

Applicazione della tecnica FISH per lo studio delle aneuploidie cromosomiche nella diagnosi prenatale: studio retrospettivo di 641 casi

Valeria delli Carri*, Carla Cesarano*, Nenad Bukvic*, M. Grazia Gallicchio*, M. Rosaria Pede*, Raffaele Antonetti*, Antonio Lacerenza**, Virgilio Piro**, Nicola Lacerenza[□], Maria Antonietta Basta[□], Filomena Lagonigro^{□□}, Salvatore Russo^{□□□}

* Dipartimento di Patologia Clinica, Direttore: dr. R. Antonetti, Azienda Ospedaliero-Universitaria OO.RR., Foggia

** Scuola di Specializzazione in Ostetricia e Ginecologia, Direttore: prof. F. Pietropaolo, Università degli Studi di Foggia

□ U.O. Semplice di Diagnosi Prenatale, Responsabile dr. N. Lacerenza, Azienda Ospedaliero-Universitaria OO.RR., Foggia

□□ Ostetrica Collaboratore U.O. di Ostetricia e Ginecologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria OO.RR., Foggia

□□□ U.O. di Ostetricia e Ginecologia II, Direttore dr. S. Russo, Azienda Ospedaliero-Universitaria OO.RR., Foggia

Riassunto

Obiettivo: Introdurre questo metodo diagnostico rapido per rilevare le aberrazioni cromosomiche numeriche normalmente identificate con il cariotipo convenzionale.

Metodi: Dal dicembre 2004 al settembre 2006 sono stati esaminati 641 campioni con l'analisi FISH in interfase utilizzando cellule non coltivate di liquido amniotico, mediante sonde di DNA cromosoma-specifiche per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y disponibili in commercio.

Risultati: Tutte le trisomie dei cromosomi 18 e 21 sono state rilevate dall'analisi FISH esaminando il numero di nuclei raccomandato dalla casa produttrice del kit, con l'eccezione di un caso di mosaicismo del cromosoma 13, individuato dopo aver analizzato 150 nuclei. In questo caso, l'analisi citogenetica convenzionale (cariotipo) ha individuato soltanto due cloni con trisomia del cromosoma 13 su 25 cloni esaminati in tre diverse colture di cellule da liquido amniotico.

Conclusioni: La nostra esperienza evidenzia che la FISH può costituire un metodo rapido nella diagnosi delle principali aneuploidie, particolarmente per le gravidanze vicine

INTRODUZIONE

Lo studio del cariotipo fetale nella diagnosi prenatale rappresenta un importante strumento offerto alla donna con un elevato rischio di concepire un feto con anomalie cromosomiche.

Con l'analisi citogenetica classica (cariotipo) è necessario studiare i cromosomi, ottenuti dalla coltura delle cellule del liquido amniotico in metafase, mediante una procedura di laboratorio i cui risultati solitamente sono disponibili in un tempo compreso fra 10 giorni e tre settimane. Inoltre, c'è un rischio di fallimento della procedura in circa l'1% dei casi. Ciò può generare un aumento del grado di ansia nella paziente, specialmente quando la gravidanza si colloca ai limiti legali della possibile opzione dell'interruzione terapeutica.

Le nuove tecniche di citogenetica molecolare, mediante l'uso di sonde cromosoma-specifiche e l'ibridizzazione in situ, hanno aumentato la richiesta di risultati rapidi con l'utilizzo di cellule non coltivate.

Il metodo FISH è una tecnica che permette l'identificazione, direttamente sui cromosomi, sui nuclei in interfase e nelle sezioni di

tessuto, di sequenze di DNA e RNA, omologhe alle sequenze usate come sonde (DNA o RNA).

All'inizio degli anni '90, la FISH su cellule non coltivate di liquido amniotico ha permesso l'individuazione di aneuploidie riguardanti i cromosomi 13, 18, 21, X e Y (D'Alton et al., 1997; Eiben et al., 1999; Evans et al., 1999), che costituiscono la maggior parte delle anomalie cromosomiche (80-95%) riscontrate in bambini nati vivi (Ratcliffe et al., 1970; Jacobs et al., 1974).

In conclusione, l'analisi FISH, anche se non in grado di analizzare tutte le anomalie cromosomiche, quali i riarrangiamenti strutturali, può essere utilizzata nella diagnosi prenatale, ma la sua natura sperimentale deve essere comprovata e alla gravida che si sottopone all'amniocentesi devono essere illustrati limiti e pregi della tecnica (American College of Medical Genetics, 1993).

MATERIALI E METODI

Campione

Il metodo FISH è stato utilizzato per 641/858 (74,7%) campioni di liquido amniotico inviati al Laboratorio di Citogenetica dal dicembre

ne alla 24a settimana di gestazione, ma dovrebbe essere considerato soltanto come un test di supporto alla procedura citogenetica standard utilizzata per rilevare altre anomalie cromosomiche.

Parole chiave

FISH in interfase
diagnosi prenatale
citogenetica
aneuploidie

Summary

Objective. Introduction this rapid diagnostic to detect the numerical chromosome aberrations normally identified by conventional karyotype.

Methods. We have examined 641 uncultured amniotic fluid cells with interphase FISH analysis from December 2004 to September 2006, using commercially available chromosome-specific DNA probes for chromosomes 13, 18, 21, X and Y.

Results. All trisomies of chromosomes 18 and 21 were detected by FISH analysis examining the standard number of cells recommended by kit producer, with the exception of one case of mosaicism of the chromosome 13, scored after having analysed 150 nuclei. In this case, the conventional cytogenetic analysis (karyotype) reported only two clones with trisomy of the chromosome 13 in 25 clones examined in three different amniotic fluid cells cultures.

Conclusions. Our experience indicates that FISH assay can be a rapid method for diagnosis of the major aneuploidies, especially for pregnancies close to 24 weeks of gestation, but should only be used as an additional test to standard cytogenetics required to detect other chromosome abnormalities.

Key words

Interphase FISH
Prenatal diagnosis
Cytogenetics
Aneuploidies

TABELLA 1. Indication for referral to cytogenetic analysis

Indications	FISH and Karyotype	Only Karyotype	Total amniocentesis
Advanced maternal age	370	153	523
Abnormal maternal serum biochemical screening	127	37	164
Maternal anxiety	111	21	132
Abnormal ultrasound examination	22	5	27
Abnormal nuchal translucency screening	11	1	12
Total	641	217	858

2004 al settembre 2006 (Tabella 1) e per i quali è stata effettuata anche l'analisi del cariotipo convenzionale mediante bandeggio QFQ. I campioni sono stati ottenuti prelevando ~20 ml di liquido amniotico mediante amniocentesi transaddominale tra la 16^a e la 23^a settimana di gravidanza. Le indicazioni all'esecuzione della amniocentesi erano: età materna superiore a 35 anni o oltre, screening biochimici alterati, aumentato valore della NT, presenza di markers ecografici (cisti dei plessi corioidei, modica ventricolomegalia, pielectasia, igroma cistico, polidramnios, onfalocela), ansia materna.

Dai ~20 ml di liquido amniotico, 2-3 ml sono utilizzati per l'analisi FISH e la restante quantità è usata per l'analisi citogenetica convenzionale. In breve la procedura prevede, secondo la casa produttrice, il trattamento con 2-5 ml di tripsina aggiunti al pellet per 15 minuti a 37°C e centrifugati dopo un vigoroso mescolamento. 5 ml di soluzione ipotonica (37°C) vengono così aggiunti al risospeso cellulare per 20 minuti, si centrifuga e successivamente le cellule vengono fissate con acido acetico/metanolo per 2 minuti a temperatura ambiente. Nuovo fissativo viene aggiunto per 30 minuti a 4°C e, dopo centrifugazione, vengono allestiti i vetrini con il campione ed asciugati a 37°C per 24 - 48 ore. Vengono preparati due vetrini per ogni campione e il restante risospeso cellulare conservato a -20°C. 10 µl di sonda vengono aggiunti alle cellule fissate e montate sul vetrino. Il DNA a doppia elica delle sonde e del campione viene denaturato a 73°C per 3 minuti e sottoposto ad ibridazione a 37°C per 1 ora in camera umida, usando la tecnolo-

gia Hybrite (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). Successivamente i vetrini ibridati vengono lavati ed esaminati al microscopio a fluorescenza.

Le sonde FISH usate sono prodotti commerciali (AneuVysion kit) disponibili presso la Vysis Inc. (Downers Grove, IL, USA) e costituite da due set, uno contenente una sonda satellite alfa (specifica per le sequenze alfoidi) per i cromosomi X, Y e 18 e l'altro contenente sonde locus specifiche per i cromosomi 13 e 21.

Una parte dello stesso campione di liquido amniotico, analizzato con la tecnica FISH in interfase, è esaminata con il cariotipo convenzionale mediante bandeggio QFQ (30 cellule provenienti da 15 differenti cloni).

RISULTATI

Dal dicembre 2004 al settembre 2006 sono stati esaminati presso il Laboratorio di Citogenetica degli Ospedali Riuniti di Foggia 858 liquidi amniotici. In 641 liquidi, l'analisi FISH in interfase ha mostrato un analogo risultato al cariotipo convenzionale. Per 217 campioni era stato richiesto soltanto il cariotipo standard.

L'avanzata età materna (370/641, 57,7%) e gli anomali risultati degli screening biochimici materni (127/641, 19,8%) sono state le più comuni indicazioni per l'indagine citogenetica FISH.

I risultati FISH sono stati confermati con l'analisi citogenetica classica in 639/641 campioni (99,7%). 622 campioni sono stati visti essere diploidi e 17 campioni aneuploidi: undici casi di trisomia del cromosoma 21, tre casi di trisomia del cromosoma 18, un caso

di mosaicismo del cromosoma 13, un caso di monosomia del cromosoma X e un caso di 47, XXY (Tabella 2). Per due campioni non sono stati riportati risultati (2/641, 0,31%) a causa dell'insufficiente numero di nuclei presenti. Non si è avuto alcun risultato falso-positivo o falso negativo. In un campione l'analisi FISH ha evidenziato una trisomia del cromosoma 21, il cariotipo finale ha, invece, mostrato un isocromosoma del braccio lungo del cromosoma 21 (46, XX(21)(q10). Inoltre, in due casi, a causa della contaminazione materna, si è verificato un errore nella determinazione del sesso fetale.

In tutti i casi di trisomia del cromosoma 21, le pazienti hanno deciso di interrompere la gravidanza.

Tra i 217 campioni esaminati solo con l'analisi citogenetica classica, 7 hanno presentato anomalie citogenetiche, tutti da pazienti la cui indicazione alla amniocentesi era stata l'età materna avanzata. Una traslocazione robertsoniana nel braccio lungo del cromosoma acrocentrico 14 e 21: 45, XX, der(14;21)(q10;q10); 2 traslocazioni robertsoniane coinvolgenti il cromosoma 13 e 14: 45, XY der(13;14)(q10;q10); una traslocazione reciproca tra il cromosoma 6 e il 13: 46, XY, t(6;13)(q23;q34); due inversioni pericentriche del cromosoma 2 e 8: 46, XX, inv(2)(p11.2q13) e 46, XX, inv(8)(p11.2q24.1); un mosaicismo del cromosoma 17 (2/25 cloni) (Tabella 3).

È importante ricordare che in un'analisi FISH è sempre presente un piccolo background, dovuto ai segnali aspecifici presenti nei nuclei esaminati.

DISCUSSIONE

I nostri dati hanno dimostrato che l'uso della FISH nella diagnosi prenatale può essere importante se si considera che la tecnica permette di ottenere un risultato in 24 ore, un tempo molto ridotto se comparato ai tempi di attesa dell'analisi citogenetica standard (fino a tre settimane).

Questo è importante soprattutto per le donne in età avanzata o con screening biochimici alterati, con aumentato valore dell'NT fetale, o in presenza di marker ecografici, in quanto può ridurre l'ansia e potrebbe contribuire ad evitare interruzioni di gravidanza inutili. D'Alton et al. (1997) enfatizza il ruolo dell'analisi FISH come una rapida conferma delle

TABELLA 2. Karyotype and FISH results in amniotic fluid samples

	FISH detected	False-positive	False-negative	No result	Totals
Diploid	622	-	-	2	624
Trisomy 13	1	-	-	-	1
Trisomy 18	3	-	-	-	3
Trisomy 21	11	-	-	-	11
Monosomy	1	-	-	-	1
X	1	-	-	-	1
XXY					
Totals	639	-	-	2	641

TABELLA 3. Chromosome abnormalities not detectable by FISH assay

1	Normal female	45, XX, der(14;21)(q10;q10)
2	Normal male	45, XY, der(13;14)(q10;q10)
3	Normal male	45, XY, der(13;14)(q10;q10)
4	Normal male	46, XY, t(6;13)(q23;q34)
5	Normal female	46, XX, inv(2)(p11.2q13)
6	Normal female	46, XX, inv(8)(p11.2q24.1)
7	Normal male	47, XY, +17 (2 clones); 46, XY (23 clones)

aneuploidie quando la paziente è più vicina ai limiti legali per l'interruzione di gravidanza e quando la decisione deve essere presa in tempi brevi.

Nel nostro Laboratorio, usando l'analisi FISH con il sistema AneuVysion, siamo stati in grado di escludere o confermare le trisomie più comuni e le aneuploidie sessuali.

Un limite all'applicazione dell'analisi FISH nella diagnosi prenatale può essere la possibile contaminazione da cellule materne o la presenza di cellule degenerate nei campioni che presentano un colore scuro, in quanto si riduce l'efficienza della ibridizzazione e si aumenta il rischio di segnali aspecifici. In caso di contaminazione materna del campione, per le gravidanze con un feto di sesso maschile, il problema è superabile in quanto la mix di sonde utilizzata già contiene quella specifica per il cromosoma Y. A tal proposito è necessario ricordare che nonostante il sangue materno non sia otticamente visibile nella provetta del campione di liquido amniotico (Winsor et al. 1999), le cellule materne possono costituire più del 20% delle cellule totali esaminate con il metodo FISH.

Per questo motivo, in un campione di liquido

amniotico, proveniente da una gravidanza a cui feto è di sesso femminile, devono essere esaminati più di 30 nuclei.

Accuratezza, attendibilità e riproducibilità del metodo FISH sono legate alla sensibilità e alla specificità delle sonde utilizzate. Le sonde alfa satellite cromosoma-specifiche (AneuVysion System), nel nostro caso, hanno "acceso" un segnale di ibridizzazione molto forte e distinto.

Tuttavia bisogna considerare che l'analisi FISH in interfase non permette l'identificazione di tutte le aberrazioni cromosomiche (traslocazioni, inversioni, marcatori cromosomici) per le quali è necessaria l'indagine citogenetica classica (cariotipo) o l'uso di sonde specifiche FISH. Poiché non si è ottenuto alcun risultato falso positivo e falso negativo, il nostro studio, in accordo con quanto riportato da altri lavori (Jalal et al. 1998, Estabrook et al. 1999), e in accordo con le linee guida (ACMG, 1993), conferma che l'analisi FISH può essere considerata come un test di supporto all'indagine citogenetica standard, soprattutto per le donne ad alto rischio e per le quali devono essere prese decisioni terapeutiche.

In conclusione, i risultati ottenuti conferma-

no che l'analisi FISH in interfase rappresenta un mezzo di diagnosi prenatale veloce ed attendibile, se utilizzato con criterio e coscienza.

BIBLIOGRAFIA

- American College of Medical Genetics. Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) policy statement. *Am J Hum Genetics* 1993; 53:526-527 and www.faseb.org/genetics/acmg/stds/e.htm
- D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D, Ward BE, Bianchi DW. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 769-776
- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of > 3,000 cases. *Fetal Diagn Ther* 1999;14: 193-197
- Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui TH, Snijders RJ, Wapner RJ, Miny P, Johnson MP, Peakman D, Johnson A, Nicolaides K, Holzgreve W, Ebrahim SAD, Babu R, Jackson L. International, collaborative assessment of 146000 prenatal karyotype: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescence in-situ hybridization are used. *Hum Reprod* 1999;14: 1213-1216
- Estabrooks LL, Sapeta M, Lytle C, et al. Prenatal interphase FISH using the AneuVysion probe set in over 10,000 samples. *Am J Hum Genet* 1999; 65: A162
- Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ, Syme J. A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. *Ann Hum Gen* 1974;37: 359-376
- Jalal SM, Law ME, Carlson RO, Dewald GW. Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 132-137
- Leung WC, Chitayat D, Scaward G, Windrim R, Ryan G, Barrett J Winsor EJT. Role of amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in patient management. *Prenat Diagn* 2001;21: 327-332
- Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, Fiddler M. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000;20: 215-220
- Ratcliffe SG, Stewart AL, Melville MM, Jacobs PA, Keay AJ. Chromosome studies on 3500 newborn male infants. *Lancet* 1970; 1: 121-122
- Thein ATA, Abdel-Fattah SA, Kyle PM, Soothill PW. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probe as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000;20: 275-280
- Winsor EJT, Dyack S, Wood-Burgess EM, Ryan G. Risk of false-positive prenatal diagnosis using interphase FISH testing: hybridization of alpha-satellite X probe to chromosome 19. *Prenatal Diagn* 1999;19: 832-836
- Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC, Niedzwiecki CA, Sandstrom MMCh, Bieber FR. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenat Diagn* 2001;21: 262-269