

Rapid-FISH jako szybka metoda wykrywania najczęstszych liczbowych aberracji chromosomowych w diagnostyce prenatalnej u kobiet z grupy wysokiego ryzyka

Rapid-FISH – fast and reliable method of detecting common numerical chromosomal aberrations in prenatal diagnosis

Łacmańska Izabela, Stembalska Agnieszka, Ślęzak Ryszard, Kozłowska Joanna, Makowska Izabela, Czernomazowicz Halina, Pesz Karolina A., Śmigiel Robert, Jakiel Anna, Sasiadek Maria Małgorzata

Katedra i Zakład Genetyki, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Wstęp: W ostatnich kilku latach znacznie zwiększyły się możliwości diagnostyczne w zakresie badań prenatalnych. Wiąże się to między innymi ze stosowaniem metod, które pozwalają na skrócenie okresu oczekiwania na wynik. Jedną z takich technik, Rapid-FISH (rapid fluorescence in situ hybridization), umożliwia diagnostykę prenatalną liczbowych aberracji chromosomów 13, 18, 21, X i Y bezpośrednio po pobraniu płynu owodniowego. Metoda pozwala na otrzymanie wyniku w ciągu 2-5 dni. Czas ten w przypadku klasycznej analizy cytogenetycznej (oznaczanie kariotypu płodu) wynosi około 21 dni i jest uzależniony głównie od tempa wzrostu, koniecznej w tym badaniu, hodowli amniocytów.

Cel pracy: Celem pracy była ocena skuteczności metody Rapid-FISH w wykrywaniu liczbowych aberracji chromosomów 13, 18, 21, X i Y w jądrach amniocytów uzyskanych z płynu owodniowego pobranego od kobiet w ciąży.

Materiał i metody: U 161 kobiet z grupy wysokiego ryzyka przeprowadzono prenatalne badanie genetyczne, technikami klasycznej analizy cytogenetycznej i Rapid-FISH z użyciem zestawu AneuVysion firmy Vysis.

Wyniki: badania Rapid-FISH wykrywające aneuploidie chromosomów 13, 21, 18, X i Y zostały w 100% potwierdzone przy użyciu technik cytogenetyki klasycznej. U dwóch pacjentek z prawidłowym wynikiem badania Rapid-FISH stwierdzono w klasycznym badaniu cytogenetycznym obecność aberracji chromosomowych niemożliwych do zdiagnozowania metodą Rapid-FISH.

Wnioski: Rapid-FISH jest wiarygodną i szybką metodą diagnostyczną, która powinna być stosowana jako rutynowa w ciążyach z wysokim ryzykiem wystąpienia aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y u płodu.

Słowa kluczowe: **Rapid-FISH / diagnostyka prenatalna / aneuploidia /**

Adres do korespondencji:

Izabela Łacmańska
Katedra i Zakład Genetyki, Akademia Medyczna we Wrocławiu
50-368 Wrocław, ul. Marcinkowskiego 1,
e-mail: lacz@gen.am.wroc.pl

Otrzymano: 26.04.2007

Zaakceptowano do druku: 25.09.2007

Abstract

Objective: In recent years, new possibilities of prenatal diagnosis have opened up, due to the development of techniques which guarantee shorter time of obtaining results. One of those methods, called Rapid-FISH (rapid fluorescence in situ hybridization), for detecting numerical aberrations of chromosomes 13, 18, 21, X and Y without culturing, enables to have the results in 2-5 days. The time necessary to obtain fetal karyotype result with the usage of the classical cytogenetic methods is about 2-3 weeks and depends mainly on the culture growth rate.

Design: The aim of the study was to evaluate the effectiveness of the Rapid-FISH technique in detecting numerical chromosome aberrations of 13, 21, 18, X and Y in amniocytes' nuclei from amniotic fluid.

Materials and Methods: Rapid-FISH and cytogenetic analysis has been performed for 161 pregnancies in the Department of Genetics at Wrocław Medical University during years 2005 and 2006. The FISH was performed using AneuVysion kit (Vysis), according to a standard protocol.

Results: All normal and abnormal results were confirmed by classical cytogenetic method (GTG banding and karyotyping). Additional chromosomal aberrations, not possible to be detected in FISH, were observed in case of two patients with normal results from FISH analysis.

Conclusions: Rapid-FISH is a reliable and fast method for detecting numerical chromosomal aberrations in prenatal diagnosis and should be implemented as a routine diagnostic procedure in pregnancies with high risk of fetal aneuploidy (of chromosomes 13, 18, 21, X i Y).

Key words: **Rapid-FISH / prenatal diagnosis / aneuploidy /**

Wstęp

Rozwój technik molekularnych i cytogenetycznych otworzył w ostatnich latach nowe możliwości diagnostyczne w zakresie genetycznych badań prenatalnych. Do diagnostyki wprowadzane są między innymi metody, które umożliwiają skrócenie czasu oczekiwania na wynik oraz zmniejszenie kosztów badań prenatalnych [1, 2].

Dotyczy to w szczególności wykrywania częstych zmian genetycznych, jak aneuploidie (zmiany liczbowe) chromosomów 13, 18, 21, X i Y. Wysokie ryzyko ich wystąpienia u płodu jest główną przyczyną skierowań na badania przedurodzeniowe. Wprowadzanie do diagnostyki różnych metod pociąga za sobą konieczność zmian obowiązujących procedur. Przykładem propozycji nowych standardów postępowania mogą być rekomendacje *UK National Screening Committee* [3]. Zalecają one wykonanie u wszystkich pacjentek, u których prowadzane są inwazyjne badania prenatalne, testów pozwalających na szybkie wykrycie najczęstszych aneuploidii u płodu.

Jedną z tych metod, zwana Rapid-FISH (szybka fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*), polega na hybrydyzacji fluorescencyjnie znakowanej sondy genetycznej z wybranymi sekwencjami danego chromosomu. Metoda przeprowadzana jest na jądrach interfazowych bezpośrednio po pobraniu niewielkiej ilości płynu owodniowego (1-2ml), co umożliwia uzyskanie wyniku badania genetycznego w ciągu 2-5 dni. Dotychczas obowiązująca klasyczna analiza cytogenetyczna (oznaczanie kariotypu), związana z koniecznością zakładania hodowli komórkowej (amniocytów), pozwala na otrzymanie wyniku w czasie od 10 do 21 dni od pobrania 15-20ml płynu owodniowego [4, 5, 6, badania własne].

Analiza wyników Rapid-FISH opiera się na ocenie liczby wybranych chromosomów po zastosowaniu sond molekularnych. Najczęściej stosowany zestaw sond dostępnych komercyjnie zawiera istotne, zwłaszcza w odniesieniu do diagnostyki

najczęstszych aneuploidii (ewentualnie triploidii), sondy centromerowe dla chromosomów X, Y i 18 oraz sondy specyficzne dla krytycznych regionów chromosomów 13 i 21.

Metodą Rapid-FISH nie można wykryć zrównoważonych i niezrównoważonych aberracji strukturalnych chromosomów czy aneuploidii chromosomów innych niż 13, 18, 21, X i Y. Ryzyko populacyjne ich wystąpienia u płodu, poza ściśle określonymi, podanymi poniżej wyjątkami, jest jednak niskie. Stwierdzone w badaniu USG wady wrodzone u płodu, obecność zrównoważonych aberracji strukturalnych chromosomów u jednego z rodziców czy występowanie aberracji chromosomowych niezrównoważonych u dziecka/dzieci z poprzedniej ciąży są wskazaniem do przeprowadzenia pełnej diagnostyki cytogenetycznej (analiza klasyczna), poszerzonej ewentualnie o metody typu FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*), PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) czy mikromacierze CGH (porównawcza hybrydyzacja genomowa) [5, 7, 8].

Biorąc pod uwagę możliwości diagnostyczne, proponuje się stosowanie Rapid-FISH jako jedynej, rutynowej genetycznej diagnostyki prenatalnej w ciążach z wysokim ryzykiem wystąpienia aneuploidii u płodu [1, 8].

Cel pracy

Celem pracy była ocena skuteczności metody Rapid-FISH w wykrywaniu liczbowych aberracji chromosomów 13, 18, 21, X i Y w jądrach amniocytów uzyskanych z płynu owodniowego pobranego od kobiet w ciąży.

Materiał

Materiałem do badań były amniocyty płynu owodniowego, który pobrano podczas amniopunkcji od 161 kobiet (przedział wieku 20-47 lat) w Klinice Wad Rozwojowych Płodu we Wrocławiu w latach 2005-2006. Najliczniejszą grupę, 104 osób (64,6%), stanowiły pacjentki w wieku powyżej 35 lat. W grupie wiekowej 20-34 lata było 57 kobiet (35,4%).

Rapid-FISH jako szybka metoda wykrywania...

Wskazaniem do wykonania inwazyjnych badań prenatalnych u 119 pacjentek (74% badanych) było jedno z następujących:

- 1) wiek powyżej 35 lat u 74 kobiet (46%),
- 2) nieprawidłowy wynik testu PAPP u 13 kobiet (8%),
- 3) nieprawidłowy wynik testu potrójnego u 10 kobiet (6%),
- 4) wady stwierdzone u wcześniej urodzonych dzieci u 8 kobiet (5%),
- 5) nieprawidłowa przezierność karkowa płodu (NT powyżej 3,0mm w 11-13(+6 dni) tygodniu ciąży) u 7 kobiet (4%),
- 6) wady płodu wykryte w badaniu USG u 7 kobiet (4%).

U pozostałych 41 pacjentek (25,5% badanych) stwierdzono co najmniej dwa wskazania do wykonania amniopunkcji, takie jak:

- 1) wiek powyżej 35 lat i nieprawidłowy wynik testu PAPP-PA,
- 2) wiek powyżej 35 lat i NT powyżej 3mm oraz
- 3) wiek powyżej 35 lat, nieprawidłowy wynik testu PAPP-PA i nieprawidłowa przezierność karkowa.

Jedną pacjentkę zakwalifikowano do badania inwazyjnego ze względu na stwierdzone nosicielstwo zrównoważonej translokacji chromosomowej.

Większość amniopunkcji wykonano między 15 a 19 tygodniem ciąży (87,5%). W niewielkim odsetku ciąż badanie inwazyjne przeprowadzono w 14 tygodniu (7,5%) i powyżej 20 tygodnia ciąży (5%).

Po pobraniu, płyn owodniowy był każdorazowo wykorzystany do przeprowadzenia bezpośredniego badania Rapid-FISH oraz analizy metodami cytogenetyki klasycznej (oznaczanie kariotypu) po hodowli amniocytów. Równoległe zastosowanie obu metod diagnostycznych pozwoliło na weryfikację otrzymanych wyników badania Rapid-FISH.

Metody

Rapid-FISH

I. Izolacja amniocytów z płynu owodniowego

Płyn owodniowy w ilości 2-3ml był wirowany przez 8 minut 300xg w 10ml probówkach (Sarstedt). Następnie supernatant został zlany, a do osadu dodano 2,5ml roztworu trypsyny/EDTA, wcześniej ogrzanego do temp 37°C.

Zawiesinę komórek w trypsynie inkubowano 20 minut w 37°C, następnie wirowano przez 8 min. 300xg. Zlano część supernatantu pozostawiając nad osadem 0,5ml i dodano 2,5ml 0,075M KCl.

Zawiesinę komórek w KCl inkubowano 15 minut w 37°C, następnie dodano 5 ml utrwalacza (metanol:kw. octowy w stosunku 3:1) i wirowano przez 8 min. 300xg.

Zlano supernatant a osad ponownie został przemyty utrwalaczem. Po odwirowaniu (8 min. 300xg), zawiesinę inkubowano 30 min. w 4°C a następnie znowu wirowano przez 8 min. 300xg. Zlano supernatant a osad amniocytów został zawieszony w około 0,5ml utrwalacza.

Część uzyskanego osadu amniocytów naniesiono na oznakowane szkiełka podstawowe. Pozostała część niewykorzystanego materiału została umieszczona w -20°C (bankowanie materiału).

II. Przygotowanie preparatów do badania FISH

Osad amniocytów, naniesiony na szkiełka podstawowe, został przygotowany do badania przy użyciu FISH pretreatment kit (Vysis 32-801270), według procedury firmy Vysis.

III. Barwienie i analiza

Badanie Rapid-FISH wykonano, wykorzystując zestaw sond AneuVysion (13,18,21,X,Y) Multi-Color 5 Probe Panel (Vysis 5J3830), zgodnie z procedurą załączoną do odczynników. Do analizy fluorescencyjnej zastosowano mikroskop Nikon Eclipse E600 (USA) oraz oprogramowanie ISIS firmy MetasystemsDE (Niemcy).

W każdym przypadku analiza co najmniej 50 jąder interfazowych przeprowadzona była przez dwóch diagnostów laboratoryjnych. U 6 pacjentek z powodu niskiej jakości preparatów badanie oparte było na ocenie 25 jąder interfazowych.

Analiza metodami cytogenetyki klasycznej.

Badanie cytogenetyczne przeprowadzono wg metod standardowych, po założeniu dwóch, niezależnych hodowli amniocytów [6]. W każdym przypadku analizowano po 15 metafaz z hodowli.

Wyniki

Badanie metodą Rapid-FISH na jądrach interfazowych wykonano u 161 pacjentek. Równoległe w każdym przypadku zostało przeprowadzone badanie cytogenetyczne sposobem klasycznym (badanie kariotypu płodu), którego wyniki m.in. stanowiły weryfikację metody Rapid-FISH.

Prawidłowe wyniki badania Rapid-FISH otrzymano u 146 pacjentek (90,7%). Wyniki te zostały potwierdzone klasycznym badaniem cytogenetycznym w 140 przypadkach.

W 4 przypadkach nie uzyskano wyniku badania kariotypu płodu (brak wzrostu hodowli komórek), w związku z czym nie zweryfikowano prawidłowego wyniku badania Rapid-FISH.

U dwóch kolejnych pacjentek otrzymano prawidłowe wyniki Rapid-FISH, natomiast w badaniu cytogenetycznym komórek płodu stwierdzono aberracje strukturalne chromosomów:

- 1) naddatek materiału genetycznego nieznanego pochodzenia na chromosomie 18 w układzie mozaikowym z linią prawidłową oraz
- 2) rodzinna zrównoważona translokacja robertsonowska pomiędzy chromosomami 13 i 14.

Nieprawidłowe wyniki badania Rapid-FISH uzyskano u 15 pacjentek (9,3% przypadków).

Badaniem cytogenetycznym potwierdzono 14 z 15 nieprawidłowych wyników. W jednym przypadku (trisomia chromosomu 13 u płodu w badaniu Rapid-FISH) po hodowli nie uzyskano materiału do analizy kariotypu płodu.

Wśród nieprawidłowych wyników, 5 stwierdzono u płodów płci żeńskiej (trisomia 21 w dwóch przypadkach, monosomia X w dwóch i trisomia X w jednym przypadku), a 10 u płodów płci męskiej (trisomia 13 w jednym przypadku, trisomia 18 w dwóch przypadkach, trisomia 21 w czterech przypadkach (w tym 2 przypadki mozaicyzmu 47,XY,+21/46,XY), kariotyp 47,XXY w jednym przypadku oraz kariotyp 69,XXY (triploidia) w 2 przypadkach)).

Dyskusja

W ostatnich latach, między innymi dzięki rozwojowi nowych metod z dziedziny genetyki i biologii molekularnej, wzrosło znaczenie nieinwazyjnych i inwazyjnych badań prenatalnych w diagnostyce wad wrodzonych i chorób uwarunkowanych genetycznie. Świadczyć o tym może chociażby, obserwowane w naszej Poradni Genetycznej w latach 2006 i 2007 w stosunku do roku 2004, zwiększenie liczby porad prenatalnych i amniopunkcji (odpowiednio o 35% i 65%).

Rosnąca liczba wykonywanych inwazyjnych badań prenatalnych (głównie amniopunkcji) powoduje konieczność stosowania nowych, szybkich metod diagnostycznych [1, 2, 3, 8].

Wprowadzenie do diagnostyki prenatalnej metody Rapid-FISH pozwala na uzyskanie wyniku badania nawet po 24 godzinach od momentu pobrania płynu owodniowego. Obserwowana w naszych badaniach 100% czułość metody, a tym samym brak wyników fałszywie dodatnich czy ujemnych, w zakresie wykrywania liczbowych aberracji chromosomów 13, 18, 21 X i Y, świadczy o wysokiej specyficzności tej techniki. Dane te są zbieżne z wynikami badań z innych ośrodków, gdzie przy zastosowaniu metody Rapid-FISH w znacznie większych grupach badanych, uzyskano jedynie 0-0,003% wyników fałszywie dodatnich [9, 10, 11, 12].

Obserwowana w naszej pracy 2-krotnie większa częstość aberracji chromosomowych u płodów płci męskiej może wynikać ze stosunkowo niewielkiej liczby wykonanych badań prenatalnych.

Prawidłowego wyniku badania Rapid-FISH nie potwierdzono badaniem cytogenetycznym w 2 przypadkach. Stwierdzone w kariotypach płodu aberracje strukturalne nie są bowiem możliwe do zdiagnozowania przy użyciu zastosowanej techniki fluorescencyjnej.

Badanie Rapid-FISH zastosowano tu jako badanie dodatkowe, ponieważ w obu tych przypadkach istniały wskazania do wykonania klasycznej analizy cytogenetycznej, takie jak:

- 1) wady u płodu w badaniu USG oraz
- 2) nosicielstwo translokacji zrównoważonej między chromosomami 13 i 14 u jednego z rodziców.

Uzasadnia to stosowanie badania Rapid-FISH jedynie w przypadku ciąży z wysokim ryzykiem wystąpienia aneuploidii u płodu.

Wyniki przedstawionych przez nas badań potwierdzają dużą przydatność szybkiego testu Rapid-FISH w wykrywaniu aberracji liczbowych chromosomów 13, 18, 21 oraz chromosomów płci. Wnioski te są zgodne z wynikami innych autorów [2, 11, 12, 13].

Dużą zaletą badania Rapid-FISH jest krótki okres oczekiwania na wynik. Wynik badania Rapid-FISH był wydany w ciągu 5 dni roboczych, natomiast wynik otrzymany dzięki klasycznej analizie chromosomów po 10-21 dniach od pobrania płynu owodniowego.

Dodatkowym plusem badania Rapid-FISH jest jego niższy koszt w porównaniu do kosztu badania prenatalnego wykonanego technikami cytogenetyki klasycznej. Wprawdzie metoda Rapid-FISH wymaga zastosowania mikroskopu fluorescencyjnego i sond fluorescencyjnych, ale zważywszy na ostateczny łączny koszt odczynników, pracy diagnosty laboratoryjnego oraz amortyzacji sprzętu jest to technika tańsza.

Rapid-FISH pozwala na znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wynik, co z punktu widzenia ewentualnych dalszych losów ciąży, ma ogromne znaczenie.

Szybkie otrzymanie prawidłowego wyniku badania może wpływać na zmniejszenie u pacjentki stresu związanego z niepokojem o stan zdrowia płodu. W związku z tym rutynowe stosowanie tej metody jako jedynej w ciążach z wysokim ryzykiem wystąpienia aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y jest całkowicie uzasadnione.

Wnioski

Wiarygodność i szybkość metody Rapid-FISH w wykrywaniu najczęstszych liczbowych aberracji chromosomów stanowi podstawę do zaproponowania wprowadzenia nowego algorytmu postępowania w genetycznej diagnostyce prenatalnej.

Postulujemy o rozpoczęcie w Polsce, podobnie jak ma to miejsce w innych krajach Europy [3, 8], dyskusji o stosowaniu tej metody, jako jedynej, rutynowo wykonywanej w ciążach z wysokim ryzykiem wystąpienia aneuploidii chromosomów 21, 13, 18, X i Y u płodu.

Piśmiennictwo

1. Caine A, Maltby A, Parkin C, [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. *Lancet*. 2005, 366, 123-128.
2. Liehr T, Ziegler M. Rapid prenatal diagnostics in the interphase nucleus: procedure and cut-off rates. *J Histochem Cytochem*. 2005, 53, 289-291.
3. Rodriguez de Alba M, Vermeesch J. The fortieth anniversary of prenatal karyotyping: time for a birthday party or a memorial service? *E.C.A. Newsletter*. 2007, 19, 13-21.
4. Bocian E, Jakubów-Durska K, Mazurczak T. Retrospektywna analiza 1043 wyników prenatalnych badań cytogenetycznych w kontekście przydatności diagnostycznej FISH interfazowej. *Ginekol Pol*. 2001, 72, 449-455.
5. Bocian E. Diagnostyka cytogenetyczna chorób genetycznych kryteria i zasady procedury diagnostycznej oraz systemu kontroli jakości badań. *Diag Lab*. 2001, 37, 13-42.
6. Priest J, Rao K. Prenatal Chromosome diagnosis. The AGT cytogenetics laboratory manual. Ed. Barch M, Knudsen T, Spurbeck J. *New York: Lippincott-Raven Publishers*, 1997, 199-258.
7. Constantinou M, Kałużewski B. Wykorzystanie techniki FISH w diagnostyce aberracji chromosomowych trudnych do zidentyfikowania za pomocą klasycznych technik cytogenetycznych. *Diag Lab*. 2001, 37, 77-86.
8. Leung W, Lao T. Rapid aneuploidy testing, traditional karyotyping, or both? *Lancet*. 2005, 366, 97-98.
9. Tepperberg J, Pettenati M, Rao P, [et al.]. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn*. 2001, 21, 293-301.
10. Weremowicz S, Sandstrom D, Morton C, [et al.]. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenat Diagn*. 2001, 21, 262-269.
11. Witters I, Devriendt K, Legius E, [et al.]. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Prenat Diagn*. 2002, 22, 29-33.
12. Wyandt H, Tonk V, Huang X, [et al.]. Correlation of abnormal rapid FISH and chromosome results from amniocytes for prenatal diagnosis. *Fetal Diagn Ther*. 2006, 21, 235-240.
13. Ulmer R, Pfeiffer R, Kollert A, [et al.]. Diagnosis of aneuploidy with fluorescence in situ hybridization (FISH); value in pregnancies with increased risk for chromosome aberrations. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2000, 204, 1-7.