

ASPECTE CALITATIVE ÎN DIAGNOSTICUL CITOGENETIC PRENATAL

Quality aspects of prenatal cytogenetic diagnosis

Drd. Gabriela Popescu¹, Conf. Dr. Adriana Stana^{1,2}

¹Spitalul Clinic Filantropia, București

²Universitatea „Titu Maiorescu“, București

REZUMAT

Obiective. Optimizarea calității culturilor celulare și a preparatelor metafazice obținute prin cultivarea amniocitelor și identificarea celor mai importanți factori care ar putea interveni în diagnosticul prenatal al anomaliilor cromozomiale fetale.

Material și metodă. Am analizat sistematic efectul volumului și aspectului lichidului amniotic, vârstei materne și gestaționale și tipului de mediu asupra culturilor pe termen lung a celulelor din 561 de probe de lichid amniotic

Rezultate. Lichidele amniotice hemoragice sau intens hemoragice au dus la o prelungire a timpului de cultură și la o scădere a numărului de colonii/slide. Pe de altă parte, vârsta maternă și vârsta gestațională la momentul amniocentezei au avut o influență importantă asupra calității preparatelor metafazice.

Concluzii. Variațiile în aspectul lichidului amniotic, vârsta maternă și cea gestațională au avut efecte semnificative asupra calității analizei citogenetice.

Cuvinte cheie: diagnostic prenatal, fluid amniotic, preparate metafazice

ABSTRACT

Objectives: Optimization of the quality of cell culture obtained by cultivating amniotic fluid cells and the quality of metaphases preparations and identification of the most important factors that should interfere with prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities.

Material and methods: The effect on the outcome of our standard amniotic fluid cell long-term culture procedure of volume and appearance of the 561 submitted AF specimens, week of gestation and maternal age in which the specimen was taken and culture medium was systematically investigated.

Results: Bloody or grossly bloody AF increases culture time and decreases number of clones/slide. On the other side, the maternal and the gestational age at amniocentesis had a great influence on metaphase quality.

Conclusions: Variation in appearance of the amniotic fluid, maternal and the gestational age have significant effects on quality of cytogenetic analysis.

Key words: prenatal diagnosis, amniotic fluid, metaphases preparations

Abrevieri: AF – fluid amniotic

Îmbunătățirea metodelor de analiză citogenetică urmărește două obiective principale:

- obținerea de preparate metafazice cromozomiale de calitate, fără suprapuneri de cromozomi sau metafaze „sparte“, „împrăștiate“;
- obținerea unui marcaj clar al cromozomilor prin diferite tehnici de bandare, în urma cărora aceștia să apară ca o succesiune de benzi întunecate/clare specifice, cu dimensiuni și

intensitate caracteristice fiecărei perechi de cromozomi (1).

Pentru optimizarea calității culturii amniocitelor am urmărit să identificăm factorii care influențează doi parametri importanți: numărul de colonii/slide și timpul necesar obținerii unui număr suficient de metafaze analizabile.

În cazul preparatelor microscopice, am urmărit influența mai multor factori asupra altor doi para-

Adresa de corespondență:

Drd. Gabriela Popescu, Spitalul Clinic Filantropia, Bd. Ion Mihalache Nr. 11, București

e-mail: popescu-dg@rdslink.ro

metri definatorii ai calității unei metafaze: gradul de suprapunere cromozomială și gradul de împrăștiere metafazică.

MATERIAL ȘI METODE

I. Criterii de includere a gravidelor în grupul cu risc de anomalie cromozomială fetală. Pentru lotul de studiu format din 561 de femei gravide investigate în cadrul Spitalului Clinic Filantropia și centrului GeneticLab, s-a constatat că cea mai frecventă indicație pentru procedură a fost vârsta maternă avansată cu screening pozitiv, urmată de rezultatul screening-ului pozitiv pentru trisomia 21 și 18 (pentru gravide mai tinere de 35 de ani). Frecvența indicațiilor pentru amniocenteză este prezentată în Fig. 1.

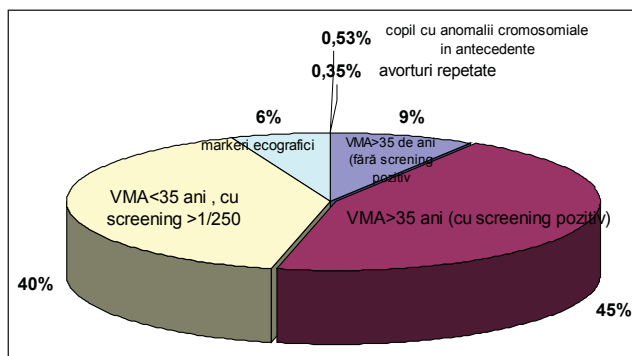


FIGURA 1. Distribuția indicațiilor pentru amniocenteză

II. Obținerea cariotipului fetal prin analiza cromozomială a celulelor fetale

Celulele lichidului amniotic pot fi cultivate pe termen lung prin 2 metode: în suspensie (T-flask) și *in-situ* (coverslip) (2,3). Metoda de lucru este schematizată în Fig. 2.

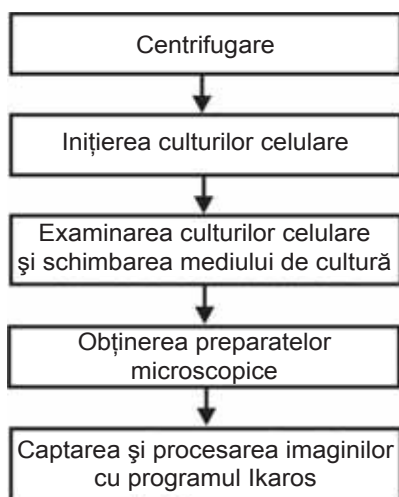


FIGURA 2. Procedura standard pentru cultura de lichid amniotic

REZULTATE ȘI DISCUȚII

a) Distribuția anomaliilor fetale cromozomiale.

Pentru lotul de gravide studiat, ponderea cea mai mare a avut-o trisomia 21 omogenă (46,7%), urmată de trisomia 21 în mozaic (25%). Pentru trisomiile 18 și 13, procentele înregistrate au fost de 12,5%, respectiv 3,12%. În ceea ce privește raportul pe sexe al anomaliilor cromozomiale fetale depistate citogenetic, raportul M/F a fost de 19:13, respectiv de 1:0,68. Distribuția anomaliilor cromozomiale este reprezentată în figurile de mai jos.

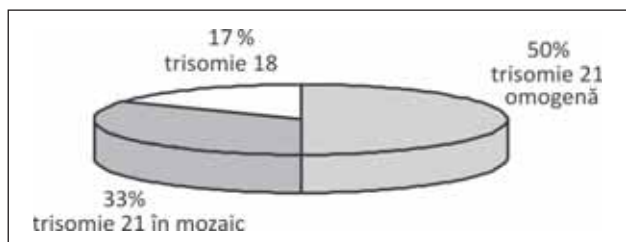


FIGURA 3. Reprezentarea grafică a distribuției anomaliilor cromozomiale fetale

b) Evaluarea calității preparatelor metafazice

Calitatea unui preparat microscopic se apreciază în funcție de 2 parametri: gradul de împrăștiere pe lamă al cromozomilor (suprapunerea cromozomială) și prezența/absența citoplasmei. Acești parametri depind de o serie de factori biologici: vârsta maternă, vârsta gestațională, aspectul, volumul și densitatea celulară (4,5), dar și de condițiile în care are loc sacrificarea culturii celulare: tratamentul hipotonic și compoziția fixatorului), precum și condițiile de mediu ambiant (6,7,8). Am evaluat în continuare influența mai multor factori asupra acestor parametri de calitate: vârsta maternă, vârsta gestațională, aspectul, volumul și densitatea celulară.

Analizând factorii ce influențează calitatea preparatelor metafazice, am observat că vârsta maternă este cel mai important dintre aceștia. Vârsta maternă a influențat semnificativ ($p < 0,05$) atât gradul de suprapunere cromozomială, într-o dependență direct proporțională (coeficientul de corelație $p = 0,79$), cât și gradul de împrăștiere metafazică (coeficientul de corelație $p = 0,91$), rezultate prezentate în Tabelul 1.

TABELUL 1. Influența vârstei materne asupra calității preparatelor metafazice

Vârsta	Grad de suprapunere cromozomială			Grad de împrăștiere al metafazelor	
	Grad I	Grad II	Grad III	Moderat	Accentuat
< 30 ani	9,8%	11%	10,5%	14%	8%
30-34 ani	9%	14%	11%	14,5%	8,3%
35-39 ani	10,6%	14,2%	19%	15%	9%
40 și peste	12%	15%	14%	22%	11%

Aplicând testele statistice Anova, am observat o scădere semnificativă a numărului de colonii cu deprecierea calității probei de lichid amniotic ($P < 0,001$). Totodată, s-a remarcat o creștere semnificativă a timpului necesar obținerii metafazelor analizabile microscopic cu creșterea gradului de contaminare sanguină. Coeficientul de corelație Pearson ($r = -0,97$) indică o relație invers proporțională a TAT cu scăderea numărului de colonii (Tabelul 2).

TABELUL 2. Influența aspectului lichidului amniotic asupra calității culturii celulare

Aspectul lichidului amniotic	Nr. colonii/5 zile	Nr. colonii/slide	TAT (turn-around time)
limpede	5,2 colonii/slide	7,3 colonii/slide	9,5 zile
ușor hemoragic	4,9 colonii/slide	5,9 colonii/slide	10,2 zile
moderat hemoragic	4,7 colonii/slide	5,2 colonii/slide	11 zile
masiv hemoragic	3,2 colonii/slide	4 colonii/slide	12 zile

CONCLUZII

Pe parcursul cercetării noastre am analizat o serie de factori ce pot influența parametrii determinanți ai calității unei culturi celulare. Prelucrând statistic datele obținute, am observat că doar factorii care țin de lichidul amniotic, mai precis aspectul hemoragic, au o influență mai importantă asupra numărului de colonii, cu o scădere în medie de 2 colonii/slide în cazul lichidelor intens hemoragice. Prin urmare, se recomandă realizarea unei amniocenteze mai timpurii, mai ales în cazul gravidelor în vârstă.

În ceea ce privește analiza cromozomială propriu-zisă, rezultatele noastre ne-au dus la concluzia că doar vârsta maternă și vârsta gestațională pot influența semnificativ calitatea preparatelor metafazice obținute. Cu creșterea vârstei materne/gestaționale a crescut atât gradul de suprapunere cromozomială, cât și gradul de împrăștiere metafazică.

BIBLIOGRAFIE

1. **G.P. Holmquist** – Chromosome Bands, Their Chromatin Flavors, and Their Functional Features *Am. J. Hum. Genet.* 51:17-37, 1992
2. **Invitrogen life technologies**; Technical Resources; Protocols Giemsa Banding (GTG Banding), www.invitrogen.com.
3. **Hahn S., Jackson L.G.** – (Eds.) 2008. Prenatal diagnosis. *Methods Mol Biol.* 444. New York: Humana Press
4. **B. Sikkema-Raddatz, J. van Echten** – Minimal volume of amniotic fluid for reliable prenatal cytogenetic diagnosis, *Prenatal Diagnosis*, Volume 22, Issue 2, pages 164-165, February 2002
5. **Mellink C.H., de Pater J.M., Poddighe P.J.** – Smeets DFCM. Quality of cytogenetic diagnosis: conditions, guidelines and control. 2003.
6. **Mujezinovic F., Alfirevic Z.** – Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villus sampling. A systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 687-694.
7. **Lawce H.J. and Brown M.G.** – Harvesting, slide-making, and chromosome elongation techniques; In Barch M.J. (ed): The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Second Edition, Raven Press New York 1991:31-66.
8. **Hliscs R., Muhlig P., Claussen U.** – The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 76(3-4):167-7