



IBRIDAZIONE *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

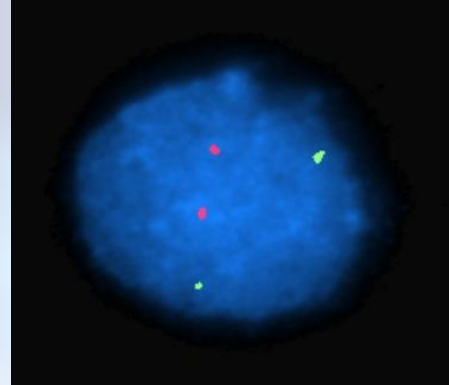
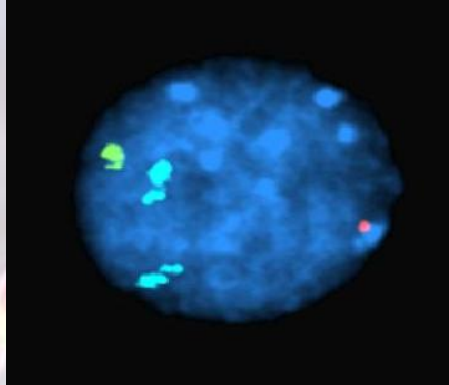
L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), è una tecnica di citogenetica molecolare che permette di visualizzare la localizzazione e il numero di copie di una sequenza specifica di DNA sia su preparati di cromosomi metafasici, sia su nuclei interfasicci mediante l'utilizzo di sonde marcate con fluorocromi. L'applicazione di strumenti molecolari alla citogenetica ha designato l'ibridazione *in situ* fluorescente come un'importante tecnologia diagnostica. (Cremer et al.,1986; Lichter et al., 1988b; Lichter and Ward 1990; McNeil et al.,1991).

APPLICAZIONI DELLA FISH

L'utilizzo di sonde cromosoma specifiche, permette di determinare il numero di copie di un dato cromosoma presente all'interno del nucleo o di regioni presenti su specifici cromosomi e l'utilizzo di fluorocromi diversi consente di marcare le sonde specifiche, rendendo possibile la visualizzazione simultanea di bersagli cromosomici differenti nello stesso nucleo. La versatilità di questa tecnica consente un ampio utilizzo diagnostico trovando applicazione nella diagnosi prenatale, diagnosi preimpianto, diagnosi di sindromi cromosomiche e mosaicismi in epoca postnatale e nella diagnosi e monitoraggio alla risposta terapeutica dei tumori.

Diagnostica Prenatale

La FISH rappresenta un importante strumento per la diagnosi rapida di anomalie in epoca prenatale. Attualmente La FISH su cellule di liquido amniotico non coltivato che utilizza sonde specifiche per i cromosomi **13, 18, 21, X e Y** è entrata nella routine dei laboratori per la diagnostica prenatale e permette di accertare la presenza delle principali trisomie autosomiche e aneuploidie sessuali nel feto. Generalmente questa analisi viene eseguita qualora vi sia necessità di una diagnostica d'urgenza dopo il riscontro di anomalie strutturali del feto in ecografia del secondo trimestre oppure può avere un' applicazione facoltativa nel caso in cui uno screening preliminare evidenzi un rischio aumentato di anomalia cromosomica. Una volta che lo stato di ploidia dei 5 cromosomi indagati è dimostrato normale, il rischio per le rimanenti anomalie cromosomiche è significativamente ridotto (Palomaki et al., 1994; Pergament et al., 2000).



Materiale abortivo

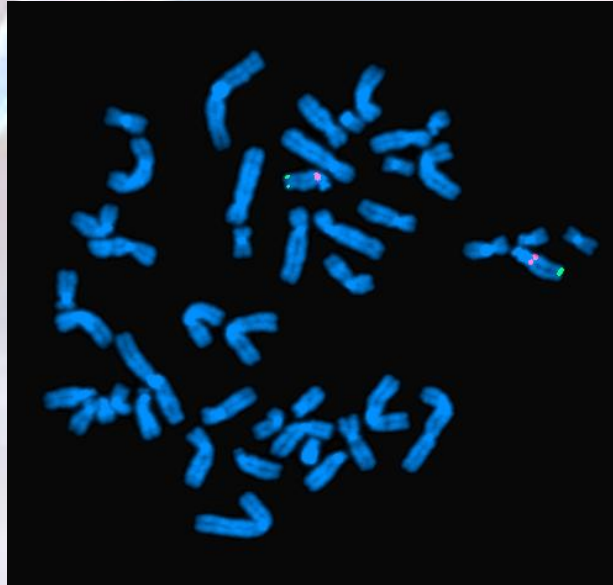
Approssimativamente il 50% delle perdite spontanee di gravidanza, entro le 15 settimane di gestazione, sono imputabili ad anomalie cromosomiche, mentre per le perdite tra le 15 e le 24 settimane, la frequenza è approssimativamente del 20% (Warburton, 2000). L'utilizzo di un set di sonde cromosoma specifiche non solo può identificare le più frequenti aneuploidie che causano aborti spontanei ma anche altre anomalie comuni in questi casi, come la monosomia X, triploidia e tetraploidia.

Sindromi da microdelezione

Alcune sindromi sono associate a microdelezioni cromosomiche, anomalie che la citogenetica classica non è in grado di rilevare, poiché il frammento cromosomico deletato ha una dimensione dell'ordine di alcune centinaia di paia di basi. Il potere risolutivo della FISH superiore a quello della citogenetica tradizionale, consente di identificare anomalie di numero o di struttura e di identificare riarrangiamenti criptici, non visibili neppure dopo bandeggio ad alta risoluzione. Le principali sindromi da microdelezione indagabili sono: la Sindrome di Di George/Velocardiofaciale (delezione 22q11.2), la sindrome di Prader-Willi /Angelman (delezione 15q12-13), la Sindrome Cri-du-chat (delezione 5p15), la Sindrome di Williams (delezione 7q11.23), la Sindrome di Wolf-Hirschhorn (delezione 4p16), la Sindrome di Smith-Magenis (delezione 17p12.2) e molte altre. È un test che si applica su indicazione specifica per sospetto clinico a preparati di cromosomi metafasici.

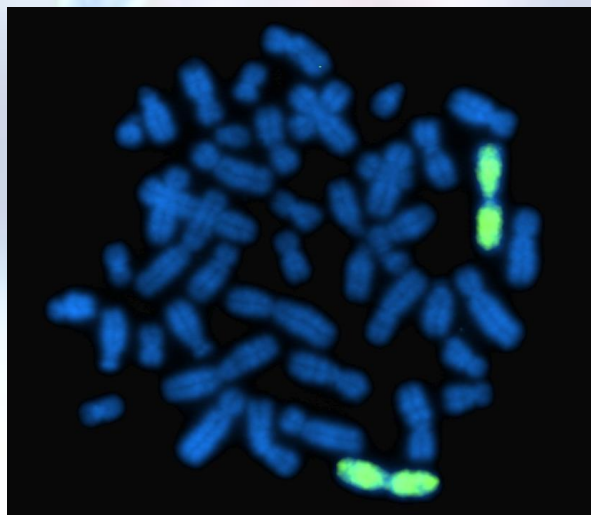


Laboratori Campisi



Caratterizzazione di anomalie strutturali e numeriche

L'utilizzo di **sonde centromeriche** specifiche permette di caratterizzare cromosomi marcatori definendone l'origine, mentre **sonde painting** specifiche per intero cromosoma vengono utilizzate per caratterizzare e definire punti di rottura di riarrangiamenti sia bilanciati (traslocazioni reciproche, inversioni), che sbilanciati e permettono di individuare riarrangiamenti cromosomici complessi.

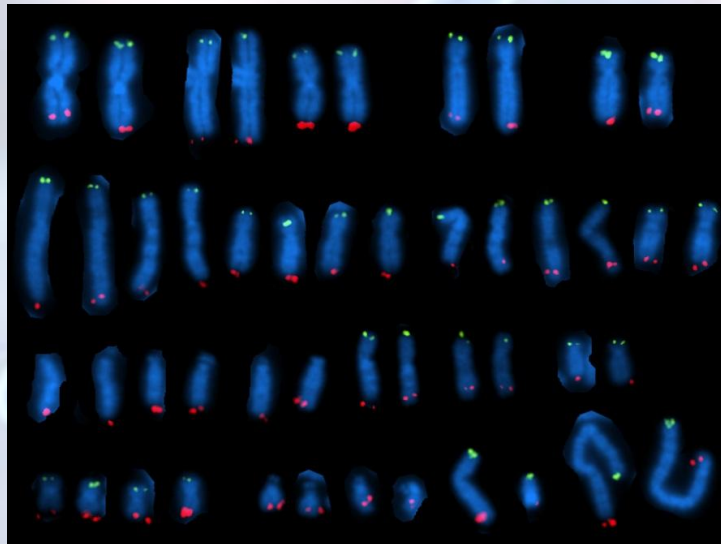


L.C. Laboratori Campisi
C.so Vittorio Emanuele, 231 96012 Avola (SR)
tel 0931 832499 Fax 0931 814068
www.lccampisigroup.it
info@lccampisigroup.it



Screening regioni subtelomeriche

Importanti metodiche si propongono come variazioni sul tema della FISH. Un esempio è il protocollo Chromoprobe multiprobe T-system (Knight 1997) che prevede la contemporanea ibridazione in situ e visualizzazione di tutti i 41 telomeri su di un singolo vetrino caratteristico nel possedere 24 quadranti nei quali sono adese sonde telomeriche e specificatamente marcate. Tale metodica è utilizzata per lo screening dell'integrità delle regioni subtelomeriche in pazienti nei quali si riscontrano dimorfismi facciali e non e presenza di ritardo mentale.



Mosaicismi cromosomici

Con l'utilizzo di sonde centromeriche specifiche è possibile analizzare aneuploidie confermando la presenza di anomalie sorte in vitro o linee cellulari a mosaico. Diversamente dalla FISH su metafasi l'analisi dei nuclei interfasci permette di indagare lo stato di ploidia di cellule prelevate da tessuti differenti evidenziando la distribuzione di linee cellulari a mosaico in vari distretti. Le cellule buccali, ad esempio, possono rappresentare un'importante tessuto alternativo da indagare nel caso di sospetto mosaicismo su sangue periferico o fibroblasti cutanei (Ohashi et al., 1993).



Oncologia

Aberrazioni cromosomiche sono riscontrate con elevate frequenze in cellule tumorali. Alcune di queste sono caratterizzate e correlate con sindromi e manifestazioni cliniche specifiche e la loro identificazione è sempre più importante per determinare diagnosi specifiche e selezionare terapie. L'identificazione di anomalie cromosomiche numeriche e strutturali in nuclei interfascici rappresenta una possibilità molto utile nella patologia dei tumori, poiché permette la conferma simultanea di aberrazioni cromosomiche, fenotipo cellulare e morfologia dei tessuti. Inoltre è da notare che è possibile realizzare la FISH interfascica su una grande varietà di materiale come nuclei ottenuti dal contatto del campione tumorale sul vetrino (Kontogeorgos et al., 1999), nuclei ottenuti mediante procedure di citogenetica convenzionale o da colture di linee cellulari tumorali (Tibiletti et al., 1999, 2001), nuclei di cellule tumorali isolate da tessuti congelati o estratti da sezioni in paraffina (Thompson et al., 1994). Patologie maligne ematopoietiche e linfomi sono caratterizzati da differenti e specifici riarrangiamenti cromosomici; di questi il tipo più frequente sono le traslocazioni reciproche che interferiscono con oncogeni, i quali hanno un ruolo fondamentale nella patogenesi del tumore.

L. C. Laboratori Campisi dispone di una vasta gamma di sonde validate per utilizzo diagnostico. La FISH può essere effettuata su diversi tessuti (villi coriali, liquido amniotico, sangue periferico, sezioni di tessuto).

FISH test rapido su liquido amniotico ricerca aneuploidie cromosomi 13, 18, 21, X e Y.

Sonde per le principali sindromi microdeletive:

- Sindrome di Angelman (delezione 15q12-13)
- Sindrome Cri-du-chat (delezione 5p15)
- Sindrome di Di George/Velocardiofaciale (delezione 22q11.2)
- Sindrome di Miller-Dieker (delezione 17p13.3)
- Sindrome di Prader-Willi (delezione 15q12-q13)
- Sindrome di Smith-Magenis (delezione 17p12.2)
- Sindrome di Williams (delezione 7q11.23)
- Sindrome di Wolf-Hirschhorn (delezione 4p16)



A richiesta sono disponibili altre sonde per specifiche sindromi da microdelezione/microduplicazione.

L.C. Laboratori campisi dispone di sonde Painting intero cromosoma specifiche per tutti i cromosomi e sonde subtelomeriche braccio corto e braccio lungo specifiche, per la caratterizzazione anomalie cromosomiche strutturali bilanciate e sbilanciate sia in epoca prenatale che in epoca postnatale:

- **sonde fluorescenti WCP** (whole chromosome painting) 24 cromosomi
- **sonde subtelomeriche** singole braccio lungo braccio corto 24 cromosomi

Inoltre per patologie acquisite:

- Si effettua analisi dello stato di amplificazione del gene **HER2** su sezioni di carcinoma mammario infiltrante fissate in formalina e incluse in paraffina con sonda HER 2/CEP 17.
- Analisi su sezioni di carcinoma polmonare a piccole cellule della traslocazione del gene **ALK**

La FISH si effettua su preparati citogenetici da villi coriali, liquido amniotico e sangue periferico. La FISH su tessuto necessita di sezioni di 5 micron rappresentative dell'area tumorale fissate in formalina tamponata al 10% (tempo di fissazione da 6 a 24 ore) e incluse in paraffina, montate su vetrini carichi.

Bibliografia

Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M.

Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84.
Hum Genet. 1986 Dec;74(4):346-52

Lichter P, Cremer T, Tang CJ, Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC.

Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec;85(24):9664-8.

Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC.

High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones.
Science. 1990 Jan 5;247(4938):64-9

McNeil JA, Johnson CV, Carter KC, Singer RH, Lawrence JB (1991)

Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence in situ hybridization.
Genet Anal Tech Appl 8:41-58

Palomaki GE, Bradley LA, Haddow JE. (1994)

A new approach to analyzing fluorescence in situ hybridization data for rapid detection of aneuploidy in amniocytes.
J Med Screen 1: 96-97.

Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, Fiddler M. (2000)

The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis.
Prenat Diagn 20: 215-220.



Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline A, Warburton D. (2002)

Multiplex interphase FISH as a screen for aneuploidies in spontaneous abortions.
Hum Reprod 17: 1166-1170

Knight, S.J., Horsley, S.W., Regan, R., Lawrie, N.M., Maher, E.J. Cardy, D.L., Flint, J., and Kearney, L. (1997)

Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. Eur. J. Hum. Genet. 5:1-8

Ohashi H, Ishikiriyama S, Fukushima Y.

New diagnostic method for Pallister-Killian syndrome: detection of *i*(12p) in interphase nuclei of buccal mucosa by fluorescence in situ hybridization. Am J Med Genet 1993;45:123-8.

Kontogeorgos G, Kapranos N, Orphanidis G, Rologis D, Kokka E

Molecular cytogenetics of chromosome 11 in pituitary adenomas: a comparison of fluorescence in situ hybridization and DNA ploidy study. Human Pathol 30: 1377-1382 (1999).

Tibiletti MG, Bernasconi B, Dionigi A, Riva C

The applications of FISH in tumor pathology.
Adv Clin Path 3: 111-118 (1999).

Tibiletti MG, Bernasconi B, Furlan D, Bressan P, Cerutti R, et al.

Chromosome 6 abnormalities in ovarian surface epithelial tumors of borderline malignancy suggest a genetic continuum in the progression model of ovarian neoplasms.
Clin Cancer Res 7: 3404-3409 (2001).

Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW

Thick section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile.
Am J Pathol 144: 237-243 (1994).