelman 综合征 (1 型)、Smith-Magenis 综合征、18p 及 18q 缺失综合征、22q11.2 微缺失综合征等 15 种染色体异常。

检测方法: 孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序

检测结果: cfDNA 浓度: ____%

筛查项目	检测值	参考范围	检测结果
13-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险
18-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险
21-三体综合征	***	(-3, 3)	低风险

筛查项目	检测结果	结果描述
Turner 综合征	低风险	低风险
Klinefelter 综合征	低风险	低风险
10 种微缺失综合征	高风险	Parder-Willi 综合征高风险

筛查结果说明:

1. 本检测是一种筛查手段, 检测结果提示高风险者应当进行有创产前诊断手术获取胎儿取材进行染色体 CMA 或 CNV-seq 检测; 检测结果提示低风险者由于该检测有一定的漏诊残余风险, 应当结合孕期其他检查如超声监测等情况综合考虑是否需要进一步产前诊断。
2. 本检测仅能排除检测范围所示的染色体异常, 无法完全检测: ①染色体多倍体异常 (三倍体、四倍体等); ②染色体平衡易位、倒位、环状; ③单亲二倍体 (UPD); ④单/多基因病; ⑤胎儿嵌合型染色体异常。
3. 该方法有以下不适用人群: 包括: ①孕周 < 12⁺ 周; ②夫妇双方明确为同型地贫基因携带且有妊娠重度地贫患儿风险的孕妇或有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患单基因病高风险; ③夫妇一方明确染色体异常或携带 pCNV; ④胎儿超声提示有结构异常; ⑤孕期合并恶性肿瘤; ⑥ 1 年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等; ⑦ NT 增厚大于 3.0mm 或两个以上软指标异常和孕妇年龄 ≥ 40 岁的情况, 应产前诊断; ⑧ 医师认为可能影响结果准确性的其它情形。
4. 本检测技术原理是基于孕妇外周血的胎儿游离 DNA (主要来源于胎盘), 胎盘嵌合等可能造成假阳性或假阴性结果。
5. 孕妇重度肥胖 (体重指数 > 40)、通过体外受精-胚胎移植方式受孕、双胎妊娠等筛查效果可能有一定程度下降, 无创产前检测结果仅供参

考。

6. 因受检者提供的用户资料不实或其它误导因素而导致检测服务的中断、结果不准确，本实验室对此不承担责任。

检验者： 审核者： 报告时间：

遗传咨询意见：

此检测结果提示胎儿 Parder-Willi 综合征高风险，建议做侵入性产前诊断确诊。

医师签名： ***

日期： 年 月 日

附 录 4
(规范性附录)

补充报告模板 (其他常染色体高风险)

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序胎儿染色体无创产前检测补充报告

样本编号:	送检单位:		
孕妇姓名: ***	年龄: **	住院/门诊号:	*****
孕周: **	IVF-ET 妊娠: *	胎儿数	*
标本类型: 外周血	样本状态: 合格	送检日期:	**
送检科室: ***	送检医生: *****	检测日期:	***

检测范围: 除胎儿 21 三体、18 三体、13 三体及正式报告中所含 CNV 以外的额外发现的染色体上的片段长度>10M 的致病性重复或缺失。

检测方法: 孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序。

检测结果: 15 号染色体三体异常高风险。

筛查结果说明:

1. 本补充报告为《基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序胎儿染色体无创产前检测报告》(NIPS) 的补充, 报告内容为意外发现的染色体片段长度>10Mb, 且按 ACMG 指南评估后可评价为“致病性”或“可能致病性”, 且推测临床外显率高及表型严重的大片段重复/缺失。
2. 限于技术本身的局限性, NIPS 意外发现的准确性及可靠性 (PPV、NPV 等指标) 均比正式报告的检测项目为更低; 阳性结果有可能是因为母亲本身、或胎盘、或胎儿中一方或多方或其中部分组织异常所导致, 也可能仅仅为实验误差; 阴性结果也并不表示完全排除了胎儿 (及/或母亲) 罹患 10M 以上致病性 CNV 的可能性, 建议采用合适的方法进一步明确诊断。
3. 本检测的适用范围及其他注意事项参见正式报告。

检验者: 审核者: 报告时间:

遗传咨询意见:

此检测结果提示胎儿存在 15 号染色体三体高风险。15 号染色体三体严重影响胚胎发育, 通常在孕早期 (<12 孕周) 停止发育而流产, 不排除极少数嵌合型 15 三体患者存活至成年的可能性。15 号染色体为印迹染色体, 存在胎儿因三体挽救导致单亲二体 (UPD) 异常, 出现 UPD 型 PWS 综合征或天使综合征的可能性。该两种疾病患儿在胎儿期通常无明显异常表型, 出生后逐渐出现智力、发育方面的严重异常。建议介入性产前诊断以明确胎儿诊断、必要时采用 CMA、MS-MLPA、SNP/STR 分析等方案完善胎儿 UPD 检测和夫妇双方的连锁分析。

医师签名: ***

日期: 年 月 日

附录 5
(规范性附录)

补充报告模板 (多条染色体高风险, 提示孕妇肿瘤风险)

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序胎儿染色体无创产前检测补充报告

样本编号:

送检单位:

孕妇姓名: *** 年龄: ** 住院/门诊号: *****

孕周: ** IVF-ET 妊娠: * 胎儿数 *

标本类型: 外周血 样本状态: 合格 送检日期: **

送检科室: *** 送检医生: ***** 检测日期: ***

检测范围: 除胎儿 21 三体、18 三体、13 三体及正式报告中所含 CNV 以外的额外发现的染色体上的片段长度>10M 的致病性重复或缺失。
检测方法: 孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序。

检测结果: 5、11、13、14、18、20、21 号染色体非整倍体异常高风险。

筛查结果说明:

1. 本补充报告为《基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序胎儿染色体无创产前检测报告》(NIPS) 的补充, 报告内容为意外发现的染色体片段长度>10Mb, 且按 ACMG 指南评估后可评价为“致病性”或“可能致病性”, 且推测临床外显率高及表型严重的大片段重复/缺失。
2. 限于技术本身的局限性, NIPS 意外发现的准确性及可靠性 (PPV、NPV 等指标) 均比正式报告的检测项目为更低; 阳性结果有可能是因为母亲本身、或胎盘、或胎儿中一方或多方或其中部分组织异常所导致, 也可能仅仅为实验误差; 阴性结果也并不表示完全排除了胎儿 (及/或母亲) 罹患 10M 以上致病性 CNV 的可能性, 建议采用合适的方法进一步明确诊断。
3. 本检测的适用范围及其他注意事项参见正式报告。

检验者:

审核者:

报告时间:

遗传咨询意见:

此检测结果提示胎儿存在 5、11、13、14、18、20、21 号染色体非整倍体异常高风险。此类结果提示 NIPS 检测失败, 孕妇可能存在严重炎症或肿瘤等疾病的风险, 建议相关科室就诊, 完善相关检查以明确诊断。必要时行介入性产前诊断。

医师签名: ***

日期: 年 月 日

附 录 6
(规范性附录)
补充报告模板 (其他大片段 pCNV)

基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序胎儿染色体无创产前检测补充报告

	样本编号:	送检单位:
孕妇姓名: ***	年龄: **	住院/门诊号: *****
孕周: **	IVF-ET 妊娠: *	胎儿数 *
标本类型: 外周血	样本状态: 合格	送检日期: **
送检科室: ***	送检医生: *****	检测日期: ***

检测范围: 除胎儿 21 三体、18 三体、13 三体及正式报告中所含 CNV 以外的额外发现的染色体上的片段长度>10M 的致病性重复或缺失。

检测方法: 孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序。

检测结果: 10 号染色体末端大片段缺失高风险。

筛查结果说明:

1. 本补充报告为《基于孕妇外周血浆游离 DNA 高通量测序胎儿染色体无创产前检测报告》(NIPS) 的补充, 报告内容为意外发现的染色体片段长度>10Mb, 且按 ACMG 指南评估后可评价为“致病性”或“可能致病性”, 且推测临床外显率高及表型严重的大片段重复/缺失。
2. 限于技术本身的局限性, NIPS 意外发现的准确性及可靠性 (PPV、NPV 等指标) 均比正式报告的检测项目为更低; 阳性结果有可能是因为母亲本身、或胎盘、或胎儿中一方或多方或其中部分组织异常所导致, 也可能仅仅为实验误差; 阴性结果也并不表示完全排除了胎儿 (及/或母亲) 罹患 10M 以上致病性 CNV 的可能性, 建议采用合适的方法进一步明确诊断。
3. 本检测的适用范围及其他注意事项参见正式报告。

检验者: 审核者: 报告时间:

遗传咨询意见:

此检测结果提示胎儿存在 10 号染色体末端大片段缺失高风险。此类缺失的患者通常会出现发育、智力等方面的严重异常。部分患儿因健康父母携带涉及该片段的染色体平衡易位所致。平衡易位携带者本身通常无表型, 但存在较高概率的生育染色体异常患儿的风险。建议介入性产前诊断以明确胎儿诊断、必要时采用核型分析方法检测以夫妇双方的遗传学诊断。

医师签名: ***

日期: 年 月 日

附 录 7
(规范性附录)
筛查高风险随访表参考模板

标本编号	抽血时间	病历号	年龄(岁)	孕周(周)	NIPT 结果	第一次随访	
						随访时间	是否成功随访

第二次随访					妊娠结局	妊娠期是否出现超声异常 (异常描述)	出生日期
随访时间	是否产前诊断	产前诊断时间	产前诊断胎儿取材方法	产前诊断结果			

分娩孕周(w)	出生体重(Kg)	性别	分娩方式	新生儿体检结果 (异常描述)	面容检查 (异常描述)	身体外观有无特殊 (异常描述)	听力筛查 (异常描述)	足跟筛查 (异常描述)	孕期是否合并或并发内科疾病 (异常描述)	分娩医院	备注

附 录 8
(规范性附录)
筛查低风险随访表参考模板

标本编号	抽血时间	病历号	年龄 (岁)	孕周 (周)	随访时间	妊娠结局	妊娠期是否出现超声异常 (异常描述)	出生日期	分娩孕周 (w)

出生体重 (Kg)	性别	分娩方式	新生儿体检结果 (异常描述)	面容检查 (异常描述)	身体外观有无特殊 (异常描述)	听力筛查 (异常描述)	足跟筛查 (异常描述)	孕期是否合并或并发内科疾病 (异常描述)	分娩医院	备注

附 录 9
(规范性附录)
血浆分离记录表表参考模板

《无创产前 DNA 检测项目 (96) 血浆分离记录表》							
序号 No.	扫码区	Lims3	血浆分离	文库构建	二类管	期数	
1						标签	
2						全血管载架	
3						二类管载架	
4						操作人	
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
.							
.							
.							
94							
95							
96							

附 录 10
(规范性附录)
血浆游离 DNA 记录表参考模板

无创产前项目 DNA 提取任务单								
操作人		复核人		期数		日期		
环节	名称	试剂批次	单孔	数量	总量	核点对	复核	
试剂配制	蛋白酶 K		/			蛋白酶 K, 从 4°C 拿出短离		
	蛋白酶 K 溶解液					加入蛋白酶 K 溶解液 750ul		
	缓冲液 SDS		10ul	14*8	140*8	检查试剂是否澄清		
	磁珠 G		20ul	14*8	280*8	室温平衡 30min, 颠倒混匀不挂壁		
	缓冲液 DH		10ul	14*8	140*8	润洗枪头, 悬空加液		
	蛋白酶 K 工作液		5ul	14*8	70*8	蛋白酶 K 溶解完全加入 mix 中, 吹打混匀		
	分装		45ul/孔 1			磁珠 mix 加前震混		
					检查-1 深孔板血浆量, 拍照			
试剂添加	名称	单孔	总量	注意事项				
	BST1	300ul	1 瓶	检查试剂是否结晶				
	MKW1	600ul	1 瓶	无				
	MW2	300*2ul	1 瓶	用前加 60ml 无水乙醇, 颠倒混匀				

	DH	65ul	1 瓶)	检查试剂槽底部是否有气泡									
运行前	程序												
	样本液面齐平												
	枪头摆放与自动化标识一致												
	DH 枪头数目与样本数目一致												
	加液槽摆放与位置标识一致												
	试剂添加与加液槽名称一致												
过程中	观察试剂添加是否充足、是否滴液、抓手手否放回原位置												
	未修 MIX 的体积、名称、期数、位置双人核对，拍照												
结束后	检查 PCR 板内每孔体积是否齐平												
	封膜、离心、上机（选择程序 20°C30min）												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

附 录 11
(规范性附录)

血浆游离 DNA 文库构建记录表参考模板

		文件编号： 版本号：								任务单编号		
NIPS 项目提取建库任务单												
实验时间：							孔板号：					
实验编号：							实验安排人：					
建库开始时间：		年		月		日		实验人：				
时												
血浆编号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
血浆加入仪器编号：				板号：				仪器操作人：				
提取试剂盒名称：核酸提取试剂						提取试剂盒批号：						
建库试剂盒名称：胎儿染色体非整倍体（T21、T18、T13）检测试剂盒（XXX 法）						建库试剂盒批号：						
提取试剂盒有效期：						建库试剂盒有效期：						
提取试剂盒注册证号：						建库试剂盒注册证号：						
文库号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												

D												
E												
F												
G												
H												
DNA 提取	试剂： 蛋白酶 K+磁珠：xx μ L+xx μ L；裂解液：xxx μ L；清洗液 1：xxx μ L；清洗液 2：xxx μ L；洗脱缓冲液：xx μ L											
	提取仪器编号：xxx 013 <input type="checkbox"/> 015 <input type="checkbox"/> 021 <input type="checkbox"/> 035 <input type="checkbox"/> 其他 <input type="checkbox"/> xxx 004 <input type="checkbox"/> 017 <input type="checkbox"/> 018 <input type="checkbox"/> 031 <input type="checkbox"/> 其他 <input type="checkbox"/>											
片段 筛选	试剂： 磁珠 1：xx μ L；磁珠 2：xx μ L；75%乙醇：xxx μ L；洗脱缓冲液：xx μ L											
末端 修复	反应条件：											
	温浴仪器编号：											
接头 连接	反应条件：											
	温浴仪器编号：											
	试剂： 磁珠：xx μ L；75%乙醇：xxx μ L；洗脱缓冲液：xx μ L											
	纯化仪器编号：											
	仪器操作人：											
PCR	PCR 程序											
	PCR 仪器编号：											
	试剂： 磁珠：xx μ L；75%乙醇：xxx μ L；洗脱缓冲液：xx μ L											
	纯化仪器编号：											
	仪器操作人：											
定量	xx μ L 样本溶于 xx μ L RT2，xxx μ L 染料混匀											
	定量仪器编号：											

	定量仪器操作人：
文库交出人（签名/日期）：	文库接收人（签名/日期）：

附录 12
(规范性附录)
文库定量记录表参考模板

文库 QC 实验记录					
qPCR 定量试剂:					
QC 日期			实验人员签字		
文库数量			核对人员签字		
试剂名称	配制日期	每反应用量 (μL)	样品数量	当前使用总量	备注
0.05% Tween		200			
qPCR buffer		6			
样本编号	终文库名称	Quantity 值	文库浓度(nM)	质控结果合格打√ 质控结果不合格打 X	备注
文库 QC 质控合格标准：文库 QC 浓度应\geqXX pM。					
信息审核通过 (组长勾选) 标签是否核对 (组长勾选)					
文库移交人:					

附录 13
(规范性附录)
测序实验记录表参考模板

测序实验记录表														
日期:				当天实验次数		pooling号	pooling-YYXXXX			任务单编号	CX-			
序列	文库编号	Barcode	浓度(nmol/L)	定量日期	稀释倍数	稀释补水量(μl)	混合量	混合体积(μl)	确认(打√)	pooling 总体积	pooling浓度(nmol/L)	上机浓度(pmol/L)		
1					1	0								
2					1	0								
3					1	0								
4					1	0								
5					1	0								
6					1	0								
7					1	0								
8					1	0								
9					1	0								
10					1	0								
11					1	0								
12					1	0								
13					1	0								
14					1	0								
15					1	0								
16					1	0								
17					1	0								
18					1	0								
19														
20														
第一次稀释倍数	10.0	pooling文库体积		2	NF水体积(μl)		18	Pooling操作人						
第二次稀释倍数	0.0	10倍稀释pooling文库体积		2.0	NF水体积(μl)			稀释操作人						
pooling-YYXXXX														
库	前处理				下机处理				上机信息					
	往每个收集管里各加入150μl的破乳液II				步骤				OT仪器编号:					
	试剂	体积(μL)	确认(打√)		1、每管留100μL, 重悬至1.5ml 管				试剂批次:					
	乳液PCR缓冲液 I	2000	配mix管		2、200μL 水洗涂2次; 补NF水至1000 μL				上机时间:					
	无核酸酶水	80			3、15500g, 8min				操作人:					
	乳液PCR酶混合液	120			4、留100μL+900μL 水(本步骤完成的样本微珠溶液在2-8℃最多保存3天)				备注:					
	微珠溶液	100			5、15500g, 8min									
稀释后的pooling文库	100			6、留20μL+80μL 模板重悬液										
总体积	2400			往乳液PCR缓冲液 I 中加入各组分, Mix vortex5秒, 充分混匀后800μl分三次注入过滤器; 加入200μl 隔离油										
库	MF 配制	试剂	体积(μL)	个数	总体积(μl)				确认(打√)					
		吐温溶液	280						ES仪器编号:					
		1MNaOH	40						试剂批次:					
		总体积	320						是否同上: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否					
	洗涤磁珠	100μL链霉亲和素Cl磁珠+1000μL清洗液; 130μL Cl磁珠捕获液												
	8孔反应条	孔 1	孔 2	孔 3、4、5	孔 6	孔 7	孔 8	操作人:						
		100μL 样本微珠溶液	130μL 链霉亲和素Cl 磁珠	300μL 纯化清洗液	空	300μL MF	空							
下机	15500g 5min; 留15μL; 加200μL NF水; 15500g 5min, 留15μL, 加90μL NF水; 4℃可保存三天。													
库	初始化	W1: 32μl 1MNaOH	W2: 1920ml 水+125ml 测序溶液II	W3: 40-50 ml 测序溶液III	dNTP: 70μL				测序仪器编号:					
	样本处理	加入5μL质控微珠溶液; 混匀; 15500g离心5min, 留10μL。				配制上机试剂				试剂批次:				
		加入15μL退火缓冲液、20μL测序引物; 充分振荡混匀, 瞬时离心。				50%退火缓冲液; 500μLNF水+500μL退火缓冲液				是否同上: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否				
	上样	退火反应: 95℃ 2min, 37℃ 2min, 20℃ hold								芯片批次:				
		加入10 μL上样缓冲液; 混匀, 瞬时离心。				冲洗液: 500μL异丙醇+500μL退火缓冲液				上机时间:				
酶孵育	往芯片进样槽加入55 μL上一步得到的样本微珠溶液, 在芯片离心机离心12min;				冲洗液: 500μL异丙醇+500μL退火缓冲液				操作人:					
	(100μL发泡剂+55 μL50%退火缓冲液, 离心30S)*2				发泡剂: 49 μL 50%退火缓冲液+1μL 发泡液				备注:					
	100 μL冲洗液2次; 100 μL50%退火缓冲液3次				酶反应液: 6μL测序聚合酶+60μL50%退火缓冲液									
	65μL酶反应液, 室温避光孵育.5min													

附 录 14
(规范性附录)
室内质控记录表、失控记录分析表参考模板

无创产前 DNA 检测项目
室内质控评审记录

____年 ____月

一、 本月质控品评价及分析

--

二、 采取的预防措施

--

三、 审批意见

--

参考文献

- [1] Gregg AR, Gross SJ, Best RG *et al.* ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy[J]. *Genet Med*, 2013, 15(5):395-398. DOI: 10.1038/gim.2013.29.
- [2] 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. DOI: 10.1002/pd.4608.
- [3] Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 226[J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 136(4):859-867. DOI: 10.1097/AOG.0000000000004107.
- [4] 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. 2016,
- [5] Wapner RJ, Martin CL, Levy B *et al.* Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23):2175-2184. DOI: 10.1056/NEJMoa1203382.
- [6] Chau MHK, Cao Y, Kwok YKY *et al.* Characteristics and mode of inheritance of pathogenic copy number variants in prenatal diagnosis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 221(5):493 e491-493 e411. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.06.007.
- [7] Evans MI, Wapner RJ, Berkowitz RL. Noninvasive prenatal screening or advanced diagnostic testing: caveat emptor[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215(3):298-305. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.04.029.
- [8] Chen Y, Yu Q, Mao X *et al.* Noninvasive prenatal testing for chromosome aneuploidies and subchromosomal microdeletions/microduplications in a cohort of 42,910 single pregnancies with different clinical features[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1):60. DOI: 10.1186/s40246-019-0250-2.
- [9] Cui W, Liu X, Zhang Y *et al.* Evaluation of non-invasive prenatal testing to detect chromosomal aberrations in a Chinese cohort[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11):7873-7878. DOI: 10.1111/jcmm.14614.
- [10] Liang D, Cram DS, Tan H *et al.* Clinical utility of noninvasive prenatal screening for expanded chromosome disease syndromes[J]. *Genet Med*, 2019, 21(9):1998-2006. DOI: 10.1038/s41436-019-0467-4.
- [11] Lo KK, Karampetsou E, Boustred C *et al.* Limited Clinical Utility of Non-invasive Prenatal Testing for Subchromosomal Abnormalities[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(1):34-44. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.11.016.
- [12] Li R, Wan J, Zhang Y *et al.* Detection of fetal copy number variants by non-invasive prenatal testing for common aneuploidies[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47(1):53-57. DOI: 10.1002/uog.14911.
- [13] 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. DOI: 10.1038/gim.2016.97.
- [14] Di Renzo GC, Bartha JL, Bilardo CM. Expanding the indications for cell-free DNA in the maternal circulation: clinical considerations and implications[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 220(6):537-542. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.01.009.
- [15] Yin AH, Peng CF, Zhao X *et al.* Noninvasive detection of fetal subchromosomal abnormalities by semiconductor sequencing of maternal plasma DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(47):14670-14675. DOI: 10.1073/pnas.1518151112.
- [16] Xu J, Xue Y, Wang J *et al.* The Necessity of Prenatal Diagnosis by CMA for the Women with NIPS-Positive Results[J]. *Int J Genomics*, 2020, 2020(2145701). DOI: 10.1155/2020/2145701.
- [17] Weise A, Mrasek K, Klein E *et al.* Microdeletion and microduplication syndromes[J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60(5):346-358. DOI: 10.1369/0022155412440001.
- [18] Liu W, Lu J, Zhang J *et al.* [A consensus recommendation for the interpretation and reporting of copy number variation and regions of homozygosity in prenatal genetic diagnosis][J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2020, 37(7):701-708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.07.001.

- [19] Clinical Genetics Group Of Medical Genetics Branch Chinese Medical A, Professional Committee For Prenatal Diagnosis Of Genetic Diseases Medical Genetics Branch Of Chinese Medical A, Group Of Genetic Disease P *et al.* [Expert consensus on the application of low-depth whole genome sequencing in prenatal diagnosis][J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2019, 36(4):293-296. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.001.
- [20] Zhao C, Tynan J, Ehrich M *et al.* Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(4):608-616. DOI: 10.1373/clinchem.2014.233312.
- [21] Ji X, Li J, Huang Y *et al.* Identifying occult maternal malignancies from 1.93 million pregnant women undergoing noninvasive prenatal screening tests[J]. *Genet Med*, 2019, 21(10):2293-2302. DOI: 10.1038/s41436-019-0510-5.
- [22] Skotko BG, Allyse MA, Bajaj K *et al.* Adherence of cell-free DNA noninvasive prenatal screens to ACMG recommendations[J]. *Genet Med*, 2019, 21(10):2285-2292. DOI: 10.1038/s41436-019-0485-2.
- [23] Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ *et al.* Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies[J]. *JAMA*, 2015, 314(2):162-169. DOI: 10.1001/jama.2015.7120.
- [24] Panchalee T, Vossaert L, Wang Q *et al.* The effect of maternal body mass index and gestational age on circulating trophoblast yield in cell-based noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2020, DOI: 10.1002/pd.5755.
- [25] Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A *et al.* Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(1):79 e71-79. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.10.012.
- [26] Galeva S, Gil MM, Konstantinidou L *et al.* First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019, 53(6):804-809. DOI: 10.1002/uog.20290.
- [27] Nakamura N, Sasaki A, Mikami M *et al.* Nonreportable rates and cell-free DNA profiles in noninvasive prenatal testing among women with heparin treatment[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(7):838-845. DOI: 10.1002/pd.5695.
- [28] 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. DOI: 10.1186/s12967-018-1705-2.
- [29] 国卫办妇幼函[2019]847号. 国家卫生健康委办公厅关于加强孕妇外周血胎儿游离DNA产前筛查与诊断监督管理的通知. 2019.
- [30] 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(8):810-815. DOI: 10.1002/pd.4615.
- [31] Lenaerts L, Van Calsteren K, Che H *et al.* Pregnant women with confirmed neoplasms should not have noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(12):1162-1165. DOI: 10.1002/pd.5544.
- [32] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U *et al.* Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(8):1279-1286. DOI: 10.1373/clinchem.2010.144188.
- [33] Yu SC, Chan KC, Zheng YW *et al.* Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(23):8583-8588. DOI: 10.1073/pnas.1406103111.
- [34] Hu P, Liang D, Chen Y *et al.* An enrichment method to increase cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1):124. DOI: 10.1186/s12967-019-1871-x.
- [35] Qiao L, Yu B, Liang Y *et al.* Sequencing shorter cfDNA fragments improves the fetal DNA fraction in noninvasive prenatal testing[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 221(4):345 e341-345 e311. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.05.023.
- [36] Grati FR. Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing: a review of a common biological phenomenon[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 48(4):415-423. DOI: 10.1002/uog.15975.