

FISH INTERFASICA PRENATALE PER ANEUPLOIDIE X, Y, 21, 13, 18

La tecnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization, ibridazione in situ non radioattiva) consente la localizzazione e il numero di localizzazioni di una qualsiasi sequenza di DNA su preparati di cromosomi metafasici e nuclei interfascici .

La FISH su cellule del liquido amniotico non coltivate viene utilizzata routinariamente per la ricerca, in tempi brevi, delle aneuploidie dei cromosomi: 13, 18, 21, X e Y. Il risultato è tecnicamente disponibile entro 24/48 ore.

Tuttavia questo accertamento non deve essere considerato un'alternativa all'analisi del cariotipo ma un test aggiuntivo, preliminare e parziale: solo il cariotipo eseguito con tecniche convenzionali permette la definizione dell'assetto cromosomico fetale.

QUANDO ESEGUIRE LA FISH INTERFASICA

Generalmente questo test viene eseguito qualora vi sia necessità clinica di una diagnostica d'urgenza.

MODALITA' DI ESECUZIONE DEL TEST

Prima di offrire questa tecnica come diagnostica, si ritiene utile che ciascun laboratorio si costruisca un proprio standard sia per la classificazione delle osservazioni sia per l'interpretazione dei risultati.

La ricerca di aneuploidie nei nuclei interfascici infatti comporta notevoli difficoltà nell'interpretazione dei risultati: il numero dei segnali nelle cellule interfasiche può variare e alcuni nuclei, anche se normali, potrebbero non presentare due segnali.

Lo standard dovrebbe essere costruito analizzando campioni positivi e negativi noti.

1. Sonde

La procedura di questo test si basa sull'utilizzo di sonde commerciali e non, che riconoscono:

- sequenze alfoidi o altre sequenze ripetute, per il riconoscimento di cromosomi quali X, Y, 18.
- sequenze a singola copia per il riconoscimento di regioni specifiche di cromosomi quali 13,21.

Ogni nuovo lotto di sonde marcate per FISH da utilizzare a scopo diagnostico deve essere sottoposto a validazione. Questa comporta il controllo di:

1. Specificità del target: consiste nel verificare che la sonda sia idonea a identificare l'alterazione cromosomica responsabile della patologia in studio (per esempio che mappi all'interno della regione critica di una determinata sindrome).
2. Sensibilità analitica (% di metafasi o interfasi con il pattern di ibridazione atteso),
3. Specificità analitiche (% di segnali che ibrida con il locus corretto).

Nel caso di sonde commerciali i requisiti sono garantiti dalla Ditta produttrice/fornitrice.

La maggior parte delle sonde commerciali sono state validate per uso di ricerca e non a scopo diagnostico. Tuttavia la letteratura nazionale ed internazionale ne dimostrano l'affidabilità e quindi l'idoneità per uso diagnostico.

2. Esecuzione

Allestire preparati di nuclei non coltivati con **elevato** standard di qualità.

3. Lettura ed interpretazione dei risultati

Per la lettura e l'interpretazione dei risultati si raccomanda quanto segue:

- Devono essere analizzati solamente i nuclei integri, non sovrapposti e con contorni facilmente identificabili.
- Devono essere valutati un minimo di **50** nuclei interfasici in cui si riconoscano i segnali per ciascuna sonda utilizzata. Nei casi di ambiguità di lettura (es. mosaici, ecc.) si deve estendere l'analisi ad un numero maggiore di 50 nuclei. E' auspicabile che ogni campione venga analizzato indipendente da due diversi operatori.
- La soglia di lettura (includente la qualità dei segnali ed il numero dei nuclei marcati sul totale dei nuclei presenti) deve essere definita per ogni laboratorio.
- Si devono seguire i protocolli forniti dalle ditte per quanto attiene alle sonde commerciali, oppure protocolli standardizzati nei laboratori in cui vengono utilizzate sonde non commerciali. Qualora vengano utilizzate sonde non commerciali è necessario applicare le verifiche che ne garantiscono la sensibilità. E' comunque buona norma affiancare casi-controllo per tutte le sonde utilizzate.
- Nei casi in cui il liquido amniotico presenti contaminazione evidente da sangue materno il test è sconsigliato

REFERTAZIONE

I risultati della FISH devono essere riportati in accordo con la nomenclatura ISCN 1995.

Nel referto devono essere indicati (come per ogni referto FISH) l'origine della sonda, la sua identificazione, il numero di cellule analizzate, i risultati dell'ibridazione.

Inoltre nel referto va sottolineato che il risultato essendo ottenuto con FISH interfascica si riferisce solo esclusivamente alle regioni riconosciute dalle sonde utilizzate.

Si consiglia di segnalare la necessità di un colloquio con il Genetista, che spieghi il limite del test e ne commenti l'esito soprattutto quando si emette un risultato corrispondente ad una patologia.

ARCHIVIAZIONE

Debbono venire conservate almeno due immagini fotografiche/digitalizzate per ogni caso e per ogni differente esperimento di FISH. Occorre archiviare anche la copia non elaborata di ciascuna immagine. Infatti l'elaborazione dell'immagine potrebbe permettere manipolazioni che renderebbero difficile verificare a posteriori se tali immagini riflettono veramente il dato reale.

Inoltre va archiviata anche una scheda che riporti in dettaglio le osservazioni eseguite su ciascun campione.

CONSIDERAZIONI GENERALI

Si sottolinea l'importanza che il laboratorio abbia esperienza di FISH.

Si ribadisce il concetto di seguire strettamente i protocolli forniti dalle ditte per quanto attiene alle sonde commerciali, oppure protocolli standardizzati nei laboratori in cui vengono utilizzate sonde non commerciali. In questo modo soltanto i mosaicismi dovrebbero costituire un limite del test.

E' importante sottolineare che ciò che si evidenzia è relativo alla regione riconosciuta dalla sonda. Particolare attenzione deve essere posta nei casi in cui ci sia la presenza di un unico segnale dato che sono segnalate in letteratura variazioni di sequenze ripetute alfoidi che potrebbero non essere evidenziate dalla sonda perchè molto poco rappresentate.

Questo test presenta elevata sensibilità e specificità nonostante negli ultimi anni vi siano state alcune segnalazioni di falso positivo e falso negativo. A questo proposito M. George et al. nel 2003, sulla base di una review della letteratura, riportano (su 18.000 casi informativi) che questa metodica presenta una sensibilità del 96.9% ed una specificità del 99.96% se comparata alle tecniche di citogenetica convenzionali. Inoltre un lavoro di Tepperberg *et al.*, del 2001 (su 5.197 casi) combinati con i dati di un trial clinico (1379 casi) riporta alti livelli di riproducibilità e accuratezza suggerendo un valore predittivo positivo del 100% con esclusione del cariotipo 45,X per il quale il valore predittivo positivo è del 98.6% mentre il valore predittivo negativo è 100% per tutte le aneuploidie con esclusione di

quelle relative al cromosoma 18 (99.8%) e al cromosoma 13 (99.6%). Inoltre Witters *et al.*, nel 2002, riportano uno studio retrospettivo su 5049 casi consecutivi in cui è stata effettuata la FISH interfascica per diagnosi di trisomia 21 in cui non sono stati rivelati falsi positivi e si è attribuito al test 100% di sensibilità e specificità, mentre viene riportato un caso di falso positivo per trisomia 21 (Weremowicz *et al.*, 2001).

Indirizzi utili:

Linee-guida dell'American College of Medical Genetics : <http://www.acmg.net/>

Linee-guida del Canadian College of Medical Genetics:

http://www.hrsrh.on.ca/genetics/CCMG_gui.htm#L4

Australian Government Department of Health and Ageing, 2003, Linee-guida del National Pathology Accreditation Advisory Council:<http://www.health.gov.au/npaac/docs/cytogen.htm>

Bibliografia citata

AM George, P Oei, I Winship

False-positive diagnosis of trisomy 21 using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) on uncultured amniotic fluid cells

Prenat Diagn 2003; 23: 302–305

J Tepperberg, M.J Pettenati, PN Rao, CM Lese, D Rita, H Wyandt, S Gersen, B White, MM Schoonmaker

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.

I Witters, K Devriendt, E Legius, G Matthijs, D Van Schoubroeck, FA Van Assche, J-P Fryns

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.

S Weremowicz, DJ Sandstrom, CC Morton, A Niedzwiecki, M McH Sandstrom, FR Bieber

Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases

Prenat Diagn 2001; 21: 262–269.