

• 论 著 •

荧光原位杂交技术在羊水间期细胞产前诊断中的应用

李超强¹, 黎丽芬², 朱凯欣², 吴亚敏¹

(中山大学附属东华医院: 1. 生殖中心; 2. 检验科, 广东东莞 523110)

摘要:目的 探讨荧光原位杂交(FISH)技术在产前诊断中的应用价值。方法 采集 1 189 名孕 18~24 周孕妇的羊水标本, 用染色体 GLP13/21 探针和 CSP18/X/Y 探针对未培养的羊水细胞进行 FISH 检测, 并与羊水细胞染色体核型结果比较。结果 1 189 例羊水标本 1 175 例培养成功, 检出 41 例染色体异常, 35 例染色体多态性。1 189 例羊水标本 FISH 杂交均成功, 检出 29 例异常标本, 另有 6 例结果不能判定。29 例 FISH 结果异常中除 1 例因羊水培养失败无染色体核型对比外, 其余与染色体核型结果一致。6 例结果不能判定中 5 例因母血污染影响 X、Y 信号判断。结论 产前 FISH 检测法在诊断 5 种染色体数目异常中有较高的应用价值, 但存在检测假阳性和范围局限性, 不建议作为单独检测方法用于染色体异常的产前诊断。

关键词: 荧光原位杂交; 羊水细胞培养; 产前诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)02-0221-03

Application of fluorescence in situ hybridization technique in prenatal diagnosis of amniotic fluid cells

Li Chaoqiang¹, Li Lifen², Zhu Kaixin², Wu Yamin¹

(1. Department of Reproductive Center; 2. Department of Clinical Laboratory, Tung Wah Hospital of Sun Yat-sen University, Dongguan, Guangdong 523110, China)

Abstract: Objective To analyze the value of fluorescence in situ hybridization (FISH) in prenatal diagnosis of amniotic fluid cells. **Methods** 1 189 amniotic fluid specimens were collected from women with pregnancy 18 to 24 weeks, chromosome probe GLP13/21 and CSP18/X/Y were used in the FISH detection, and the results were compared with the result of chromosome Karyotype. **Results** A total of 1 175 amniotic fluid specimens in 1 189 patients were cultivated successfully, 41 cases with abnormal chromosome, 35 cases with chromosome polymorphism. FISH detection of all the 1 189 patients were successful, checked out 29 cases of abnormal specimens, and 6 specimens could not be judge. Except for 1 case in the 29 cases with FISH abnormal results for amniotic fluid cultivating failure, the FISH results of other 28 cases were consistent with the chromosome Karyotype. There were 5 cases with mother blood pollution in 6 undetermined cases was difficult to judge X and Y signals. **Conclusion** FISH technology has higher application value in prenatal diagnosis, but it is not recommended to use it as a separate method in prenatal diagnosis of chromosome abnormality due to the defects of detection range limitation and a false positive result.

Key words: fluorescence in situ hybridization; amniotic fluid cell culture; prenatal diagnosis

细胞遗传学检测是诊断羊水细胞染色体异常的金标准, 但获得结果约需 2 周时间。荧光原位杂交(FISH)技术可以在 24~48 h 内检测 95% 活婴染色体异常中的 5 种常见异常^[1-2], 缩短了患者等待时间。近年来, 随着 FISH 技术的改良、推广和成本降低, 产前诊断 FISH 快速检测法逐渐在国内各大医院开展^[3], 成为产前诊断的常规检测项目之一。但其结果能否直接应用于产前临床干预, 存在一定分歧。本文回顾性分析 1 189 例孕妇的羊水标本, 评价 FISH 快速检测在未培养羊水细胞中进行产前诊断的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2012 年 12 月本院产前门诊就诊, 高危、高龄(≥ 35 岁)、B 超检测胎儿异常及异常儿孕产史的孕妇 1 189 例。于孕 18~24 周行羊膜腔穿刺术, 抽取羊水 30 mL, 20 mL 用于细胞培养, 10 mL 用于 FISH 检测。

1.2 方法

1.2.1 羊水细胞培养及染色体核型分析 20 mL 羊水经离心收集细胞沉淀, 分 2 瓶接种于羊水细胞培养基, 置 37 °C、5% CO₂ 中培养 7~9 d, 期间视羊水细胞贴壁情况换液 1~2 次。细胞收集前 2 h 加入秋水仙素, 终质量浓度为 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞经胰酶消化, 常规低渗、固定和制片, 有必要时进行 C 显

带、G 显带分析核型。

1.2.2 FISH 检测 10 mL 羊水经离心收集细胞用于羊水间期细胞 FISH 分析, 采用北京金菩嘉公司的产前诊断试剂盒(GLP13/21 探针和 CSP18/X/Y 探针), 按照说明书操作进行。用 Imstar FISH3.0 系统进行荧光信号检测和分析。

1.2.3 FISH 结果判断 在荧光显微镜下观察信号, 随机计数 50 个细胞, 90% 以上的细胞正常提示为正常标本, 60% 以上细胞出现异常提示为异常标本, 如果结果无法判断, 则扩大计数到 100 个细胞。

2 结果

2.1 核型分析和 FISH 检测结果 1 189 例羊水培养成功 1 175 例, 失败 14 例, 培养成功率 98.8%。1 175 例核型分析中, 非整倍体 32 例, 结构异常 9 例, 染色体多态性 35 例。FISH 检测 1 189 例羊水标本, 成功率为 100%, 检出非整倍体 29 例, 另有 6 例异常细胞数比例未达到判定阈值而结果不能判定。见表 1。

2.2 FISH 检测正常与核型结果比较 1 189 例 FISH 杂交成功标本中, 结果判定为正常的 1 154 例(97.1%), 其中性染色体组成为女性 XX 的 549 例, 男性 XY 的 605 例, 在所检测 5 种染色体数目异常上与染色体核型分析一致。

表 1 FISH 检测异常结果与羊水染色体核型分析异常的比较(n)

异常类型	FISH 异常	核型异常
21-三体	20	19
13-三体	4	4
18-三体	3	3
X 单体	2	2
46,XY/47,XXY	1	1
22-三体	0	2
9-三体	0	1
46,XY/46,XX	5	0
其他*	0	9
合计	35	41

*:其他包括 46,XX,t(11;18)(q13;q21)1 例;46,XX,t(4;12)(q13;q21)1 例;46,XX,t(6;7)(q23;p13)1 例;46,XY,t(3;5)(q21;q31)1 例;45,XY,der(13;14)(q10;q10)1 例;46,XY,inv(2)(p11q13)1 例;46,XX,t(3;8)(q21;q13)1 例;46,XY,inv(Y)(p11q11)2 例。

2.3 FISH 检测异常与核型结果比较 29 例 FISH 结果异常中除 1 例 21-三体因羊水培养失败无核型对比外,其余与核型结果一致。6 例 FISH 结果不确定的标本均为性染色体信号异常,其中 1 例非血性标本 65.0% 细胞显示 XY 信号,35.0% 细胞显示 XYY 信号,经羊水核型分析为 46,XY(21)/47,XXY(9)嵌合体,其余 5 例均为母血污染的影响。

2.4 母血对 FISH 判定结果的影响 1 189 例羊水标本中有 55 例存在母血污染,其中 40 例肉眼未见红细胞的羊水标本中正常信号为(94.5±2.8)%;15 例肉眼血样羊水标本中 5 例出现 XY 信号为(78.5±5.5)%,XX 信号为(14.2±3.8)%,经染色体核型分析其性别组成均为 XY。

3 讨 论

FISH 技术具有快速、准确、结果直观等特点,目前国内许多医院都开展 FISH 技术用于产前诊断。对未培养羊水间期细胞进行 FISH 检测能弥补长期以来仅靠细胞遗传学进行产前诊断的不足和局限性,一定程度上避免了培养失败的缺陷,实现了快速诊断染色体异常的可能^[4]。有研究报告认为高龄、血清学筛查阳性标本的产前诊断可用 FISH 替代核型分析^[5-6],但也有学者认为不能完全取代^[7-8]。本研究用 1 189 例羊水标本同时进行染色体核型和 FISH 检测,分析产前 FISH 快速检测在羊水染色体异常诊断中的价值。

产前 FISH 快速检测法检测 1 189 例羊水间期细胞标本,成功率 100%,检出 29 例染色体数目异常,6 例异常细胞数比例低于阈值而结果不能判定。羊水标本培养成功 1 175 例,失败 14 例,培养成功率 98.8%,数目异常 32 例,结构异常 9 例,染色体多态性 35 例。FISH 检测异常中除 1 例因羊水培养失败无核型对比外,其余与羊水染色体核型结果一致,该例 FISH 结果异常而羊水细胞培养失败的孕妇经脐带血染色体核型分析,结果与 FISH 检测一致。13 例羊水培养失败而 FISH 结果阴性的孕妇不接受重新抽取羊水或抽脐带血,后经新生儿外周血染色体核型分析,其结果与 FISH 检测一致。目前常规 FISH 检测试剂在 5 种常见染色体异常检测中具有较好的应用价值,一定程度上能弥补羊水培养失败所带来的风险。

染色体数目异常是临床上最主要的染色体病,其中以 13 号、18 号、21 号、X、Y 染色体异常最为常见,占染色体非整倍体畸变的 95% 以上。目前产前诊断试剂盒主要对这 5 种染色体数目异常进行检测,不能检测染色体结构异常和多态性。相关文献显示,用 FISH 快速检测法取代细胞培养核型分析,有 1% 的异常标本被漏检^[9-10]。本研究结果显示,FISH 未能检出染色体异常核型共 12 例,占染色体异常的 29.3%(12/41),若以送检标本为基数,异常标本漏检率为 1.0%(12/1 189)。漏检的 12 例异常核型中,9 例为结构异常,均来源于父母,无自身突变,坚持继续妊娠,但从优生遗传方面,可以选择淘汰;其余 3 例为 22 号三体和 9 号三体,其活婴出生后存活时间短,但也有存活到成年的记录^[11]。35 例染色体多态性,除 1 例染色体多态的胎儿父母双方染色体未见明显异常外,其余父母有一方或两方染色体多态性。经 C 显带分析,增加部分为一条深染带,该例胎儿核型为 46,XX,15p+,考虑胎儿染色体异常为自身突变,建议终止妊娠。但家属根据其无任何遗传病家族史和有害物质接触史等坚持继续妊娠,产后发现婴儿具有颈软,抬头困难,发育不佳等表现。目前产前 FISH 快速法存在检测范围的局限性,对总体检测标本而言,FISH 检测异常标本漏检率低于 1%,但异常婴儿的出生对家庭、社会都是沉重负担。因此,需要羊水染色体核型来弥补产前诊断 FISH 快速检测缺陷^[12]。

1 189 例羊水标本中 55 例有母血污染,40 例离心后肉眼可见红色沉淀,15 例肉眼血性标本。40 例轻度母血污染的羊水标本正常的信号为(94.5±2.8)%,与染色体核型分析一致。15 例肉眼血样的羊水标本中 5 例出现 XY 信号为(78.5±5.5)%,XX 信号为(14.2±3.8)%,若基于羊水 FISH 信号,结果为 46,XX/46,XY 的嵌合体。本中心对 15 例母血污染严重的羊水标本培养 3~5 d 后观察,发现贴壁细胞团多于 2 个中等克隆团,然后用羊水培养基冲洗掉培养皿中的血细胞,重新加入羊水培养基进行培养,最终 15 例严重母血污染标本均培养成功。5 例 FISH 性别诊断为嵌合体的标本最终经染色体核型分析为 46,XY。基于部分母血污染会影响 FISH 检测结果,单纯 FISH 检测结果要慎重报告给孕妇,部分结果需羊水染色体核型结果的补充和验证。

综上所述,羊水标本受母源污染、各地区产前诊断水平差异和 FISH 异常核型漏检率等因素的影响,目前常规 FISH 快速检测法用于产前染色体异常诊断存在检测范围窄等局限性,不适合完全取代核型分析。但如果高度怀疑检测范围内染色体数目异常,而且不是肉眼的血性标本,采用 FISH 快速检测法能够快速、准确诊断染色体病因。因此,在产前诊断前医生应做好孕妇及家属有关 FISH 技术的优势及不足等遗传咨询工作,使孕妇及家属在充分知情下作出恰当的诊治方案抉择。

参考文献

[1] 刘晗,廖灿,黄以宁,等.应用优化荧光原位杂交技术诊断 110 例羊水间期细胞常见非整倍体[J].中华医学遗传学杂志,2010,27(4):453-456.
 [2] Bryndorf T,Lundsteen C,Lamb A,et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization:a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples[J]. Acta Obstet Gynecol Scand,2000,79(1):8-14.
 [3] 吴蓉,钟梅,卢建,等.改进荧光原位杂交技术快速产前诊断常见染色体异常[J].中华医学遗传学杂志,2011,28(6):658-660.
 [4] Leclercq S,Lebbar A,Grange G,et al. Optimized(下转第 224 页)

2.2 阳性菌株的耐药性分析 对 24 株阳性菌株用含药培养基进行菌株鉴定和耐药试验。结果显示, 24 株菌株中 9 株耐药, 耐药率为 37.5%; 其中 23 株为结核分枝杆菌, 8 株耐药, 其中有 2 株同时耐异烟肼和链霉素, 3 株同时耐异烟肼和利福平, 2 株仅对利福平耐药, 1 株仅对对氨基水杨酸耐药; 1 株为非结核分枝杆菌, 仅对卷曲霉素敏感。见表 1。

3 讨 论

虽然 3D 法培养基具备更利于细菌生长的培养基及更为敏感的检测系统, 但本研究结果显示 3D 法培养阳性率与罗氏法培养阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其原因可能是标本直接来源于病灶, 细菌滴度相当大, 因此两种方法均容易培养出细菌。

孙丽等^[5]曾报道 569 例面颈部淋巴结病变患者, 有 42.23% 患者为淋巴结结核, 与本文报道的 45.28% 相近。与其他标本培养相比较, 唐柳生等^[6]报道 AIDS 患者胸腔积液结核杆菌培养的阳性率为 31.60%; 欧汝志等^[7]报道 AIDS 患者痰结核菌培养有 36.20% 阳性; 唐雪春等^[8]报道 AIDS 痰培养结核菌阳性率为 27.68%; 唐柳生等^[9]报道 110 例 AIDS 患者脑脊液标本中分离出抗酸杆菌 12 株, 检出率为 10.90%; 13 例 AIDS 患者灌洗液结核菌培养阳性 3 例, 阳性率为 23.80%^[10]。所有受检标本中, 淋巴结组织培养的阳性率最高, 本文报道的例数虽然偏少, 但 AIDS 合并淋巴结结核仍需引起医务工作者重视。很多资料报道显示, AIDS 合并结核的感染率约为 15%^[11-13], 为主要的机会感染之一, 因此应该对 AIDS 患者各类标本中的分枝杆菌进行检查。

药物敏感度方面, 本文报道的 24 株菌株药敏测定结果有 9 株出现耐药, 耐药率为 37.5%, 在王志刚等^[14]报道的 187 例结核性胸膜炎抗结核药物耐药试验中, 其耐药率为 21%, 在张学丽等^[15]报道的 70 例复治病例中, 其耐多药构成比 15.7%, 高于本组报道。近年来, 分枝杆菌的耐药率不断上升, 给患者的抗结核药物治疗造成严重影响^[16], 异烟肼和利福平为耐多药的重要指标, 本组资料显示有 29.20% 的菌株对异烟肼耐药, 有 25.0% 的菌株对利福平耐药, 显示抗酸杆菌有出现耐多药上升的趋势, 在本组的 23 株结核分枝杆菌中, 2 株同时耐异烟肼和链霉素, 3 株同时耐异烟肼和利福平。王稳才等^[17]报道, 同时耐异烟肼、利福平等两种及两种以上药物者所占比例为 11.80%, 本文报道与其大致相符, 但高于张学丽等^[15]报道的 9.8%, 耐多药构成比。

综上所述, AIDS 合并结核性淋巴结炎情况相当严重, 并

且存在耐药和耐多药现象, 通过淋巴结抗酸杆菌的培养和耐药实验, 对 AIDS/TB 的诊断和治疗起着非常重要的作用。

参考文献

[1] 张栋梁, 孙伟波. 结核菌、艾滋病病毒双重感染的预防管理探讨[J]. 中国医药指南, 2011, 9(27): 30.
 [2] 王霖, 普冬, 张会芬, 等. 艾滋病合并淋巴瘤原因探查[J]. 中国医学创新, 2011, 8(27): 170-171.
 [3] 韩水金, 朱苏宝. 细针针吸活体诊断颈淋巴结结核的临床应用价值[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(26): 739-740.
 [4] 原寿基. 新发现传染病[M]. 福州: 福建教育出版社, 1995: 32-33.
 [5] 孙丽, 胡官春, 周永强, 等. 246 例面颈部结核性淋巴结炎的病理与临床诊断回顾性分析[J]. 口腔医学, 1995, 5(1): 94-100.
 [6] 唐柳生, 蒙志好, 廖光付, 等. 183 例胸水标本两种方法结核分枝杆菌培养及药物敏感性检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1565-1566.
 [7] 欧汝志, 黄绍标. 艾滋病合并结核病 189 例分析[J]. 中国社区医师, 2010, 12(9): 89.
 [8] 唐雪春, 刘平, 高晓娟. 艾滋病结核菌培养与药敏结果分析[J]. 中华中西医杂志, 2010, 8(3): 3-4.
 [9] 唐柳生, 廖光付. 110 例 AIDS 患者脑脊液抗酸杆菌培养与药敏结果分析[J]. 广西医学, 2011, 33(11): 1501-1502.
 [10] 唐柳生, 廖光付. 645 份纤支镜灌洗液结核菌培养结果及耐药分析[J]. 广西医学, 2012, 34(12): 233-235.
 [11] 蒙志好, 刘存旭, 苏凌松, 等. 艾滋病合并分枝杆菌感染药物敏感性监测[J]. 广西医学, 2009, 31(10): 1516-1518.
 [12] 李学哲. 艾滋病合并的结核菌感染临床分析[J]. 临床医学, 2009, 29(10): 30-31.
 [13] 韦彩云, 汤卓, 杜丽群. 艾滋病和结核病双重感染治疗管理概况[J]. 内科, 2009, 4(2): 269-271.
 [14] 王志刚, 成玉妹, 时晓艺. 187 例结核性胸膜炎结核分枝杆菌药敏检测探讨[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(23): 1770-1771.
 [15] 张学丽, 李丽, 张立, 等. 住院肺结核病人耐药结核菌的耐药分析[J]. 内蒙古中医药, 2010, 31(6): 68.
 [16] 王阿莉, 李卉. 快速检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 294-295.
 [17] 王稳才, 刘道恒, 张喜平. 136 例初治肺结核药敏结果分析[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(5): 643-644.

(收稿日期: 2014-11-20)

(上接第 222 页)

criteria for using fluorescence in situ hybridization in the prenatal diagnosis of common aneuploidies[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(4): 313-318.
 [5] 刘柯伶, 贾蓓, 汪丽萍, 等. 应用荧光原位杂交产前诊断染色体异常的临床价值[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(1): 36-39.
 [6] Boormans EM, Birnie E, Bilardo CM, et al. Karyotyping or rapid aneuploidy detection in prenatal diagnosis? The different views of users and providers of prenatal care[J]. BJOG, 2009, 116(10): 1396-1399.
 [7] 蒋雯婷, 龙飞, 倪琳, 等. 荧光原位杂交在染色体异常产前诊断中的应用研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(5): 604-608.
 [8] 贺方华. 荧光原位杂交在产前诊断中的作用探讨[J]. 中国计划生

育学杂志, 2013, 21(2): 113-116.
 [9] Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment[J]. Lancet, 2005, 366(9480): 123-128.
 [10] Dickinson JE, Harcourt E, Murch A. The selective use of rapid aneuploidy screening in prenatal diagnosis[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2009, 49(1): 28-33.
 [11] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 139-140.
 [12] 毛倩倩, 鲁莉萍, 陈铁峰, 等. 4008 例羊水细胞的染色体分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(1): 98-99.

(收稿日期: 2014-12-05)