

The-Hung Bui, överläkare, centrum för fostermedicin, kvinnokliniken, Huddinge Universitetssjukhus (*the-hung.bui@ks.se*)

Elisabeth Blennow, docent, överläkare

Magnus Nordenskjöld, professor, överläkare; samtliga vid institutionen för molekylärmedicin, kliniskt genetiska enheten, Karolinska sjukhuset, Stockholm

Nya analysmetoder ger svar om kromosomavvikelse efter 1–2 dagar

■ Sedan fosterdiagnostik för kromosomavvikelse introducerades i början av 1970-talet har denna baserats på en fullständig kromosomanalys och karyotypering av fostervattenceller, och senare även av moderkaks-celler när moderkaksprov taget i första trimestern introducerades i mitten av 1980-talet. Fullständig kromosomanalys kräver att cellerna odlas och därefter blockeras i metafasstadiet eftersom kromosomerna först då kan analyseras på ett tillfredsställande sätt med hjälp av olika kromosombandningstekniker. Genom åren har cellodlingstiden kunnat förkortas avsevärt med hjälp av modernare cellodlingsmedier. Emellertid tar det idag som regel 10–14 dagar innan ett fullständigt kromosomanalys-svar på fosterceller föreligger. Denna väntetid upplevs negativt av många par.

Interfas-FISH-analyser

Förekomst av en numerisk kromosomavvikelse (t ex trisomi 21) i ett fosterprov kan sedan några år analyseras inom 1–2 arbetsdagar med hjälp av FISH-teknik (fluorescent in situ-hybridisering) på vilande fosterceller (fostervatten- eller moderkaks-celler i interfas) utan krav på långvarig cellodling och celldelning. Vanligen undersöker man om det föreligger ett normalt antal kromosom 13, 18, 21 samt könskromosomer, eftersom dessa kromosomer svarar för majoriteten av numeriska kromosomavvikelse i en lågriskpopulation.

Testegenskaper för interfas-FISH-analys med DNA-sonder för kromosom 13, 18, 21 samt könskromosomer har beräknats i en färsk metaanalys av olika studier där en fullständig kromosomanalys också utförts på samma fostervattenprov [1]. Det finns en nästan hundra procentig överensstämmelse mellan metoderna för de kromosomer som avses. FISH-tekniken på interfasceller är dock arbetsintensiv och fortfarande dyr. Den används därför av många centra i Sverige och andra länder enbart på vissa indikationer (vanligen avvikelser hos fostret upptäckta vid ultraljudsundersökning) och då som komplement till en fullständig kromosomanalys.

Kvantitativ fluorescent PCR (QF-PCR)

En alternativ teknik med samma ändamål som interfas-FISH är kvantitativ fluorescent polymeraskedjereaktionsteknik (QF-PCR) på moderkaks- eller fostervattenceller genom molekylär amplifiering av repeterade sekvenser i olika polymorfa lokus på till exempel kromosom 13, 18, 21 samt könskro-

SAMMANFATTAT

Kromosomanalys på odlade fostervatten- och moderkaks-celler har en stor diagnostisk säkerhet, och metoden används därför rutinmässigt vid samtliga kliniskt genetiska avdelningar i Sverige.

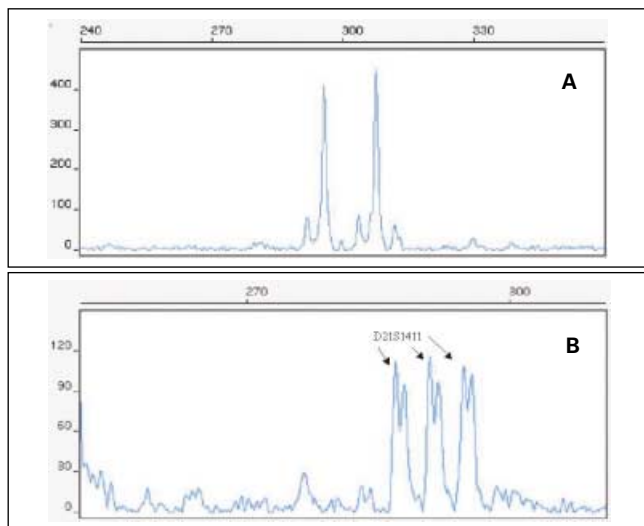
Det tar som regel 10–14 dagar innan ett fullständigt kromosomanalys-svar på fosterceller föreligger. Denna väntetid upplevs negativt av många par.

Nya analysmetoder på fostervatten- eller moderkaks-celler utan behov av cellodling tillåter ett svar på 1–2 dagar för de vanligaste numeriska kromosomavvikelse.

Strukturella kromosomavvikelse kan dock inte upptäckas med dessa metoder.

mosomerna (Figur 1). Under det senaste året publicerades två större serier. I en analys av 5 000 fostervattenprov där fullständig kromosomanalys också utfördes på samma prov fann man 100 procent konkordans mellan metoderna för trisomi 13, 18, 21 och triploidi. Totalt diagnostiserades 96,3 procent korrekt av de avvikelser som potentiellt kunde detekteras med de DNA-sonder som användes. Andelen falskt negativa var 3,7 procent, samtliga för könskromosomavvikelse, och andelen falskt positiva 0 procent [2].

I en annan studie rapporterade Kathy Mann och medarbetare [3] om deras erfarenhet under ett års tid av multiplex QF-PCR där en blandning av olika primer-par för polymorfa repeterade sekvenser på kromosom 21, 13 och 18 användes i ett »one-tube test«. 1 148 fostervattenprov, 188 moderkaksprov och 37 prov från annan fostervävnad analyserades. Enstaka misslyckade amplifieringar inträffade i initialt skede. Man lyckades dock få fram ett svar i 98 procent av fallen. I 2 procent av fallen (N=22) blev analysen icke-informativ på grund av maternell cellkontaminering. En fullständig kromosomanalys utfördes också på samtliga prov. Inget falskt positivt



Figur 1. Bilden visar QF-PCR-analys av fosterceller. I **A** ses 2 toppar som representerar alleler för en polymorf markör på kromosom 21. Figuren visar att fostret har 2 alleler, vilket är normalt. **B** visar ett foster som har tre alleler för en kromosom 21-markör. Fyndet betyder att detta foster har tre kromosomer 21, dvs trisomi 21 (Downs syndrom). Från CyberGene AB, Huddinge.

eller negativt prov hittades. I nästan samtliga fall blev analyserna klara inom 1–2 dagar. En annan fördel med QF-PCR-analys är att man kan upptäcka maternell cellkontaminering, vilket kan vara omöjligt att diagnostisera med interfase-FISH eller kromosomanalys när fostret är kvinnligt.

Fördelar och begränsningar

Kromosomanalys på odlade fostervatten- och moderkaxsceller har en stor diagnostisk säkerhet, och metoden används därför rutinmässigt vid samtliga kliniskt genetiska avdelningar i Sverige och de flesta genetiska laboratorier utomlands där fosterdiagnostik bedrivs. Det finns ett önskemål från alla parter om ett snabbt svar vid fosterdiagnostik. Både interfase-FISH-analys och QF-PCR på fostervatten- eller moderkaxsceller tillåter ett svar inom 1–2 dagar för de vanligaste numeriska kromosomavvikelserna (trisomi 21, trisomi 18, trisomi 13 och de numeriska könskromosomavvikelserna).

Båge metoderna har begränsningar. Interfase-FISH används för närvarande i Sverige och utomlands som ett komplement till en fullständig kromosomanalys vid kliniskt behov av ett snabbt svar. En utvärdering visar dock att cirka 1/3 av de kromosomuppsättningar som avviker skulle kunna missas om enbart interfase-FISH-analys skulle användas i stället för fullständig kromosomanalys. Denna begränsning gäller även för QF-PCR-metoden. Det bör dock framhållas att flertalet av de missade avvikelserna utgörs av balanserade strukturella kromosomavvikelser utan patologisk betydelse för det väntade barnet. [4]. Sådana fynd kan dock ha stor genetisk betydelse vid reproduktion och för genetisk vägledning av barnen [4].

Interfase-FISH skulle kunna användas för att enbart besvara en riktad fråga, till exempel om fostret har trisomi 21 (Mb Down). Detsamma gäller för QF-PCR om ytterligare studier kan bekräfta dess diagnostiska tillförlitlighet. Fördelen med QF-PCR är att metoden kräver en mindre mängd fosterceller och är mindre arbetskrävande än interfase-FISH, då PCR lämpar sig för rationell hantering och stordrift. En utvärdering av denna metod pågår på Karolinska sjukhuset.

Omkring 90 procent (≈7 000 prov/år i vårt land) av alla kromosomanalys på foster utförs för att det föreligger en förhöjd risk för autosomala trisomier på grund av moderns ålder (framför allt Down syndrom). Denna frågeställning tycks

besvaras med lika hög säkerhet med QF-PCR som med vanlig kromosomanalys men på kortare tid (1–2 dagar) och till en betydligt lägre kostnad. Nackdelen är att man skulle kunna förbise enstaka ovanliga kromosomavvikelser som kan upptäckas med karyotypering. Totalt rör det sig om cirka 1 fall på 1 000 analyser, det vill säga 7–8 »missade« kromosomavvikelser/år. Det är ett politiskt snarare än medicinskt ställningstagande hur mycket resurser man skall använda för att hitta dessa ovanliga fall. Det förefaller rimligare att i stället använda resurserna till att erbjuda fler kvinnor med förhöjd risk fosterprov. Med i Sverige använda urvalsrutiner förbises 70 procent av alla foster med kromosomavvikelser, medan andra länder som erbjuder lika många fosterprov hittar 70 procent eller fler genom användningen av bättre urvalsmetoder [5].

Referenser

1. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridisation (FISH): 2-year multicenter retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 2001;21:293-301.
2. Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amniocentesis for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17:115-18.
3. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Shu CY, Scriven PN, Docherty Z, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001;358: 1057-61.
4. Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui TH, Snidjers R, Wapner RJ, et al. International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in situ hybridization were used. *Hum Reprod* 1999;14:1213-6.
5. Bui TH. Förbättrade metoder för upptäckt av Downs syndrom hos foster. *Läkartidningen* 2002;99:1923-4.

SUMMARY

New analysis methods provide answers regarding chromosome aberrations in 1–2 days

The-Hung Bui, Elisabeth Blennow, Magnus Nordenskjöld
Läkartidningen 2002;99:3601-2

During the last decade, new tools have been made available to clinical genetics laboratories through the technologies developed for gene scanning, sequencing, detection of short tandem repeats (STRs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs). Two methods (interphase fluorescence in situ hybridization, FISH, and quantitative fluorescence PCR, QF-PCR assay) have been introduced recently for the rapid prenatal diagnosis of numerical chromosome abnormalities within 1–2 days after sample collections, thus obviating the 7–14 days delay needed for cell culture associated with conventional chromosome analysis. Most commonly, probes or STRs specific for chromosomes 13, 18, 21, X and Y are used as, depending on the indications for invasive tests, numerical abnormalities involving these chromosomes account for the vast majority of the chromosome aberrations identified prenatally. The advantage of QF-PCR over inter-phase FISH is that the former is considered substantially more cost-effective, in particular when larger sample numbers are processed.

Correspondence: The-Hung Bui, Dept of Molecular Medicine, Karolinska sjukhuset, SE-171 76 Stockholm, Sweden (the-hung.bui@ks.se)