生殖系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000920

荧光原位杂交技术对无创 DNA 产前检测阳性病例的诊断价值

张阳丽[1],李 荣[2],赵纯全[2],崔 瑾[1],詹 茜[1],白慧丽[1],程 伟[1],张玉洪[1]
（重庆医科大学附属第一医院 1. 临床分子医学检测中心;2. 妇产科,重庆 400016）

【摘 要】**目的**:探讨荧光原位杂交检测技术(fluorescence in situ hybridization,FISH)对无创 DNA 产前检测(noninvasive prenatal testing,NIPT)阳性病例的诊断价值。**方法**:对 22 例 NIPT 阳性病例的未培养羊水利用 FISH 技术进行胎儿 13、18、21、X 和 Y 染色体数目的检测,同时将所有病例的羊水或脐血细胞培养行常规染色体 G 显带染色体核型分析。应用 Kappa 检验比较 FISH 和染色体核型分析检测结果的一致性并进行分析。**结果**:22 例样本 FISH 检测结果中,18 例检测出胎儿染色体非整倍体异常,包括 13-三体 2 例、21-三体 11 例、18-三体 1 例、XXY/XY 嵌合型 1 例、XXY 型 1 例、XXXXY 型 1 例、XYY 型 1 例,余下 4 例未发现染色体数目异常。FISH 检测结果与染色体核型分析结果一致性极强(κ=1)。**结论**:NIPT 存在假阳性结果,阳性病例必须进行进一步产前诊断,FISH 技术具有快速,简便,准确的技术特点,是快速确诊的有效手段。

【关键词】荧光原位杂交;无创 DNA 产前检测;产前诊断;染色体非整倍体
【中图分类号】R446.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-10-10

Prenatal diagnostic value of the fluorescence in situ hybridization in positive cases of noninvasive prenatal testing

Zhang Yangli[1], Li Rong[2], Zhao Chunquan[2], Cui Jin[1], Zhan Qian[1], Bai Huili[1], Cheng Wei[1], Zhang Yuhong[1]
(1. Center for Clinical Molecular Medical Detection; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To study the prenatal diagnostic value of the fluorescence in situ hybridization (FISH) in positive cases of non-invasive prenatal testing (NIPT). ***Methods***: The number of fetal 13, 18, 21, X and Y chromosomes in mniotic fluid samples from 22 of NIPT positive cases was detected by FISH, as well as using G banding karyotypes analysis after cell culture. The consistency between the results of the FISH and karyotypes was compared by means of Kappa test. ***Results***: All samples of the 22 cases were successfully detected by FISH. The results showed 18 cases with fetal aneuploidy, including 2 cases of 13 trisomy, 11 cases of 21 trisomy, 1 cases of 18 trisomy, 1 case of XXY/XY chimeric type, 1 case of XXY, 1 case of XXXXY and 1 case of XYY and 4 cases with normal number of fetal chromosome. The consistency between the results of FISH and karyotype was extremely strong (Kappa=1). ***Conclusion***: NIPT needs further definite diagnosis due to its false positive result possibility. FISH is a simple, fast and efficient method for early prenatal diagnosis of NIPT positive cases.

【Key words】fluorescence in situ hybridization; noninvasive prenatal testing; prenatal diagnosis; detecting value, fetal chromosome aneuploidy

作者介绍:张阳丽,Email:muyezhang@126.com,
研究方向:临床分子诊断。
通信作者:张玉洪,Email:zhangyh1963@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31501207);重庆市教委科学技术研究基金资助项目(编号:KJ1500218);渝中区基础与前沿科技基金资助项目(编号:20150114)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160428.1535.008.html (2016-04-28)

新生儿染色体非整倍体病是遗传病中常见的病因，是影响人口素质的一个重大问题，为了避免遗传缺陷病患儿的出生，达到优生优育，对于高龄孕妇，血清学筛查高风险，前次怀孕胎儿有染色体异常，父母双方之一有染色体结构异常，有自然流产、畸胎、死胎或新生儿死亡的不良孕产史，有遗传病家族史，超声检查胎儿或羊水量异常，孕早期接触致畸物质等高危孕妇都有必要进行染色体病产前诊断[1]。通过母血胎儿游离 DNA 进行无创 DNA 产前检测（noninvasive prenatal testing，NIPT）是近年来发展起来的新技术，已用于胎儿性别、Rh 血型、以及胎儿染色体非整倍体等的检测。该技术具有无创、所需样本量少、高通量等优势，且在 13、21、18 号染色体及性染色体非整倍体异常的检测中比唐氏血清学筛查拥有更高的灵敏度及特异性。我国卫计委妇幼司也在 2015 年 1 月 15 日批准 108 家医疗机构开展 NIPT 高通量测序临床试点。因此，NIPT 正在逐渐成为临床常规方法[2-5]。但由于该技术尚处于起步阶段，不同检测机构实验水平的差异和标本本身因素如母血中存在的大量母亲自身游离 DNA 片段[6]等多方面原因会对其检测结果准确性造成影响。因此卫计委公布的高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范（试行）中也规定 NIPT 高风险的孕妇，应当建议其进行后续介入性产前诊断，不应当仅根据 NIPT 结果做终止妊娠的建议和处理。因此对 NIPT 阳性病例进行进一步产前诊断非常有必要。

传统的羊水或脐血培养后染色体核型分析是产前诊断金标准，但该方法存在耗时长，技术难度大，易受培养条件影响等不足之处。应用荧光原位杂交技术（fluorescence in situ hybridization，FISH）可直接检测未经培养的分裂间期细胞，而且具有快速、简便和特异的特点，从而能及早排除或确诊胎儿染色体异常，使医生合理选择后续诊疗方案，及时终止妊娠真阳性病例的异常胎儿，缓解假阳性病例孕妇及其家人的焦虑心理[7-8]。

本研究拟采用 FISH 技术对 22 例 NIPT 检测阳性病例进行进一步检测，同时将所有病例的羊水或脐血细胞培养行常规染色体 G 显带染色体核型分析，比对实验结果，并通过随访进行临床追踪。评价 FISH检测在 NIPT 阳性病例中的产前诊断价值。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选择 2013 年 5 月至 2015 年 07 月在本院产前诊断中心就诊，经 NIPT 提示胎儿 13、21、18 号染色体及性染色体非整倍体异常的孕妇 22 例。年龄在 22~42 岁之间，孕周在 18~30 周之间，其中 8 人为 35 岁以上高龄产妇，6 人 B 超显示胎儿畸形。其中 13-三体高危 3 例、21-三体高危 11 例、18-三体 2 例、性染色体异常 6 例，上述病例均行羊膜腔穿刺抽取羊水 25 ml，22 例均取 8 ml 进行羊水 FISH 检测，同时取 17 ml 进行羊水培养后染色体核型分析。所有孕妇均随访追踪，评价 FISH 检测在 NIPT 阳性病例中的产前诊断价值。所有孕妇均签署产前诊断知情同意书。

1.2 FISH 检测

1.2.1 标本预处理 将羊水标本离心后用 0.5% 胰酶/EDTA 溶液（购于 gibco 公司）消化，0.56% KCl 低渗溶液低渗等处理后用新鲜配制的固定液（3:1 甲醇:冰醋酸）固定，制成细胞悬液后滴片。将样片室温风干 2 h 以上，再以新鲜配置的胃蛋白酶工作液中消化 20 min，随后于 70%、85%、100%乙醇中梯度脱水，室温晾干备用。

1.2.2 杂交 将上述样片经 73 ℃水浴锅里变性 2 min，随后 70%、85%、100%乙醇梯度脱水，将探针从-20 ℃冰箱（实验所用探针为即用型探针购自雅培公司，分别为 CEP18/X /Y 混合探针和 LSI 13/21 混合探针），恢复至室温，混匀离心后按说明书取适量直接加在脱水后自然干燥的样片上，用封片胶封片后，放入杂交仪中 75 ℃变性 5 min，37 ℃杂交 8~24 h。

1.2.3 洗涤和复染 杂交完成后去除盖玻片。先后经 0.4×SSC/0.3% NP-40 液和 2×SSC/0.1% NP-40 洗涤及梯度乙醇脱水并室温下彻底风干后加 10 μl DAPI 2 复染，盖玻片封片，置暗盒于-20 ℃放置 15 min。上述过程均在红光照明暗室下操作。

1.2.4 FISH 检测结果判读 将样片从-20 ℃取出后，待其恢复室温，擦去冷凝水，于 OLYMPUS 荧光显微镜下镜检结果，选择背景干净、核膜完整，细胞相互间无重叠、核内杂交信号清晰明亮无弥散重叠、边缘清楚形态呈不规则圆形细胞，每组探针随机计数 50 个细胞，正常信号细胞比例≥90%判定为正常，异常信号比例≥60%判定为异常，若在两者之间增加计数细胞数至 200 个。用冷 CCD 照相系统拍下荧光信号，并用图像处理软件合成、保存结果。

注：CEP 18/X/Y 探针，绿色、橙红色、青色分别为 X 染色体着丝粒、Y 染色体着丝粒、18 号染色体着丝粒信号，LSI 13/21 探针，绿色和橙红色分别为 13 号染色体 13q14 区和 21号染色体 D21S259、D21S341、D21S342 区域信号

1.3 染色体制备与核型分析

于本院产前诊断实验室一般常规染色体 G 显带制备方法，按常规操作进行羊水或脐血细胞培养、染色体制备，G 显带，再行核型分析。

1.4 结果比对及临床追踪

分析 NIPT 阳性病例的 FISH 检测结果，将其与金标准方法染色体核型分析结果进行比对，采用 SPSS20.0 统计学软件对 FISH 和染色体核型分析结果进行 Kappa 检验，来判断不同检测方法所得结果是否具有一致性，Kappa 系数<0，极差；0~0.2，微弱；0.21~0.4，弱；0.41~0.6：中度；0.61~0.8：高度；0.81~1.0，极强[9]。并通过随访进行临床追踪。评价 FISH 检测在 NIPT 阳性病例中的产前诊断价值。

2 结 果

2.1 FISH 检测结果

22 例病例 FISH 检测均成功，其中 4 例 NIPT 结果为阳性的病例（其中包括 13-三体 1 例、18-三体 1 例、性染色体异常 2 例）未发现染色体数目异常，余下 18 例可见染色体数目异常，包括 13-三体 2 例、21-三体 11 例、18-三体 1 例、XXY/XY 嵌合型 1 例、XXY 1 例、XXXXY 1 例、XYY 1 例（图 1）。所有 FISH 检测结果均在取到检测样本后 48~72 h 之内检出（表 1）。

2.2 染色体核型分析结果及其与 FISH 检测结果比对

22 例病例中有 20 例羊水染色体核型分析成功，2 例羊水培养失败，随后行脐血穿刺后进行了脐血染色体核型分析成功。核型结果包括正常核型 4 例，异常核型 18 例。将 FISH 检测结果与染色体核型分析结果进行 Kappa 一致性检验，Kappa 值为 1，表明染色体核型分析结果与 FISH 检测结果一致性极强，结果显示所有 FISH 检测结果与染色体核型分析结果一致，从而确证了 4 例 NIPT 假阳性结果（表 1）。

表 1 NIPT 阳性病例的 FISH 检测及染色体核型分析结果比对

Tab.1 Comparison of results of FISH and karyotyping on positive cases of NIPT

NIPT异常类型	FISH检测结果		染色体核型分析结果		合计
	阳性	阴性	阳性	阴性	
21-三体	11	0	11	0	11
13-三体	2	1	2	1	3
18-三体	1	1	1	1	2
性染色体异常	4	2	4	2	6
合计	18	4	18	4	22

2.3 随访结果

随访追踪结果发现，22 例 NIPT 阳性病例中，有 13 例在得到 FISH 检测阳性结果后在我院进行遗传咨询后选择了终止妊娠，另有 5 例 FISH 检测阳性孕妇选择等待染色体核型分析结果确诊后终止妊娠。该 18 例病例的羊水或脐血染色体核型分析结果均证明了胎儿的染色体非整倍体异常。2 例 13-三体、1 例 18-三体引产时见明显面部畸形及四肢发育异常，包括并指多指等。15 例 21-三体未见明显畸形，但有宽眼距，低鼻梁及通贯掌等特征。引产胎儿组织用 FISH 进一步验证与羊水或脐血核型相符。余下 4 例假阳性病例在得到 FISH 检测结果后焦虑情绪得到了缓解，选择了正常妊娠，并于足月产下正常胎儿，随访至生后 6 个月。目前健康状况良好，未见异常。



A. 13-三体（3 绿 2 红）　B. 21-三体（3 红 2 绿）　C. 18 三体（1 红 1 绿 3 青）



D. XXXXY（4 绿 1 红 2 青）　E. XXY（2 绿 1 红 2 青）　F. XYY（1 绿 2 红 2 青）

图 1 FISH 检测结果（1 000×）

Fig.1 Results of FISH（1 000×）

3 讨 论

染色体异常是遗传病的常见原因，是自发性流产、死胎、早夭、性发育异常及先天性心脏病及智能发育不全的重要原因[1]。产前诊断可及早发现胎儿染色体异常、及时终止妊娠异常胎儿。传统的产前诊断流程多是先进行唐氏血清学筛查；筛查出的高危孕妇再通过抽取绒毛、羊水或脐血细胞培养，对分裂中期细胞核进行染色体核型分析以确诊胎儿是否为染色体异常。1997 年母血胎儿游离 DNA 成分被 Lo 等[10]人证实，由此通过检测母血浆中游离的胎儿 DNA 来诊断胎儿染色体数目成为可能。随着技术的发展逐渐形成了基于二代测序技术，通过大规模平行测序检测母亲外周血血浆中胎儿游离 DNA 成分，经过生物信息学分析，判断胎儿常见的 21、18、13 号及性染色体的数目异常的 NIPT 检测方法[2-5]，Nicolaides[11]、Dan[12]和 Norton[13]等人的前瞻性研究显示，NIPT 对 21-三体的检测灵敏度和特异度均是99%~100%，对 18-三体的检测灵敏度和特异度分别是 90%~100%和 99%~100%，对 13-三体的检测灵敏度和特异度分别是 93%~100%和 99%~100%，对性染色体非整倍体的检测灵敏度和特异度为 96%~100%和 95%~100%明显高于传统的血清学筛查60%~80%的检出率和 5%的假阳性率，加上其无创的技术特点，逐渐被医生和孕妇所接收，在医疗界产生了重要影响。但是由于该技术所检测的胎儿游离 DNA 片段是来自于母血浆而非直接来源于胎儿，而母血浆中存在大量的母亲自身游离 DNA 片段，此外结果的判读也是通过设定阈值而区分阴性和阳性，由此难免会产生错误的结果[14]。

本研究中选取的 22 例无创产前诊断阳性的病例中就有 4 例被确诊为假阳性，因此 NIPT 只能作为一种高级筛查性检测而不是确诊方法[15]，筛查阳性病例需要通过进一步检测以确诊。传统的染色体核型分析是产前诊断金标准，通常选择绒毛、羊水或脐带血为检测对象，经过一段时间的培养后对分裂相的细胞经过固定、制片、显带和染色才进行染色体数量与结构观察。绒毛和羊水的培养需要 10 d 左右，脐血也至少需经过 72 h 的培养，且培养条件要求高，培养技术人员培训耗时时间长，实验技术复杂，另外对标本的要求范围窄，羊水培养标本最佳孕周是 18~23 孕周间，若超过孕周，则培养失败可能性大。本实验中就有 2 例培养失败均为超过 24 周孕妇，重新行风险更大的脐血穿刺后行染色体核型分析。总的来说，染色体核型分析影响因素多，检测时间长，满足不了临床医生和孕妇的快速诊断需求。因 NIPT 的适用孕周为 12~26周，在无创产前检测日益普及的趋势下，大孕周无创产前检测结果高风险者大幅增加，特别是对于超过羊水染色体培养最佳孕周，而无创结果又提示21、18、13 染色体高风险者，FISH 技术能快速准确的进行诊断，FISH 技术的恰当运用能很好的弥补羊水染色体培养的不足。

FISH 技术是采用荧光标记的特异性 DNA 探针，根据探针与被检测样本细胞核中 DNA 序列的互补性，探针与样本 DNA 杂交后，在荧光显微镜下检测荧光信号从而检测样本染色体的数目及结构异常。FISH 技术作为一种快速检测技术在国外应用较早且较广泛，近年来，在我国也得到了越来越多研究者的关注与研究[16-17]。研究报道证明应用 FISH 技术可以对未培养羊水、脐血、绒毛甚至是流产组织进行检测，检测结果快速，简便，准确，既能快速产前诊断又能在核型分析细胞培养失败后起到补救检测作用，因此有着广泛的应用价值[18-19]，但这些研究均集中在 FISH 技术的方法学评价，其在 NIPT 阳性病例中的后续诊断价值，特别是超过羊水培养最佳孕周病例中的应用价值尚未见报道。

本次研究中选取了 22 例 NIPT 阳性病例受检者的未培养羊水，均在 24~72 h 之内得出结果，所有 FISH 检测结果均与染色体核型分析相符，从而及时确诊了 18 例 NIPT 阳性病例中胎儿染色体异常，使得临床医生和受检者及时做出了合理的选择，及时终止了妊娠异常胎儿，减少了阳性受检者中晚期引产的痛苦，而 4 例假阳性病例受检者及家属的焦虑情绪也得到了缓解，在完善进一步的其它检查后选择继续妊娠，足月产下了健康胎儿。由此表明 FISH 检测对孕周覆盖范围广，13~40 孕周均可，用量少且不需要培养，能检测间期细胞，操作步骤相对简单，结果准确，特异性灵敏性高，报告时间短，在 NIPT 检测阳性病例的进一步确诊过程中满足了临床医生和孕妇的快速诊断需求。但是由于 FISH 技术的探针设计的局限性使其在染色体结构重排和变异

异常的检测中受到了一定限制[20]，因此不能完全替代染色体核型分析。同时，本次研究收集病例数较少，将在后续的研究中扩大 NIPT 阳性病例的数目，进一步探索 FISH 技术在 NIPT 筛查阳性者产前诊断中的价值。让 FISH 这一老技术与新的产前筛查模式（NIPT）结合运用，使产前诊断的服务孕周范围进一步扩大。

综上所述，NIPT 胎儿染色体非整倍体检测存在一定比例的假阳性结果，阳性病例必须进行进一步产前诊断，FISH 技术具有快速、简便、成功率高、准确的技术特点，是快速确诊的有效手段。如果能够整合 NIPT、FISH 技术和染色体核型分析技术，形成血清学筛查—NIPT—FISH 检测—染色体核型分析的产前诊断流程，将为患者提供更为方便、快速、准确的染色体病产前诊断。

参 考 文 献

[1] Avent ND. Maternal plasma biomarkers for Down syndrome: presentand future[J]. Drugs Today(Barc), 2013, 49(2): 145-152.

[2] Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(6): 591-597.

[3] Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21791.

[4] Platt LD, Janicki MB, Prosen T, et al. Impact of noninvasive prenatal testing in regionally dispersed medical centers in the United States [J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 211(4): 368.e1-7.

[5] 刘红彦，吴 东，李 慧，等. 孕妇血浆胎儿游离 DNA 检测对胎儿染色体拷贝数异常的诊断意义[J]. 中华医学遗传学杂志，2012，29(4)：435-438.

[6] 何小玲，徐红兵. 母血胎儿游离 DNA 用于无创产前诊断染色体异常疾病准确性的系统评价[J]. 重庆医科大学学报，2013，38(10)：1130-1132.

[7] Ulmer R, et al. Diagnosis of an euploidy with fluorescence in situ hybridization(FISH); value in pregnancies with increased risk for chromosome aberrations[J]. Z Geburtshilfe Neonato, 2000, 204(1): 1-7.

[8] 肖红梅，谭跃球，李麓芸，等. 应用荧光原位杂交产前诊断未培养羊水细胞非整倍体[J]. 中华医学遗传学杂志，2005，21(6)：608-610.

[9] 李春波，何燕玲，张明园. 一致性检验方法的合理应用[J]. 上海精神医学，2000，12：228-232.

[10] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.

[11] Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2012, 207(5): 374.e1-6.

[12] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk actors[J]. Prenatal Diagnosis, 2012, 32(13): 1225-1232.

[13] Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 372(17): 1589-1597.

[14] Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-invasive chromosomal evaluation NICE study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18[J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(2): 137.e1-8.

[15] Hochstenbach R, Page-Christiaens GCML, Oppen ACC, et al. Unexplained false negative results in noninvasive prenatal testing: two cases involving trisomies 13 and 18[J]. Case Rep Genet, 2015(2015): 926545.

[16] Thein AT, Abdel-Fattah SA, Kyle PM, et al. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alnative to cytogenetics in prenatal diagnosis[J]. Prenat Diagn, 2000, 20(4): 275-280.

[17] Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Downes 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.

[18] Baumgartner A, vanHummelen P, Lowe XR, et al. Numerical and structural chromosomal abnormalities detected in human sperm with a combination of multicolor FISH assays[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1999, 33(1): 49-58.

[19] Thilaganathan B, Sairam S, Ballard T, et al. Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization[J]. BrJ obstet Gynaecol, 2000, 107(2): 262-266.

[20] Feldman B, Ebrah im SA, Hazan SL, et al. Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies[J]. Am J Med Genet, 2000, 90(3): 233-238.

（责任编辑：张辉洁）