

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

Pränatale FISH-Diagnostik am Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
im Zeitraum von 01/1998 bis 08/1999

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Anna Macht  
aus Weiden in der Oberpfalz

Würzburg, Januar 2002

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn  
Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm  
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2002

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Technische Aspekte der FISH-Diagnostik	4
2.1.1. Chemikalien	4
2.1.2. Lösungen	5
2.1.3. Fruchtwasserproben	6
2.1.4. Sonden	7
2.1.5. Hybridisierung	7
2.1.6. Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	8
2.1.6.1. Mikroskopische Auswertung	8
2.1.6.2. Auswertungskriterien	9
2.2. Patienten-Indikationen	9
2.3. Befundung und Kontrolle mit vollständiger Karyotypisierung	11
2.3.1. Befundung	11
2.3.2. Kontrolle durch konventionelle Karyotypisierung	11
3. Ergebnisse	12
3.1. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen	12
3.1.1. Einteilung der Ergebnisse	12
3.1.2. Überblick über die Ergebnisse	13

3.2.	Unauffällige FISH-Befunde	15
3.2.1.	Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 50 auswertbaren Kernen je Sonde	15
3.2.1.1.	Auswertung für die Autosomen	15
3.2.1.2.	Auswertung für die Gonosomen	19
3.2.2.	Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 10 bis 49 auswertbaren Kernen pro Sonde	21
3.2.2.1.	Auswertung für die Autosomen	22
3.2.2.2.	Auswertung für die Gonosomen	25
3.2.3.	Unauffällige FISH-Befunde mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden	28
3.3.	Pathologische FISH-Befunde	31
3.3.1.	Mit FISH erkannte Fälle von Trisomie 21	32
3.3.2.	Mit FISH erkannte Fälle von Trisomie 18	34
3.3.3.	Mit FISH erkannte Fälle von Triploidie	36
3.3.4.	Mit FISH erkannte Fälle von Monosomie X	46
3.3.5.	Mit FISH erkannter Fall mit der Konstellation 48,XXY,+21	47
3.4.	Problematische FISH-Befunde	49
3.4.1.	Problematische FISH-Befunde unter den Fällen mit unauf- fälligem Karyotyp	49
3.4.1.1.	Hybridisierung ergab keine Signale für alle verwendeten Sonden	49
3.4.1.2.	Keine Signale für eine oder mehrere Sonden je Fall	50
3.4.1.3.	Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall	55
3.4.1.3.1.	Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall und mindestens 10-49 auswertbaren Kerne pro Sonde	56
3.4.1.3.2.	Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall und weniger als 10 auswertbare Kerne pro Sonde	69

3.4.2.	Problematische FISH-Befunde unter den Fällen mit pathologischem Karyotyp	77
3.4.2.1.	Ein falsch negativer Befund in Fall 67	77
3.4.2.2.	Numerische Chromosomenaberrationen, die aufgrund einer fehlgeschlagenen Hybridisierung für die entsprechenden Sonden nicht erkannt wurden	79
3.4.2.3.	Strukturelle Chromosomenaberrationen, die mit FISH nicht erkennbar waren	80
3.5.	Die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Sonden	86
3.5.1.	Chromosom 13	86
3.5.2.	Chromosom 18	86
3.5.3.	Chromosom 21	86
3.5.4.	Chromosom X	87
3.5.5.	Chromosom Y	87
4.	Diskussion	89
4.1.	Methodische Besonderheiten	89
4.1.1.	Sondenqualität	89
4.1.2.	Zellzahl	90
4.1.3.	Stadium der Schwangerschaft	91
4.1.4.	Kontamination mit mütterlichem Blut	92
4.2.	Pathologische FISH-Befunde	95
4.3.	Problematische FISH-Befunde	98
4.3.1.	Zu wenig auswertbare Kerne	98
4.3.2.	Fehlende Hybridisierung	99
4.3.3.	Kontrollbedürftige FISH-Befunde mit 10-60% aneuploiden Kernen	100
4.3.4.	FISH bei Chromosomenmosaikern	102
4.4.	Diskrepante FISH-Befunde	103
4.4.1.	Falsch negative Befunde	103

4.4.2.	Falsch positive FISH-Befunde	105
4.4.3.	Mit FISH nicht detektierbare Aberrationen	106
4.4.4.	Die Sensitivität von FISH	107
4.4.5.	Die Spezifität von FISH	109
5.	Zusammenfassung	110
6.	Literatur	112

## 1. Einleitung

Ein wichtiger Gegenstand der pränatalen Diagnostik ist die vorgeburtliche Erkennung fetaler Chromosomenaberrationen. Die routinemäßige Durchführung der Ultraschalluntersuchung in der Schwangerenvorsorge dient dabei der Aufdeckung von Fehlbildungen und von häufig mit Chromosomenstörungen vergesellschafteten Auffälligkeiten, wie dem fetalen Nackenödem. Zur Bestimmung der individuellen Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Down-Syndroms werden im Rahmen des sogenannten Triple-Tests die Werte für Alphafetoprotein, Human Chorion Gonadotropin und Östriol im mütterlichen Serum bestimmt und mit dem Alter der Mutter korreliert. Durch die invasiven Verfahren der Amniozentese, Chorionzottenbiopsie und Nabelschnurpunktion können zu unterschiedlichen Zeiten der Schwangerschaft fetale Zellen gewonnen werden. Die Gewinnung und Untersuchung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die Fruchtwasseruntersuchung ist zur Erkennung von Chromosomenanomalien unter bestimmten Indikationen in hochentwickelten Ländern weltweit Standard geworden (Eiben et al. 1999b). Wurde die Amniozentese früher üblicherweise zwischen der 15. und 17. Schwangerschaftswoche durchgeführt, findet sie heute auch zunehmend als sogenannte frühe Amniozentese schon ab einem Gestationsalter von 11 Wochen statt (Eiben et al. 1994; Wilson 1995). Die im Fruchtwasser enthaltenen fetalen Zellen befinden sich in der Interphase des Zellzyklus. Damit eine zytogenetische Analyse möglich ist, müssen sie eine 1-3wöchige Kulturzeit zur Vermehrung durchlaufen. Die gewonnenen Zellen werden mit Colcemid in der Metaphase des Zellzyklus arretiert. So erhaltene Metaphasechromosomen können nach Färbung und Fixierung mikroskopisch auf numerische und strukturelle Aberrationen untersucht werden.

Demgegenüber hat sich als ergänzendes Verfahren zur Fruchtwasseruntersuchung bei bestimmten Indikationen in den letzten Jahren die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) etabliert. Dies ist eine molekularzytogenetische Technik, bei der chemisch markierte DNA-Sonden direkt auf Chromosomenpräparate hybridisiert und mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Nach umfangreichen Forschungen seit über einem Jahrzehnt steht inzwischen ein umfangreiches Potential an DNA-Sonden zur Verfügung, die je nach diagnostischer zytogenetischer Fragestellung zur Anwendung kommen. Dazu zählen Phagen- und Plasmid-DNA-

Bibliotheken von sortierten menschlichen Chromosomen, spezielle Cosmide und YACs (Yeast Artificial Chromosomes), die jeweils ganz bestimmte menschliche DNA-Abschnitte beinhalten, sowie Plasmide, die hochspezifische menschliche DNA-Sequenzen, z.B. von Zentromer- oder Telomerregionen einzelner Chromosomen enthalten. Mittlerweile sind direkt fluoreszenzmarkierte Sonden für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY kommerziell erhältlich.

Zur ergänzenden pränatalen Diagnostik von numerischen Chromosomenaberrationen im Rahmen des sogenannten „pränatalen Schnelltests“ werden nun die unkultivierten Interphasekerne der Fruchtwasserproben mit Sonden hybridisiert, die für Abschnitte der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y spezifisch sind. Anschließend wird mikroskopisch die Anzahl der Signale für die einzelnen Chromosomen in den Zellkernen festgestellt. Bei einem disomen Vorliegen des jeweiligen Chromosoms erwartet man 2 Signale, bei einer Trisomie 3 Signale. Meist tritt zusätzlich ein geringer Prozentsatz an anderssignaligen Kernen, d.h. 3-signalige Kerne bei den Disomien bzw. 2-signalige bei den Trisomien auf. Eine Aussage über den wahrscheinlich vorliegenden Chromosomensatz der untersuchten Chromosomen kann durch die Auswertung einer Vielzahl von Kernen getroffen werden (Philip et al. 1994; Eiben et al. 1998a).

Durch die Verwendung der nativen Fruchtwasserzellen ist eine Vorabinformation über das Vorliegen einer numerischen Aberration der untersuchten Chromosomen nach 1-3 Tagen möglich. Die oft für die Schwangere und auch den behandelnden Gynäkologen belastende Wartezeit bis zum Bekanntwerden des Befundes verkürzt sich damit, gegenüber der 1-3wöchigen Frist bei der konventionellen Chromosomenanalyse aus Fruchtwasserzellen, wesentlich.

Durch Gebrauch geeigneter DNA-Sonden für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY können theoretisch 80-90% der im 2. Trimenon auftretenden Chromosomenanomalien erkannt werden (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. 1998), bzw. etwa 65% aller Chromosomenanomalien und 95% der Chromosomenanomalien beim Lebendgeborenen (Whiteman and Klinger 1991). Es handelt sich dabei um numerische Chromosomenaberrationen mit einer vom normalen diploiden Chromosomensatz abweichenden Anzahl an Autosomen oder Gonosomen. Numerische Aberrationen von Autosomen, die mit dem Leben vereinbar sind, sind überwiegend Trisomien, meist in Form freier Trisomien. Von diesen ist mit einem Fall auf 700 Geburten die Trisomie 21 mit dem klinischen Bild des Down-Syndroms am häufigsten, gefolgt von Trisomie 18

bzw. Edwards-Syndrom mit 1:3000 Fällen und Trisomie 13 bzw. Patau-Syndrom mit 1:5000 Fällen bei Geburt. Andere autosomale Trisomien kommen extrem selten vor. Die Geschlechtschromosomen betreffende numerische Chromosomenanomalien können in Form einer Monosomie X, die bei 1:10000 weiblichen Neugeborenen vorliegt, auftreten oder aber mit mehrfachem Vorkommen von Gonosomen, wie z.B. 47, XXY, 47, XYY oder 47, XXX, mit einer Häufigkeit von 1:1000 bei Geburt.

Unter der Voraussetzung, daß eine konventionelle Chromosomenanalyse folgt, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an unkultivierten Fruchtwasserzellen als ergänzendes diagnostisches Instrument in der pränatalen Diagnostik besonders bei bestimmten Indikationsgruppen geeignet. Dazu zählt das Auftreten von Auffälligkeiten bei der fetalen Ultraschalluntersuchung, ein erhöhtes Risiko im Triple-Test und ein fortgeschrittenes Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der invasiven Diagnostik (Eiben et al. 1998a). Daneben kann die FISH-Untersuchung auch bei stark erhöhtem mütterlichen Alter, vorausgegangener Schwangerschaft mit Trisomie 13, 18, 21 oder Monosomie X oder in seltenen Fällen auch bei sehr starker psychischer Belastung der Schwangeren in Betracht gezogen werden.

In den folgenden Ausführungen sollen retrospektiv Erfahrungen und Ergebnisse mit dem pränatalen Schnelltest am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg dargestellt werden. Dazu werden alle 129 Fälle untersucht, bei denen der Schnelltest von Januar 1998 (Einführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in die klinische Diagnostik) bis August 1999 zur Anwendung kam.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Technische Aspekte der FISH-Diagnostik

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde zur pränatalen Diagnostik an unkultivierten Fruchtwasserzellen mithilfe eines kommerziell erhältlichen Testkits durchgeführt. Das empfohlene Untersuchungsprotokoll kam in modifizierter Form zur Anwendung.

#### 2.1.1. Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien wurden von den Firmen Gibco, Merck und Sigma bezogen. Zudem wurden Chemikalien und Materialien von folgenden Firmen benutzt:

Fluka	Formamid
Fresenius	Ampuva (Aqua ad injectabilia, steril, pyrogenfrei)
Marabu	Fixogum
Merck	Eisessig
	HCl
	Methanol pro analysi
	Magnesium-Hexahydrat pro analysi
Riedl Dettain Baker	EtOH
Sigma	DABCO (Diazobicyclooctan)
	Pepsinstammlösung 10 %
	Formaldehydlösung 37 %
	Tween (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)
Vysis (Downers Grove, IL, USA)	AneuVysion EC™ Kit (enthält: LSI 13/21 - Sonde CEP 18/X/Y - Sonden DAPI II SSC 20x NP-40 Kontrollproben)
Zeiss	Immersionsöl normal

## 2.1.2. Lösungen

Denaturierungslösung	35 ml Formamid 5 ml SSC (20x) 10 ml Ampuva 11 gtt HCl (Einstellung auf pH=7)
Fixativ	3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessig
Formaldehydlösung 1 %	1,35 ml Formaldehydlösung 37 % 48,56 ml MgCl <sub>2</sub> / PBS-Lösung 50 mmol
MgCl <sub>2</sub> -Puffer (50 mmol)	50 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 100 ml PBS (10x) 850 ml Ampuva
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat (pH=7)
SSC (2x)	100 ml SSC (20x) 900 ml Ampuva
SSC (0,4x)	100 ml SSC (2x) 400 ml Ampuva
Pepsinlösung	100 ml Ampuva 50 µl Pepsinstammlösung 10 % 1 ml 1 M HCl
PBS (10x)	80 mg/ml NaCl 21,6 mg NaHPO <sub>4</sub> Calcium - und Magnesiumfrei
PBS (1x)	100 ml PBS (10x) 900 ml Ampuva
Waschlösung I	500 ml SSC (0,4x) 1,5 ml Tween 0,3 %
Waschlösung II	500 ml SSC (2x) 0,5 ml Tween 0,1 %

### 2.1.3. Fruchtwasserproben

Für den Schnelltest wurden per Amniozentese gewonnene Fruchtwasserproben verwendet. In der Regel baten die anfordernden Ärzte um die Durchführung der FISH-Untersuchung, oder diese wurde nach Rücksprache durchgeführt. Meist lagen zwei Röhrchen à ca. 8-10 ml Fruchtwasser vor, von denen 2-5 ml zur FISH-Untersuchung benötigt wurden (siehe Tab.1). Vor der Verarbeitung wurde der Aspekt des Fruchtwassers beurteilt (klar, leicht blutig oder blutig) und dokumentiert. Die Proben wurden bei 1100 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf wenige Tropfen Zellsuspension abgesaugt. Auf zwei mit Diamantschreiber markierte Areale eines Superfrost-Objektträgers wurden jeweils ein Tropfen der Zellsuspension und zwei Tropfen Eisessig aufgebracht. Anschließend erfolgte die Trocknung auf einer Wärmeplatte bei 64°C.

Gestations- -wochen	Volumen der Fruchtwasserprobe in ml																			Σ	
	?	6	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	25	30	35	50		100
12	1						1														2
13				1	4	4	1														10
14		1				1	6			1		2									11
15	1					1	2	4		2	1	1									12
16	2		1				1	4	2	1		1			1						13
17									3	1	1	1									6
18	1									1		2									4
19										1	1	3			1						6
20	7									1		7									15
21	2						1				3	4	1								11
22										1	1	2		1		1					6
23									1												1
24											2	1									3
25	1											1									2
26											2									1*	3
27												2									2
28												2		1							3
29										1	1	1									3
30	1																				1
31												1					1				2
32	1											1	1					1		1	5
33												1		1							2
34												1									1
35												1									1
36												1					1				2
38																	1				1
39	1																				1
Σ	18	1	1	1	4	6	10	10	6	10	12	36	2	3	2	1	3	1	1	1	129

Tab.1 Anzahl der und Menge der Fruchtwasserproben je nach Gestationsalter (\* hierbei handelte es sich nicht um Fruchtwasser, sondern um aus dem Hygrom des Feten abpunktierte Flüssigkeit)

#### **2.1.4. Sonden**

Die Fruchtwasserproben wurden mit den im AneuVysion EC<sup>TM</sup>-Kit der Firma Vysis enthaltenen, direkt markierten DNA-Sonden für die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y hybridisiert. Die Sonden stammen aus E.coli-Plasmid. Sie liegen bei Lieferung vordenaturiert in einer Lösung aus blocking DNA und Hybridisierungspuffer (Dextransulfat und SSC-Formamid) in zwei Sondengemischen vor.

Ein Gemisch enthält  $\alpha$ -Satelliten-DNA-Sequenzen, die mit den Genloci D18Z1 der Zentromerregion 18p11.1-q11.1, DXZ1 der Region Xp11.1-q11.1 sowie DYZ3 der Region Yp11.1-q11.1 korrespondieren. Die Sonde für Chromosom 18 ist mit SpectrumAqua gelabelt, diejenige für Chromosom X mit SpectrumGreen und diejenige für Chromosom Y mit SpectrumOrange. Im zweiten Sondengemisch liegen mit Spektrum Grün bzw. SpektrumOrange markierte single unit DNA-Sonden vor. Sie korrespondieren mit der 13q14-Region von Chromosom 13 bzw. die Loci D21S259/ D21S342 und D21S341 der Region 21q22.13–21q.22.2 auf Chromosom 21.

#### **2.1.5. Hybridisierung**

Nach dem Aufbringen der Fruchtwasserproben auf den Objektträger und Trocknung wie oben beschrieben, wurde der Objektträger zur Fixierung in einer Lösung aus Methanol und Eisessig in einem Verhältnis von 4:1 durchgeschwenkt und für 10 Minuten darin inkubiert. Nach 15minütiger Lufttrocknung erfolgte anschließend zur Entfernung von Plasmaresten eine Inkubation in Pepsinlösung für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurde das Präparat bei Raumtemperatur zweimal für je 5 Minuten in 1fach konzentriertem PBS und anschließend in MgCl<sub>2</sub>-Puffer gespült. Es folgte, ebenfalls bei Raumtemperatur, eine weitere Fixierung in 1 % iger Formaldehydlösung für 5 Minuten mit anschließender erneuter Spülung in PBS (1x) für fünf Minuten. Zur Auswaschung des Formaldehyds und zur Dehydrierung wurde das Präparat danach für jeweils 3 Minuten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 85 % bzw. 100 %) auf Eis geführt.

Nach Lufttrocknung fand als nächstes eine Behandlung zur Denaturierung und Entspiralisierung der DNA statt. Dazu wurde eine Formamidlösung hergestellt und mit 1 M HCl auf pH 7 eingestellt. In dieser Lösung wurde der Objektträger für 90 Sekunden bei 72°C inkubiert. Danach wurde das Präparat nochmals durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt und dann an der Luft getrocknet. Nach dieser oder der vorhergehenden Trocknung

wurde im Dunkelfeldmikroskop kontrolliert, ob genügend Zellen auf den markierten Arealen des Objektträgers vorhanden waren.

Im nächsten Schritt wurden nun unter Lichtschutz auf ein Areal 10µl des 18/X/Y-Sondengemisches, auf das andere Areal 10µl der 13/21-Sonde aufgebracht. Die im Kühlschrank aufbewahrten Sonden wurden dazu angewärmt und mithilfe eines Rüttlers durchgemischt. Die beiden Felder des Objektträgers wurden mit Gummikleber und Deckgläschen luftdicht abgeschlossen und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag konnte der Objektträger entnommen und nach Entfernen der Deckgläschen in der Waschlösung I für 1-3 Sekunden durchgeschwenkt und bei 72°C für 2 Minuten darin inkubiert werden. Anschließend wurde das Präparat bei Raumtemperatur 30 Sekunden in Waschlösung II durchgeschwenkt. Nun wurden 100µl DAPI aus dem Vysis-Testkit zur Gegenfärbung der Kerne auf das Präparat gegeben, der Objektträger mit einem großen Deckglas abgedeckt und für 8-10 Minuten im Dunklen inkubiert. Danach wurde er in SSC (2x) geschwenkt und darin für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde ein Tropfen des antifade agents DABCO aufgebracht und der Objektträger, mit einem großen Deckglas abgedeckt für eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend konnte die Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgen.

## **2.1.6. Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

### **2.1.6.1. Mikroskopische Auswertung**

Zur Auswertung wurde das Mikroskop Axiophot der Firma Zeiss verwendet. Als UV-Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe (200-600 nm, Brenndauer 200 Stunden). Zur Sichtbarmachung der Signale der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Chromosomen wurden verschiedene Filter verwendet. Damit konnten die mit DAPI gefärbten Kerne bei 365 nm (DAPI-Filter) blau gesehen werden, die Signale für die Chromosomen 13 und X bei 440-490 nm (FITC-Filter) grün, die Signale für die Chromosomen 21 und Y bei 550-573 nm (Rhodamin-Filter) rot und die Signale für Chromosom 18 mit dem Aqua-Filter blau. Daneben stand ein Doppelfilter zur gleichzeitigen Betrachtung von roten und grünen Signalen zur Verfügung. Zum

Aufsuchen der geeigneten Schicht wurde ein Objektiv mit 10facher Vergrößerung gewählt, zur Auswertung der Kerne eines mit 100facher Vergrößerung und Immersionsöl.

### 2.1.6.2. Auswertungskriterien

Wenn möglich wurden für jedes Chromosom 50 Kerne ausgewertet und die Anzahl der Signale für das jeweilige Chromosom registriert. Die Kerne durften sich nicht überlappen und sollten weitgehend frei von Zytoplasmaresten sein. Die Kerne sollten möglichst deutlich ausgeprägte und gut abgrenzbare Signale enthalten, mindestens eines für jede Sonde. Gespaltene Signale oder zweigeteilt erscheinende Signale mit noch erkennbarer Verbindung wurden als ein Signal gewertet. Etwa gleich große, eng benachbarte Signale ohne Verbindung wurden als 2 Signale gewertet. Diffuse Signale wurden bei begrenzter Ausdehnung als ein Signal gewertet. Zur Qualitätskontrolle standen von der Firma Vysis mitgelieferte positive und negative Kontrollproben zur Verfügung, die regelmäßig zusammen mit den Patientenproben hybridisiert und ausgewertet wurden.

### 2.2. Patienten-Indikationen

Die untersuchten 129 Fruchtwasserproben wurden im Zeitraum 1/98 bis 8/99 von verschiedenen niedergelassenen Gynäkologen oder von Kliniken für Gynäkologie und Geburtshilfe zur Diagnostik mittels FISH und konventioneller Karyotypisierung eingesandt. Die Indikation bestand bei 88 der 129 Fälle in sonographischen Auffälligkeiten des Feten. Sie sind in der folgenden Tabelle 2 näher beschrieben.

Hauptindikation	n	Weitere Auffälligkeiten/ Indikationen (bei jeweils einem Fall, wenn nicht anders angegeben)
Verdickte Nackenfalte	23	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fet ist relativ klein</li> <li>- Verunsicherung der Mutter</li> <li>- V.a. Ösophagusatresie, Makroglossie, Lungensequester, Zwerchfellhernie</li> <li>- V.a. AV-Kanal</li> <li>- Massive Pyelektasie</li> <li>- Abgehobenes Amnion, fragliches Vitium</li> </ul>
Wachstumsretardierung	22	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Singuläre Nabelschnurarterie und V.a. Aortenisthmusstenose</li> <li>- Dezent dilatiertes NBKS</li> <li>- Oligohydramnion (2 Fälle)</li> <li>- Pathologischer Doppler (2 Fälle)</li> </ul>

		- Hydrocephalus - AV-Kanal, Makroglossie: V.a. Trisomie 21 - Makrosomie, Makroglossie, kurzes Femur, träge Bewegungen
Plexus chorioideus -Zyste	6	- Milde Pyelektasie - Wunsch der Patientin
Pyelektasie	6	- Massive Magenfüllung - Plexus chorioideus -Zyste, Serum AFP erniedrigt - Verkürztes Femur
Herzfehler	5	- Hydramnion - Milde Pyelektasie - Patientenwunsch
Sonstige Auffälligkeiten der Nieren	3	
Hydrops fetalis	3	- Chylothorax, Altersrisiko erhöht
Hydramnion	3	- V.a. Ösophagusatresie, fliehendes Kinn
Omphalocele	3	- Komplexes Vitium
Hydrothorax	2	
Myelomeningocele	2	- Spina bifida, konsekutiver Hydrocephalus
Gastroschisis	2	- Klumpfüße
Hydrocephalus	1	
Hydrops placentae	1	- Reduzierte Fruchtwassermenge
Verkürzte lange Röhrenknochen	1	
Zwerchfellhernie	1	- DD: CCAM
V.a. Prune-belly-Syndrom	1	
Komplexes Fehlbildungssyndrom	3	- vorzeitige Wehen

Tab.2 Verschiedenen sonographischen Auffälligkeiten als Indikation zur FISH-Untersuchung: jeweilige Anzahl der Fälle und Kombination mit weiteren Befunden

In 28 der 129 Fälle war die Indikation zur Fruchtwasseruntersuchung ein erhöhtes Altersrisiko der Mutter (siehe Tab.3). In einigen der oben aufgeführten Fälle mit sonographischen Auffälligkeiten war das Alter der Mutter ebenfalls erhöht, ausschlaggebend für die Durchführung der Fruchtwasseruntersuchung mit FISH-Analyse waren dabei jedoch in erster Linie die pathologischen Ultraschallbefunde.

Alter der Mutter in Jahren zum Zeitpunkt der Amniozentese	n Fälle	Zusätzliche Gründe für die FISH-Untersuchung
32	1	-
35	4	- Z.n. Plazentalösung, Asphyxie, geschädigtem Kind
36	3	-
37	2	-
38	2	-
39	7	-
40	2	-
41	2	-
43	2	-
44	3	-

Tab.3 28 Fälle mit erhöhtem Altersrisiko als Indikation zur FISH-Untersuchung: Alter der Mutter und Auftreten weiterer Indikationen

In 6 Fällen hatte der Triple-Test ein erhöhtes Risiko ergeben. In 3 Fällen hatte die Mutter bereits ein Kind mit Chromosomenaberration geboren (Trisomie 21, Trisomie 18, Fragiles X-Syndrom). In 2 Fällen handelte es sich um eine erneute Fruchtwasserentnahme, nachdem eine vorangehende Karyotypisierung den Verdacht auf ein Trisomie-13-Mosaik bzw. eine Triploidie ergeben hatte. In einem Fall lag eine fetale Bradykardie ohne morphologisches Korrelat vor. Für einen Fall ist die Indikation nicht bekannt.

### **2.3. Befundung und Kontrolle mit vollständiger Karyotypisierung**

#### **2.3.1. Befundung**

Der ausgezählte Prozentsatz an euploid- bzw. aneuploidsignaligen Kerne wurde in Anlehnung an die im Vysis-Protokoll genannten Werte (weniger als 10 % aneuploide Kerne sprechen für ein disomes Vorliegen der getesteten Chromosomen, mehr als 60 % aneuploide Kerne für das Vorliegen einer Aberration des entsprechenden Chromosoms, 10-60 % aneuploide Kerne können auf eine Mosaikkonstellation hinweisen) interpretiert. Dabei wurden weitere Aspekte, wie die Anzahl der auswertbaren Kerne und eventuell zusätzlich aufgetretene Besonderheiten und Probleme mit berücksichtigt.

Die anfordernden Ärzte wurden schriftlich, in Einzelfällen auch mündlich, über das ausgezählte Ergebnis und die Interpretation informiert. Dabei wurde auf die Notwendigkeit der Kontrolle durch konventionelle Chromosomenanalyse, den Charakter der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als ergänzende Untersuchungsmethode sowie auf eventuell aufgetretene Probleme und Einschränkungen in der Beurteilbarkeit der Befunde hingewiesen.

#### **2.3.2. Kontrolle durch konventionelle Karyotypisierung**

Mit dem verbleibenden Fruchtwasser wurde eine Zellkultur angelegt. Die nach Bebrütung geernteten Metaphasen wurden einer konventionellen Karyotypisierung mittels Bänderungsanalyse zur Erkennung numerischer und grobstruktureller Chromosomenaberrationen unterzogen. Das Ergebnis konnte meist 2-3 Wochen nach Eingang der Proben mitgeteilt werden. Bei Diskrepanzen zur vorangegangenen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden die wahrscheinlichen Ursachen dafür erläutert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen**

##### **3.1.1. Einteilung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen werden in der folgenden Darstellung in drei Gruppen eingeteilt.

Die erste Gruppe bilden die als unauffällig eingestuft und mit dem in der konventionellen Chromosomenanalyse festgestellten Karyotyp übereinstimmenden FISH-Befunde. Unauffällig bedeutet, daß weniger als 10 % der ausgewerteten Kerne ein aneuploides Signalmuster aufweisen. Als aneuploid werden für die Autosomen die 3signaligen Kerne gewertet, nicht aber 1signalige, da die relevanten und bis zum Untersuchungszeitpunkt überlebensfähigen numerischen Chromosomenaberrationen für die Autosomen die Trisomien 13, 18 und 21 sind. Für die Gonosomen gelten als aneuploid diejenigen Kerne, die nicht ein XX- oder XY- Signalmuster aufweisen. Desweiteren werden die unauffälligen FISH-Befunde unterteilt in Fälle, bei denen mindestens 50 Kerne pro Sonde analysierbar waren, in Fälle, bei denen mindestens 10 bis 49 Kerne pro Sonde auswertbar waren und in Fälle, bei denen weniger als 10 Kerne für eine oder mehrere Sonden auswertbar waren.

Die zweite Gruppe bilden die durch die konventionelle Karyotypisierung bestätigten pathologischen FISH-Befunde. Als pathologisch wird ein Vorhandensein von mindestens 60 % aneuploiden Kernen für eine Sonde gewertet, d.h. für die Autosomen mehr als 60 % 3signalige Kerne und für die Gonosomen mehr als 60 % nicht XX-oder XY-entsprechende Kerne (z.B. X0, XXY, XXX etc.).

In der dritten Gruppe werden die problematischen FISH-Befunde dargestellt. Dazu zählen alle Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen, deren Ergebnis nicht mit dem der konventionellen Karyotypisierung übereinstimmt. Desweiteren alle FISH-Befunde, die aufgrund eines Prozentsatzes an nicht-euploidsignaligen Kernen (gemäß den obigen Definitionen) zwischen 10 und 60 % als kontrollbedürftig eingestuft wurden. Darüber hinaus werden im dritten Abschnitt diejenigen Hybridisierungen besprochen, die keine auswertbaren Kerne für eine, mehrere oder alle Sonden ergaben.

Es werden jeweils die Anzahl der auswertbaren Kerne für die einzelnen Chromosomen und die prozentuale Signalverteilung (durch Rundung können sich in der Summe von 100% abweichende Zahlen ergeben) dargestellt. Weitere Aspekte, wie Indikation, Zeitpunkt der Amniozentese, Volumen und Aspekt (klar, leicht blutig oder blutig) der Fruchtwasserprobe werden genannt. Insbesondere in der Gruppe der problematischen FISH-Befunde werden aufgetretene Besonderheiten bei Hybridisierung und Auswertung, sowie die Interpretation von unklaren Befunden stärker berücksichtigt.

### **3.1.2. Überblick über die Ergebnisse**

Insgesamt wurden 129 Fälle untersucht, von denen sich in der konventionellen Chromosomenanalyse 105 (81%) als unauffällig und 24 (19%) als pathologisch erwiesen. Von den 105 Fällen mit unauffälligem Karyotyp (46, XX bzw. 46, XY) zeigten 54 Fälle (51% der 105 Fälle) im FISH-Befund ein unauffälliges Signalmuster mit weniger als 10% aneuploiden Kerne je Sonde.

51 (49%) der 105 Fälle mit unauffälligem Karyotyp wurden als problematisch eingestuft. Davon war in 21 Fällen (41% der 51 Fälle) der FISH-Befund kontrollbedürftig, d.h. es waren 10-60% aneuploide Kerne vorhanden. In 18 Fällen (35%) war die Hybridisierung für eine oder mehrere Sonden nicht erfolgreich, d.h. es waren dafür keine Signale zu sehen. In 12 Fällen (24%) waren für keine der hybridisierten Sonden Signale zu sehen.

Von den 24 Fällen mit pathologischem Karyotyp in der konventionellen Chromosomenanalyse zeigten 15 Fälle (63% dieser 24 Fälle) einen auffälligen FISH-Befund mit mehr als 60% aneuploiden Kernen. In 9 Fällen (37%) konnten auffällige Chromosomenkonstellationen mittels FISH nicht detektiert werden, sie fielen damit in die Gruppe der problematischen FISH-Befunde. In 5 Fällen (21% der 24 Fälle mit pathologischem Karyotyp) lag eine strukturelle Chromosomenaberration vor, die mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht erkennbar war. In 3 Fällen (12%) waren für eine, mehrere oder alle Chromosomen keine Signale zu sehen und in 1 Fall (4%) war das Ergebnis falsch-negativ. Diese Ausführungen sind zur Übersicht in Tab.4-6 dargestellt.

Karyotyp	n Fälle	FISH unauffällig: <10% aneuploide Kerne	FISH aberrant: >60% aneuploide Kerne	FISH kontrollbedürftig: 10-60% aneuploide Kerne	FISH ohne Ergebnis
unauffällig	105	54	-	21	30
aberrant	24	6	15	-	3
gesamt	129	60	15	21	33

Tab.4 Verteilung der unauffälligen, auffälligen, kontrollbedürftigen und ergebnislosen FISH-Befunde auf die unauffälligen und aberranten Karyotypen

	Konventionelle Karyotypisierung				Σ	
	unauffällig		pathologisch		n Fälle	% aller Fälle
	n Fälle	% aller Fälle	n Fälle	% aller Fälle		
FISH unauffällig (<10 % aneuploide Kerne)	54	42	6	5	60	47
FISH pathologisch (>60 % aneuploide Kerne)	0	0	15	12	15	12
FISH kontrollbedürftig (10-60 % aneuploide Kerne)	21	16	0	0	21	16
Keine Signale für eine oder mehrere Sonden	18	14	2	2	20	16
Keine Signale für alle Sonden	12	9	1	1	13	10
Σ	105	81	24	19	129	100

Tab. 5 Anzahl und Prozentsatz der Fälle mit unauffälligem, pathologischem und kontrollbedürftigem FISH-Befund, unterteilt nach unauffälligem und pathologischem Karyotyp in der konventionellen Chromosomenanalyse

Ergebnis der In-situ-Hybridisierungen	Konventionelle Karyotypisierung				Σ	
	unauffällig		pathologisch		n Fälle	% aller Fälle
	n Fälle	% aller Fälle	n Fälle	% aller Fälle		
≥ 50 Kerne pro Sonde auswertbar	20	16	5	4	25	20
≥ 10 - 49 Kerne pro Sonde auswertbar	40	31	9	7	49	38
< 10 Kerne für eine oder mehrere Sonden auswertbar	13	10	4	3	17	13
Keine Signale sichtbar für eine oder mehrere Sonden	18	14	3	2	21	16
Keine Signale sichtbar für alle Sonden	12	9	2	2	14	11
Anzahl der auswertbaren Kerne unbekannt	2	2	1	1	3	2
Σ	105	81	24	19	129	100

Tab. 6 Anzahl der auswertbaren Kerne pro hybridisierter Sonde: jeweilige Anzahl und Prozentsatz der Fälle, unterteilt nach Fällen mit unauffälligem und pathologischem Karyotyp in der konventionellen Chromosomenanalyse

### **3.2. Unauffällige FISH-Befunde**

Von 105 Fällen mit unauffälligem Karyotyp zeigten 54 Fälle (51%) im FISH-Befund ein unauffälliges Signalmuster mit weniger als 10% aneuploiden Kerne je Sonde. In 20 (37%) dieser 54 Fälle mit unauffälligem FISH-Ergebnis waren mindestens 50 Kerne pro Sonde auswertbar, in 25 Fällen (46%) mindestens 10-49 Kerne pro Sonde und in 7 Fällen (13%) weniger als 10 Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall. Für 2 Fälle (Nr. 1 und 3) (4%) ist die Anzahl der ausgewerteten Kerne und die Signalverteilung unbekannt.

#### **3.2.1. Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 50 auswertbaren Kernen je Sonde**

Die Analyse von mindestens 50 Kernen je Hybridisierungssonde war in 20 Fällen (Nr. 13, 14,16,17,19,20,21,23,25,27,28,29,31,51,52,54,73,94,129,131) mit unauffälligem FISH-Ergebnis möglich. Die Amniozentese wurde dabei zwischen der 15. und 29. laufenden Schwangerschaftswoche durchgeführt. In 16 Fällen (Nr. 13,14,17,19,20,21,25,28,29,31, 51,52,73,94,129,131) wurden über 15 ml Fruchtwasser entnommen. In einem Fall (Nr.16) konnten nur 8 ml Fruchtwasser gewonnen werden. Für 3 Fälle (Nr. 23,27,54) ist das Volumen des Aspirates nicht bekannt. In 13 Fällen (Nr. 13,14,16,17,20,21,25,28,51,52,73,129, 131) wurde die Punktatflüssigkeit als klar beurteilt, in einem Fall (Nr.94) als leicht blutig und in einem Fall (Nr.29) als leicht trübe. Für 5 Fälle (Nr. 19,23,27,31,54) sind hierüber keine Angaben bekannt. Die Indikation zur Chromosomenuntersuchung waren in 13 Fällen (Nr. 19,23,27,25,28,29,51,52,54,73,94,129,131) sonographische Auffälligkeiten des Feten und in 7 Fällen (Nr. 13,14,16,17,20,21,31) ein erhöhtes Alter der Mutter.

##### **3.2.1.1. Auswertung für die Autosomen**

In Fall 73 wurde die Hybridisierung nur für die Chromosomen 13 und 21 durchgeführt. Es wurden 54 Kerne pro Sonde ausgewertet. Davon zeigten jeweils 52 Kerne (96%) 2 Signale und 2 Kerne (4%) 1 Signal. Demzufolge wurde ein disomes Vorliegen der Chromosomen 13 und 21 angenommen, das durch die konventionelle Chromosomenanalyse bestätigt werden konnte. In den restlichen Fällen (siehe Tab.7, Abb.1-3) wurde die Hybridisierung mit allen Sonden (13, 18, 21, XY) durchgeführt. Für die Autosomen konnten in diesen 19

Fällen im Mittel 57 Kerne (50–104) ausgewertet werden. Davon zeigten im Durchschnitt 53 Kerne (93%) 2 Signale, 3 Kerne (6%) 1 Signal und 1 Kern (1%) 3 Signale. Eine geringe Anzahl an Kernen zeigte in wenigen Fällen 4 Signale. Für Chromosom 13 waren im Mittel 55 Kerne analysierbar, die durchschnittlich in 94% (52 Kernen) 2 Signale zeigten, in 4% (2 Kernen) 1 Signal und in 1% (einem Kern) 3 Signale. Für Chromosom 18 konnten im Durchschnitt 61 Kerne ausgewertet werden. Dabei waren in durchschnittlich 91% (56 Kernen) 2 Signale vorhanden, in 8% (5 Kernen) ein Signal und in 1% (1 Kern) 3 Signale. Für Chromosom 21 konnten im Mittel 55 Kerne zur Auswertung herangezogen werden. Durchschnittlich 94% (52 Kerne) wiesen 2 Signale auf, 4% (2 Kerne) 1 Signal und 2% (1 Kern) 3 Signale.

	Ausgewertete Kerne	1 Signal		2 Signale		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	55	2	4	52	94	1	1
Chr. 18	61	5	8	56	91	1	1
Chr. 21	55	2	4	52	94	1	2
Alle Autosomen im Mittel	57	3	6	53	93	1	1

Tab.7 19 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund und mindestens 50 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittliche Anzahl an auswertbaren Kernen und Signalverteilung für die Autosomen

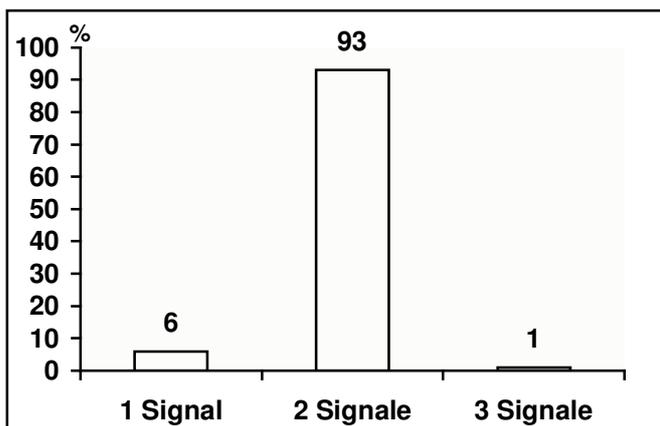


Abb.1 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittlicher Prozentsatz an Kernen mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen

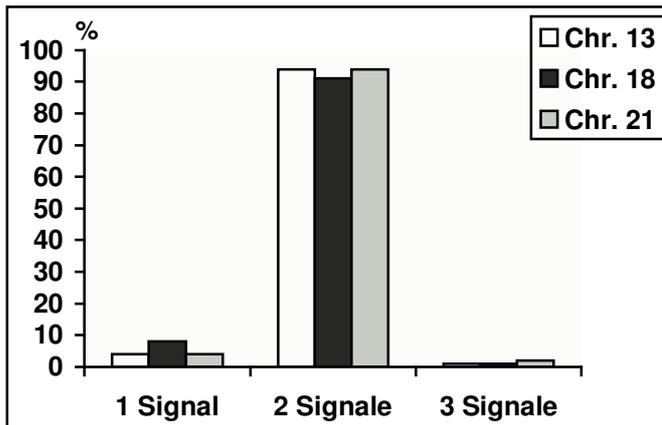


Abb.2 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 auswertbaren Kernen pro Sonde:  
Durchschnittlicher Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die einzelnen Autosomen

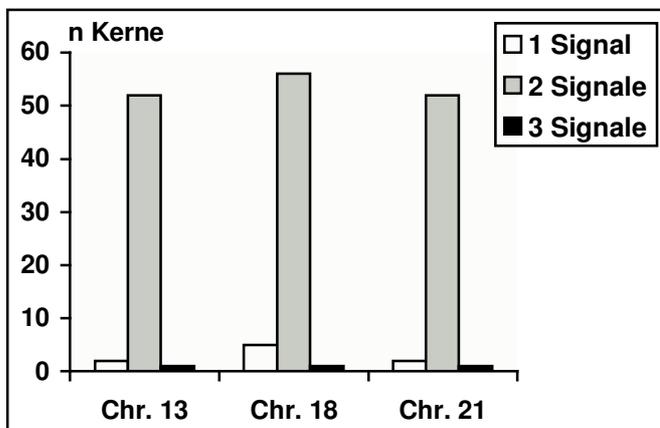


Abb.3 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 ausgewerteten Kernen pro Sonde:  
Durchschnittliche Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen je autosomale Sonde

Nicht in allen Fällen waren für alle Autosomen neben den disomen Kernen solche mit 1 bzw. 3 Signalen vorhanden (siehe Tab.8, Abb.4-6). Für Chromosom 13 wiesen in 15 (Nr. 13,14,16,17,21,23,25,29,31,51,52,54,73,94,129) der 19 Fälle durchschnittlich 5% (3 Kerne) der für diese Fälle ausgewerteten Kerne 1 Signal auf, und in 6 Fällen (Nr. 16,17, 19,28,31,131) waren im Mittel 3% (2 Kerne) 3signalig. Für Chromosom 18 zeigten in 16 Fällen (Nr. 13,14,16,17,19,20,23,25,28,29,31,51,52, 94,129,131) durchschnittlich 8% (5 Kerne) der ausgewerteten Kerne 1 Signal. In 5 Fällen (Nr.17,19,23,27,29) waren im Mittel 2 Kerne (2% der analysierten Kerne) mit 3 Signalen für Chromosom 18 vorhanden. Für Chromosom 21 wurden in 14 Fällen (Nr. 13,14,16,17,19,20,21,25,28,29,31,54,73,129) Kerne mit einem Signal gefunden. Diese 3 Kerne stellten im Mittel 5% der in diesen Fällen ausgewerteten Kerne dar. In 11 Fällen (Nr. 13,16,17,27,28,29,31,54,94,129,131)

wurden für Chromosom 21 3 Signale beobachtet, und zwar in durchschnittlich 2 Kernen (3% der analysierten Kerne). 4 Signale zeigten sich in 2 Fällen für Chromosom 13 und jeweils in 3 Fällen für Chromosom 18 bzw. Chromosom 21 bei durchschnittlich knapp 1% der Kerne.

	1 Signal			3 Signale			4 Signale		
	n Fälle	n Kerne	% Kerne	n Fälle	n Kerne	% Kerne	n Fälle	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	15	3	5	6	2	3	2	1	1
Chr. 18	16	5	8	5	2	2	3	1	1
Chr. 21	14	3	5	11	2	3	3	1	1
Im Mittel	15	4	7	7	2	3	3	1	1

Tab.8 Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 50 auswertbaren Kernen pro Sonde: Fälle mit Auftreten von 1-, 3- oder 4-signaligen Kernen für die Autosomen, jeweilige Anzahl und Prozentsatz der betroffenen Kerne

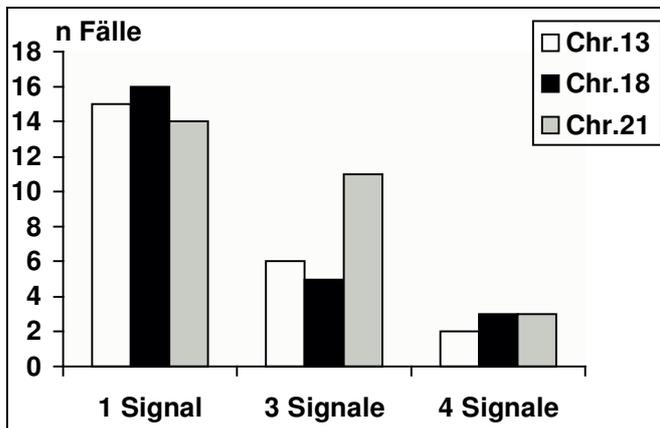


Abb.4 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 ausgewerteten Kerne je Sonde: Anzahl der Fälle mit 1-, 3- und 4- signaligen Kernen für die Autosomen

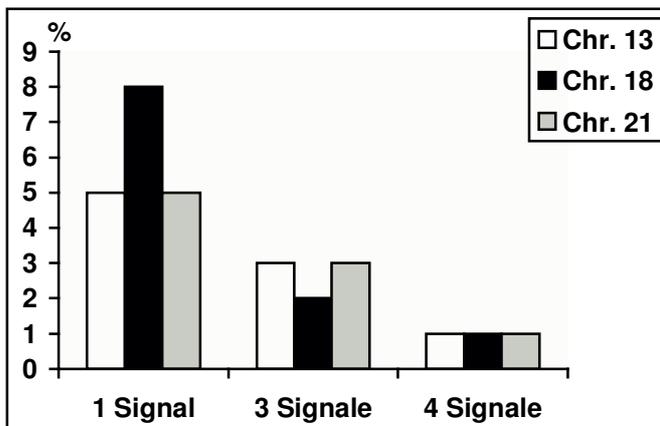


Abb.5 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 ausgewerteten Kernen je Sonde: Prozentsatz der Kerne mit 1, 3 und 4 Signalen für die Autosomen in den Fällen mit Auftreten dieser Signalmuster

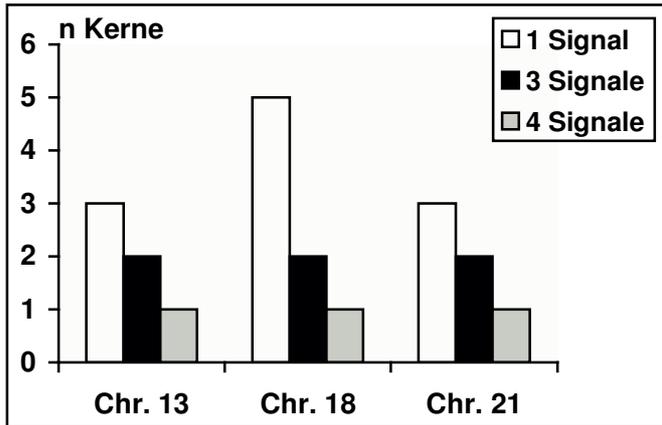


Abb.6 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 50 ausgewerteten Kernen je Sonde: Anzahl der Kerne mit 1, 3 und 4 Signalen für die Autosomen in den Fällen mit Auftreten dieser Signalmuster

### 3.2.1.2. Auswertung für die Gonosomen

Für die Gonosomen lag bei den unauffälligen FISH-Befunden mit mindestens 50 auswertbaren Kernen pro Sonde in 10 Fällen (Nr. 13,16,19,21,23,28,31,52,129,131) die Konstellation XY vor. In 8 dieser Fälle (Nr. 13,16,21,23,31,52,129,131) wiesen alle ausgewerteten Kerne (durchschnittlich 52) das Signalmuster XY auf (siehe Tab.9). In Fall 28 (Abb.7) waren 100 XY-signalige Kerne (96%) vorhanden, daneben 3 Kerne (3%) mit 2 X-Chromosomen und 2 Y-Chromosomen und 1 Kern (1%) mit der Konstellation X0. In Fall 19 (Abb.8) wurden 58 XY- Kerne (95%) gefunden, sowie 2 Kerne (3%) mit XX- und ein Kern (2%) mit Y0-Signalmuster. Insgesamt zeigten in diesen 10 Fällen durchschnittlich 97% der Kerne (57 Kerne) die entsprechende XY-Signalkonstellation. Daneben zeigten 3% der Kerne ein abweichendes Signalbild.

	Fall 28		Fall 19		Durchschnitt der restl. Fälle	
	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
XY	100	96	58	95	52	100
XXYY	3	3	0	0	0	0
XX	0	0	2	3	0	0
X0	1	1	0	0	0	0
Y0	0	0	1	2	0	0

Tab.9 10 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund, mindestens 50 auswertbaren Kernen pro Sonde und männlichem Chromosomensatz: Signalverteilung für die Gonosomen

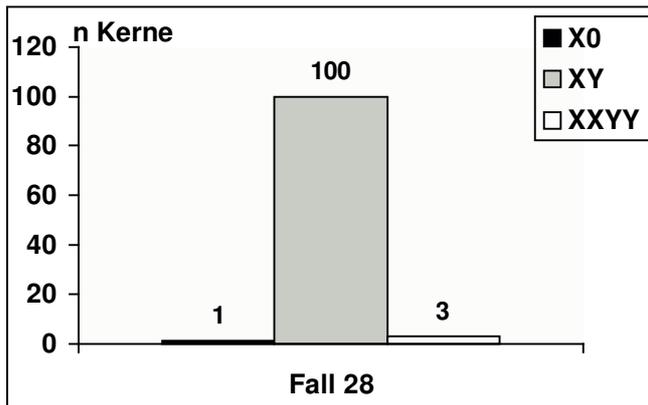


Abb.7 Signalverteilung der Gonosomen in Fall 28

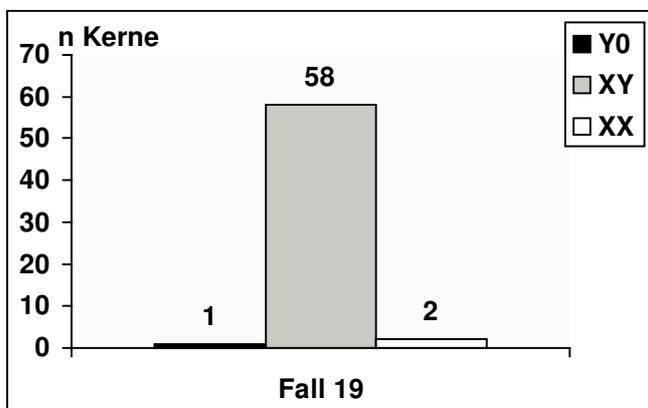


Abb.8 Signalverteilung der Gonosomen in Fall 19

In 9 Fällen (Nr. 14,17,20,25,27,29,51,54,94) mit unauffälligem FISH-Befund und mindestens 50 auswertbaren Kernen je hybridisierter Sonde lag ein weiblicher Gonosomensatz (XX) vor (siehe Tab.10, Abb.9). In 4 Fällen (Nr. 25,27,51,94) zeigten alle 50 ausgewerteten Kerne 2 X-Signale. In den restlichen 5 Fällen (Nr. 54,20,14,17,29) wurden, neben den XX-signaligen Kernen, weitere Kerne mit abweichenden Signalbildern gefunden. Zwei Signale für das X-Chromosom lagen hierbei in durchschnittlich 63 Kernen vor, entsprechend 96% der ausgewerteten Kernen. In den Fällen 54 und 20 wiesen jeweils 2 Kerne (3 bzw. 4%) nur ein X-Signal (X0-Konstellation) auf, neben 49 bzw. 55 Kernen (96 bzw. 97%) mit 2 X-Signalen. In Fall 14 zeigte, neben 52 XX-Kernen (98%), 1 Kern (2%) 3 X-Signale. In Fall 17 waren 96 Kerne (93%) 2-signalig für das X-Chromosom, 5 Kerne (5%) 1-signalig (X0), 1 Kern (1 %) 3-signalig (XXX). Daneben zeigte ein Kern (1%) ein X- und ein Y-Chromosom. In Fall 29 lagen 61 Kerne (98%) mit XX-Konstellation vor und ein Kern (2%) mit 4 X-Signalen (XXXX). Insgesamt zeigten

durchschnittlich 57 Kerne, d.h. 98% der ausgewerteten Kerne in diesen 9 Fällen das entsprechende XX-Signalbild und 3% der Kerne ein abweichendes Signalmuster.

	Fall 54		Fall 20		Fall 14		Fall 17		Fall 29		Restl. Fälle	
	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne								
XX	49	96	55	97	52	98	96	93	61	98	50	100
X0	2	4	2	3	0	0	6	6	0	0	0	0
XXX	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0
XXXX	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
XY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab.10 9 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund, mindestens 50 auswertbaren Kernen pro Sonde und weiblichem Chromosomensatz: Signalverteilung für die Gonosomen

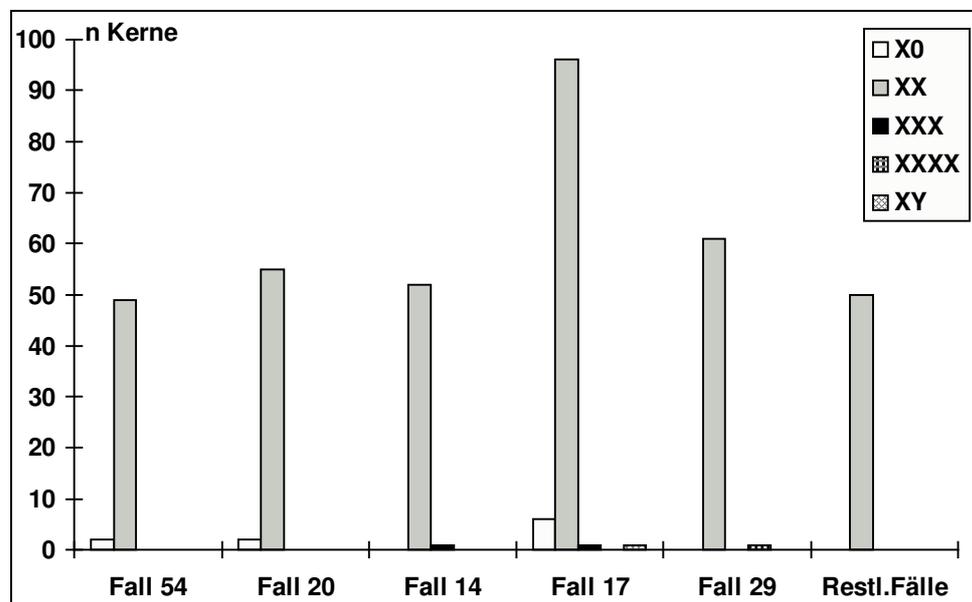


Abb.9 Signalverteilung der Gonosomen in den Fällen mit unauffälligem, weiblichem Karyotyp und FISH-Befund und mindestens 50 auswertbaren Kernen

### 3.2.2. Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 10 bis 49 auswertbaren Kernen pro Sonde

Die Auswertung von mindestens 10 bis 49 Kernen je Hybridisierungssonde war in 25 Fällen (Nr. 9,15,18,24,26,36,39,42,44,45,46,47,55,57,63,65,81,82,89,90,99,102,107,110, 112) mit unauffälligem FISH-Befund (und nachfolgend unauffälligem Karyotyp) möglich. Die Fruchtwasserentnahme wurde in der Mehrzahl dieser Fälle zwischen der 13. und der

23. laufenden Schwangerschaftswoche durchgeführt. In 4 Fällen fand die Amniozentese bei einem Gestationsalter von 31 (Nr. 26,42), 35 (Nr.39) bzw. 39 (Nr.89) Wochen statt. In 22 Fällen wurden über 15 ml Fruchtwasser gewonnen, in Fall 9 14 ml, für die Fälle 89 und 99 ist das Volumen des Aspirates unbekannt. In 19 Fällen hatte das eingesandte Fruchtwasser einen klaren Aspekt, in den Fällen 9, 90 und 110 wurde es als leicht blutig beurteilt und in den Fällen 55, 89 und 102 als blutig. Als Indikation zur Fruchtwasseruntersuchung lagen in 16 Fällen sonographische Auffälligkeiten (Nr. 24,26,36,39,42,45,46,55,63,65,89, 90,99,102,110,121) des Feten vor und in 5 Fällen (Nr. 15,18,57,81,82) ein erhöhtes Altersrisiko der Mutter. In den Fällen 9 und 47 fand die Amniozentese auf Wunsch der Patientin statt, in Fall 107 aufgrund einer positiven Familienanamnese und in Fall 44 aufgrund eines bradykarden Herzrhythmus des Feten.

### 3.2.2.1. Auswertung für die Autosomen

Für die Autosomen konnten in diesen 25 Fällen (siehe Tab.11, Abb.10-12) im Mittel 38 Kerne (12-57) analysiert werden. Davon zeigten 35 Kerne (91%) 2 Signale, 2 Kerne (7%) 1 Signal und 1 Kern (2%) 3 Signale. Für Chromosom 13 waren im Mittel 33 Kerne auswertbar, die in 88% (29 Kernen) 2 Signale aufwiesen, in 10% (3 Kernen) 1 Signal und in 2% (1 Kern) 3 Signale. Für Chromosom 18 wurden im Durchschnitt 44 Kerne analysiert. Dabei waren in 94% der Kerne (42 Kernen) 2 Signale vorhanden, in 4% (2 Kernen) ein Signal und in 1% (1 Kern) 3 Signale. Für Chromosom 21 konnten durchschnittlich 36 Kerne in die Auswertung einbezogen werden. Davon zeigten im Mittel 91% (33 Kerne) 2 Signale, 6% (2 Kerne) 1 Signal und 3% (1 Kern) 3 Signale.

	Ausgewertete Kerne	1 Signal		2 Signale		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	33	3	10	29	88	1	2
Chr. 18	45	2	4	42	94	1	1
Chr. 21	36	2	6	33	91	1	3
Alle Autosomen im Mittel	38	2	7	35	91	1	2

Tab.11 25 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund und mindestens 10–49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittliche Anzahl an auswertbaren Kernen und Signalverteilung für die Autosomen

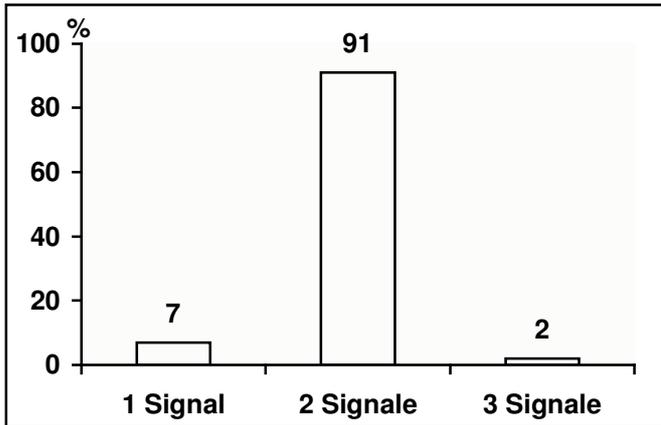


Abb.10 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde:  
Durchschnittlicher Prozentsatz an Kernen mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen

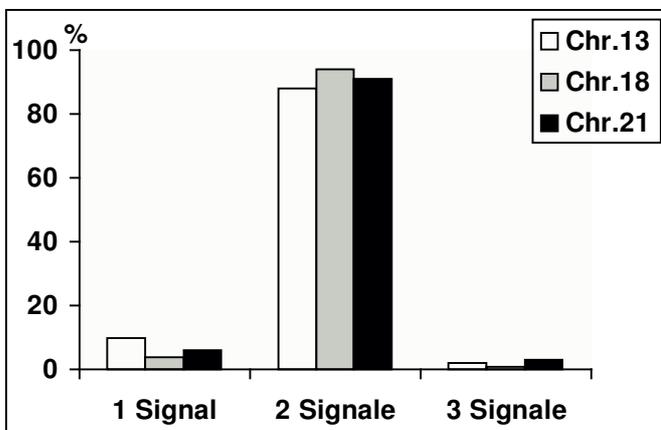


Abb.11 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde:  
Durchschnittlicher Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die einzelnen Autosomen

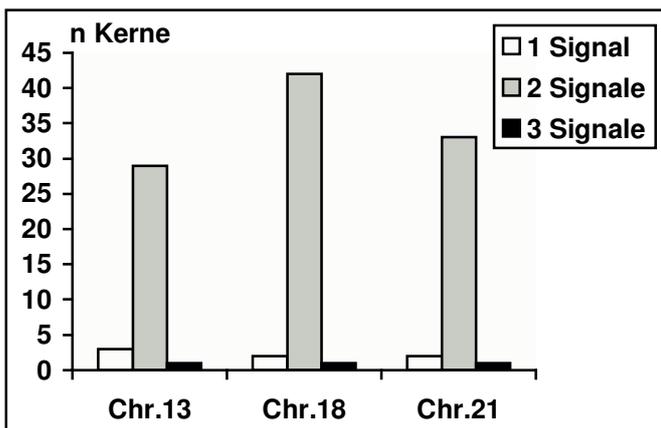


Abb.12 Unauffällige FISH-Befunde mit mind. 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde:  
Durchschnittliche Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen je autosomale Sonde

Nicht in allen Fällen waren für die einzelnen Autosomen neben den disomen Kernen solche mit abweichendem Signalmuster vorhanden. Im folgenden werden speziell die

Fälle mit Auftreten von nicht-2-signaligen Kerne dargestellt (siehe Tab.12, Abb.13-15). Die Prozentzahlen beziehen sich auf die in diesen Fällen im Durchschnitt ausgewertete Anzahl an Kernen.

Für Chromosom 13 waren in 21 (Nr. 15,18,24,36,39,42,44,45,46,47,55,57,63,65,81,82,90, 99,102,110,121) der 25 Fälle jeweils durchschnittlich 4 Kerne (12%) mit nur einem Signal vorhanden, in 10 Fällen (Nr. 9,15,42,45,46,63,65,90,110,121) im Mittel 1 Kern (4%) mit 3 Signalen und in einem Fall (Nr.47) ein Kern (3%) mit 4 Signalen. Für Chromosom 18 zeigten in 15 Fällen (Nr. 15,18,24,36,42,45,47,57,63,65,81,82,99,107,121) durchschnittlich 3 Kerne (8%) 1 Signal, in 11 Fällen (Nr. 9,18,24,42,46,63,65,81,99,102,110) im Mittel jeweils 2 Kerne (3%) 3 Signale und in 4 Fällen (Nr. 15,18,36,47) durchschnittlich ein Kern (2%) 4 Signale. Für Chromosom 21 wurden in 19 Fällen (Nr. 15,18,24,26,36,39, 42,44,45,46,47,55,63,65,82,90,99,110,121) durchschnittlich 2 Kerne (8%) mit 1 Signal gefunden, in 17 Fällen (Nr. 9,15,18,24,26,36,45,46,55,63,81,82,90,102,197,110,121) 2 Kerne (4%) mit 3 Signalen und in 2 Fällen (Nr.9, 47) jeweils 1 Kern (2%) mit 4 Signalen.

	1 Signal			3 Signale			4 Signale		
	n Fälle	% Kerne	n Kerne	n Fälle	% Kerne	n Kerne	n Fälle	% Kerne	n Kerne
Chr. 13	21	12	4	10	4	1	1	3	1
Chr. 18	15	8	3	11	3	2	4	2	1
Chr. 21	19	8	2	17	5	2	2	2	1
im Mittel	18	9	3	13	4	2	2	2	1

Tab.12 Unauffällige FISH-Befunde mit mindestens 10–49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Fälle mit 1-, 3- und 4-signaligen Kernen für die Autosomen

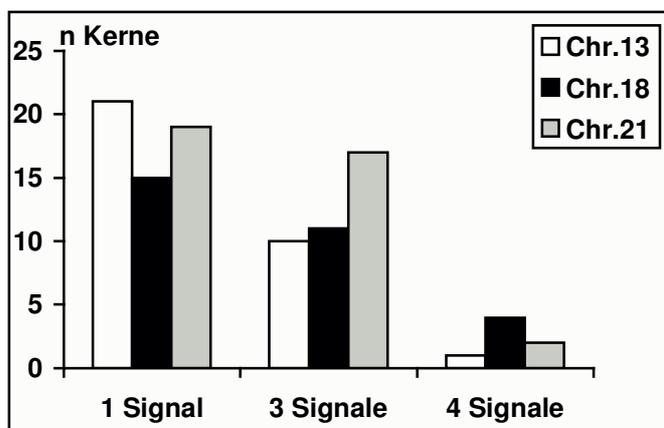


Abb.13 Unauffällige FISH-Befunde mit mind.10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Anzahl der Fälle mit Auftreten von 1-, 3- und 4-signaligen Kernen für die Autosomen

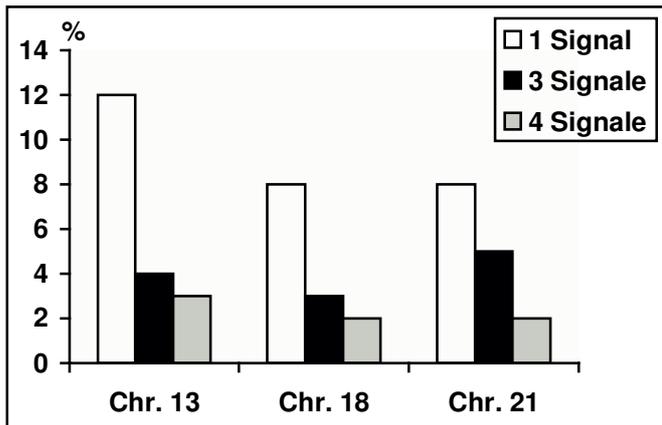


Abb.14 Durchschnittlicher Prozentsatz an Kernen mit 1, 3 und 4 Signalen für die Autosomen in den Fällen mit Auftreten dieser Signalmuster

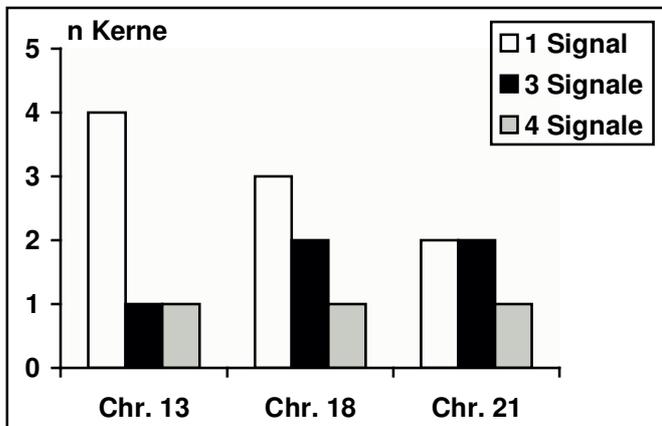


Abb.15 Durchschnittliche Anzahl der Kerne mit 1, 3 und 4 Signalen für die Autosomen in den Fällen mit Auftreten dieser Signalmuster

### 3.2.2.2. Auswertung für die Gonosomen

Im Rahmen der unauffälligen FISH-Befunde mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde lag neunmal die männliche Gonosomenkonstellation XY vor (Tab. 13, Abb.16). In diesen Fällen (Nr. 9,18,26,36,42,45,47,90,99) zeigten durchschnittlich 96% der Kerne (44 Kerne) das entsprechende Signalmuster XY und 4% der Kerne (2 Kerne) eine abweichende Signalgebung. In den Fällen 26 und 90 waren alle analysierten Kerne XY-signalig (20 bzw. 46 Kerne). In den restlichen Fällen waren dies durchschnittlich 47 Kerne (95%), während im Mittel 3 Kerne (5%) eine oder mehrere der folgenden Konstellationen aufwiesen: X0, XX, XXYY, Y0, XYY. In Fall 9 war neben 50 XY-Kernen (96%) ein XX-Kern (4%) vorhanden. In den Fällen 42 und 45 waren 48 (91%) bzw. 31 (97%) Kerne XY-

und 5 (9%) bzw. 1 (3%) Kern X0-signalig. In Fall 99 waren 50 Kerne (96%) XY-signalgebend, während 2 Kerne (4%) nur ein Y-Signal und kein X-Signal zeigten. In Fall 47 wies neben 53 XY-Kernen (98%) ein Kern (2%) 2 Y- und 2 X-Signale auf. In Fall 36 waren ein Kern (2%) mit XX-Chromosomensatz und ein Kern (2%) mit der Konstellation XXYY vorhanden, während 51 Kerne (96%) dem Karyotyp XY entsprachen. In Fall 18 waren dies 45 Kerne (94%), wohingegen jeweils ein Kern (2%) das Signalmuster X0 bzw. XX bzw. XYY zeigte.

Kerne:	Fall 9		Fall 42		Fall 45		Fall 99		Fall 47		Fall 36		Fall 18		Fall 26		Fall 90	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
XY	50	96	48	91	31	97	50	96	53	98	51	96	45	94	20	100	46	100
X0	0	0	5	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
XX	2	4	0	0	1	3	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0
XXYY	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0
XYY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
Y0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab.13 9 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund, mindestens 10–49 auswertbaren Kernen pro Sonde und männlichem Chromosomensatz: Signalverteilung für die Gonosomen

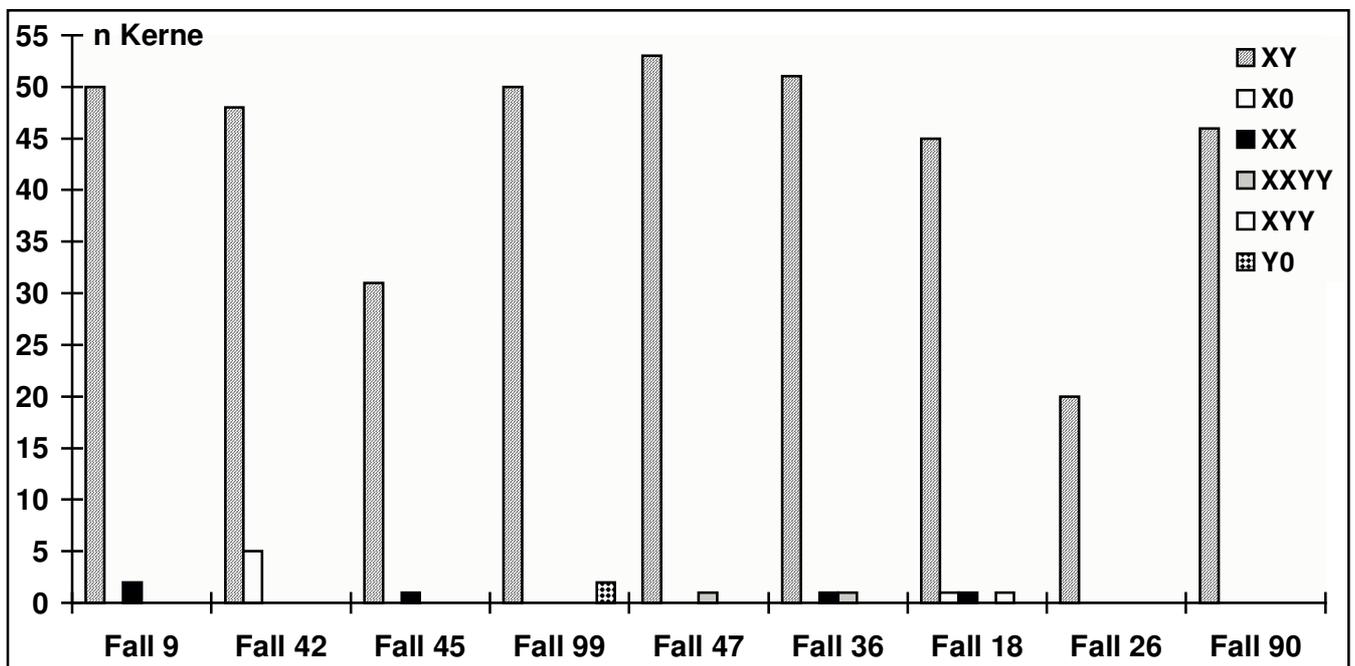


Abb.16 Signalverteilung der Gonosomen in 9 Fällen mit unauffälligem, männlichem Karyotyp und FISH-Befund und mindestens 10–49 auswertbaren Kernen

In 16 (Nr. 15,24,39,44,46,55,57,63,65,81,82,89,102,107,110,121) der 25 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund und mindestens 10 - 49 auswertbaren Kernen pro Sonde, lag

die weibliche Geschlechtschromosomenkonstellation XX vor (siehe Tab.14, Abb.17). Durchschnittlich 97% (im Mittel 44 Kerne) der dabei ausgewerteten Kerne wiesen dieses Signalmuster auf, während die verbleibenden 3% der Kerne jeweils zur Hälfte XO- bzw. XXX-Signale zeigten (jeweils im Mittel 1 Kern). In 7 Fällen wurden keine abweichenden Signalmuster gefunden, d.h. 100% der in diesen Fällen durchschnittlich 45 Kerne hatten die Signalgebung XX. Von den anderen 9 Fällen zeigten 5 Fälle in 1 Kern (3%) das Muster XO und 40 Kerne (97%) die Konstellation XX. In den Fällen 63 und 65 waren zusätzlich auch Kerne mit 3 X-Signalen vorhanden. Es waren dabei 45 bzw. 44 Kerne (jeweils 90%) XX-, 2 Kerne (4 %) bzw. 1 Kern (2%) XO- und 3 bzw. 4 Kerne (6 bzw. 8%) XXX- signalig. In den Fällen 24 und 102 waren neben 44 bzw. 49 XX- signaligen Kernen (94 bzw. 98%) 3 bzw. 1 Kern (6 bzw. 2%) mit der Signalgebung XXX vorhanden.

	Alle Fälle		Fälle 15,39,82,81,89,107,110		Fälle 44,46,55,57,121		Fall 63		Fall 65		Fall 24		Fall 102	
Kerne	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
XX	44	97	45	100	40	97	45	90	44	90	44	94	49	98
XO	1	1,5	0	0	1	3	2	4	1	2	0	0	0	0
XXX	1	1,5	0	0	0	0	3	6	4	8	3	6	1	2

Tab.14 16 Fälle mit unauffälligem FISH-Befund, mindestens 10–49 auswertbaren Kernen pro Sonde und weiblichem Chromosomensatz: Durchschnittliche Signalverteilung für die Gonosomen

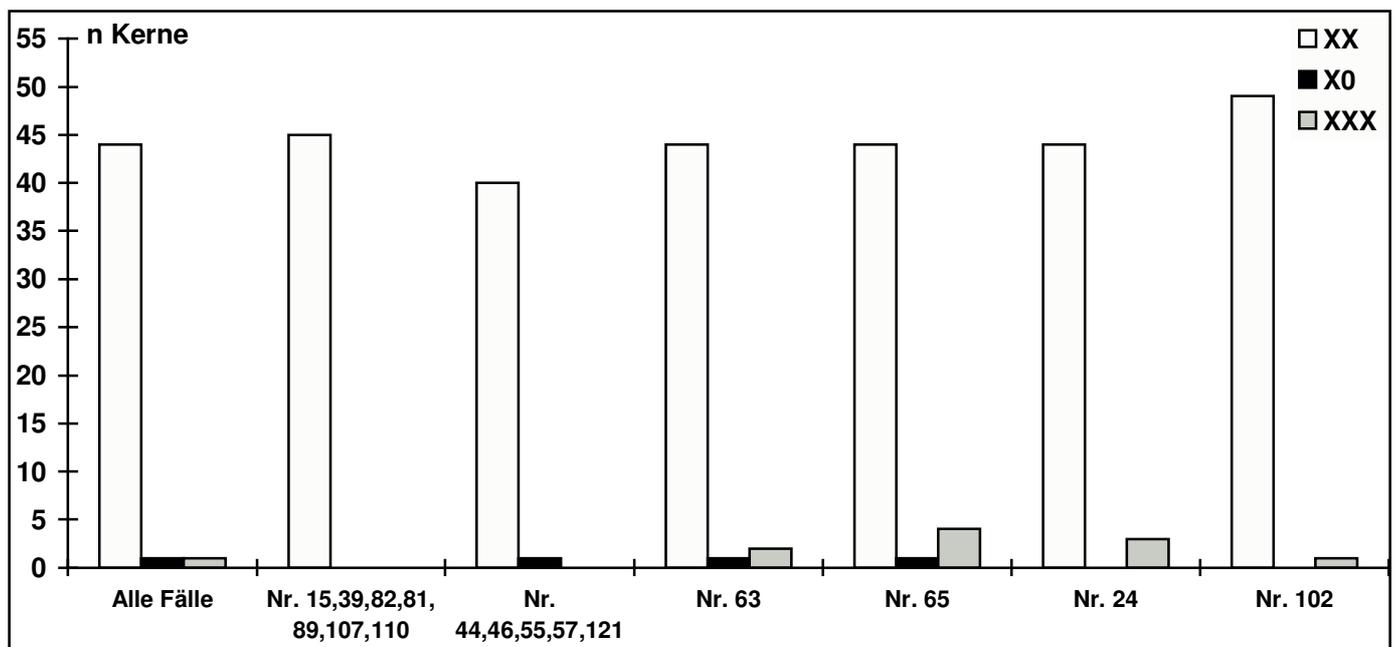


Abb.17 Signalverteilung der Gonosomen in 16 Fällen mit unauffälligem, weiblichen Karyotyp und FISH-Befund und mindestens 10–49 auswertbaren Kernen

### 3.2.3. Unauffällige FISH-Befunde mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden

In sieben Fällen (Nr. 12,92,106,116,122,125,126, siehe Abb.18) mit unauffälligem FISH-Befund, übereinstimmend mit der unauffälligen Karyotypisierung, waren für eine oder mehrere Sonden weniger als 10 Kerne analysierbar. In vier dieser Fälle (Nr. 12, 92,106, 116, siehe Tab.15) lag eine als sehr zellarm eingeschätzte Fruchtwasserprobe vor. Gewonnen wurden diese Proben in der 13. (Nr. 12 und 92) bzw. der 15. Schwangerschaftswoche (Nr. 106 und 116). Die beiden erstgenannten Aspirate hatten ein Volumen von 14 bzw. 13 ml, die beiden letztgenannten ein Volumen von jeweils 18 ml. Probe 116 hatte einen blutigen Aspekt, Probe 106 einen leicht blutigen, die Proben 12 und 92 waren klar. Die Indikationen zur Fruchtwasseruntersuchung waren in den Fällen 92 und 116 sonographische Auffälligkeiten des Fetus, in Fall 12 ein erhöhtes Altersrisiko der Mutter und in Fall 106 ein auffälliger Triple-Test.

Fall	Eigenschaften der FW-Proben				Anzahl der auswertbaren Kerne für			
	SSW	Indikation	FW-Volumen	FW-Aspekt	Chr.13	Chr. 18	Chr. 21	Gonos.
12	13	Altersrisiko	14 ml	klar	5	7	10	16
92	13	Sono	13 ml	klar	5	6	5	7
106	15	Triple-Test	18 ml	leicht blutig	1	16	3	16
116	15	Sono	18 ml	blutig	1	8	4	9

Tab.15 Eigenschaften der FW-Proben und Anzahl der auswertbaren Kerne für die einzelnen Chromosomen in 4 Fällen mit als sehr zellarm beurteiltem Fruchtwasser, unauffälligem FISH-Befund und Karyotyp und weniger als 10 analysierbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden

In drei weiteren Fällen (Nr. 122,125,126, siehe Tab.16) konnten ebenfalls für eine oder mehrere Sonden nur weniger als 10 Kerne ausgewertet werden. In diesen Fällen war das Fruchtwasser jedoch nicht als zellarm beurteilt worden. Die Amniozentese wurde in der 21. (Nr. 122), der 16. (Nr. 126) bzw. der 34. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Gewonnen wurden jeweils 20 ml (Nr. 122 u.125) bzw. 23 ml (Nr. 126) Fruchtwasser. Der Aspekt der Probe war in Fall 126 blutig, in den anderen beiden Fällen klar. Die Indikation zur Fruchtwasseranalyse bestand in allen 3 Fällen in sonographisch sichtbaren Auffälligkeiten des Feten.

Fall	Eigenschaften der FW-Proben				Anzahl der auswertbaren Kerne für			
	SSW	Indikation	FW-Volumen	FW-Aspekt	Chr. 13	Chr. 18	Chr. 21	Gonos.
122	21	Sono	20 ml	klar	2	49	2	47
125	34	Sono	20 ml	klar	3	17	18	50
126	16	Sono	23 ml	blutig	5	30	14	31

Tab.16 Eigenschaften der Proben und Anzahl der auswertbaren Kerne für die einzelnen Chromosomen in 4 Fällen mit nicht als zellarm beurteilten Fruchtwasser, unauffälligem FISH-Befund und Karyotyp und weniger als 10 analysierbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden

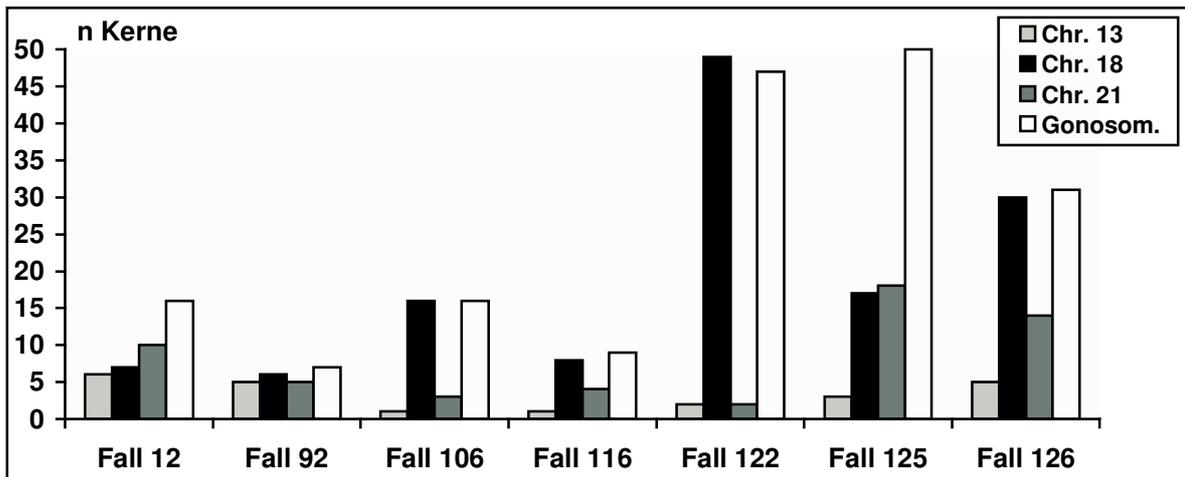


Abb.18 Unauffällige FISH-Befunde mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der auswertbaren Kerne für die untersuchten Chromosomen

In den Fällen 92, 106 und 126 zeigten alle für die Autosomen ausgewerteten Kerne 2 Signale für das jeweilige Chromosom und alle für die Gonosomen ausgewerteten Kerne 2 Signale für das X- Chromosom. In den Fällen 12, 116, 122 und 125 lagen neben den euploidsignaligen Kernen teilweise anderssignalige Kerne vor (siehe Abb.19-22)

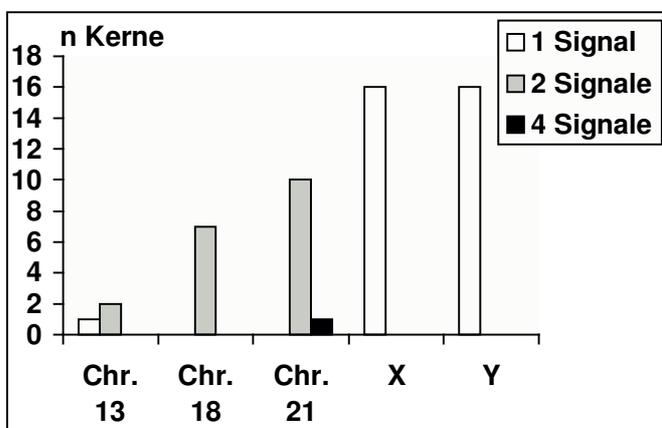


Abb.19 Anzahl der Kerne mit 1, 2, und 4 Signalen für Auto- und Gonosomen in Fall 12

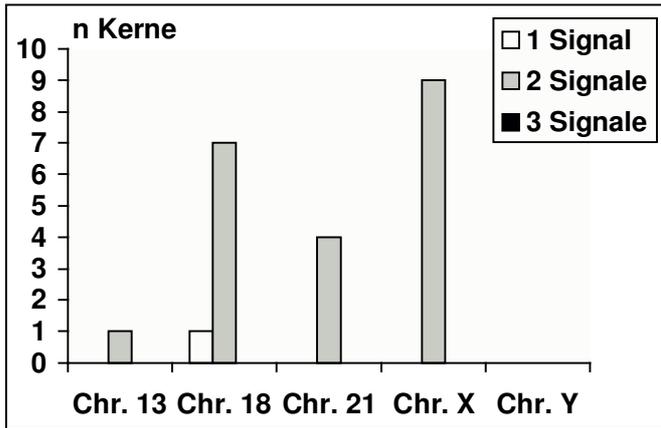


Abb.20 Anzahl der Kerne mit 1, 2, und 3 Signalen für Auto- und Gonosomen in Fall 116

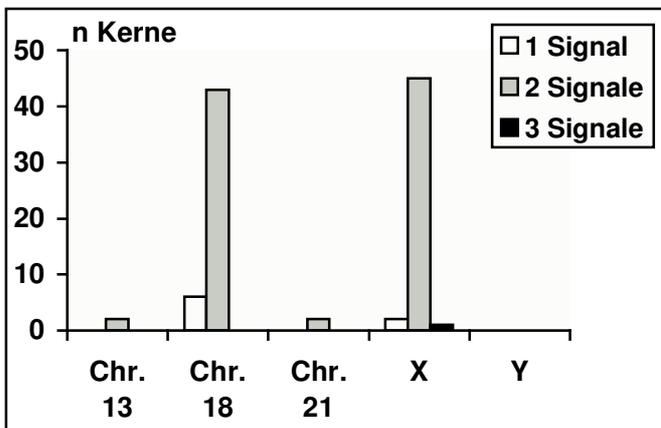


Abb.21 Anzahl der Kerne mit 1,2 und 3 Signalen für Auto- und Gonosomen in Fall 122

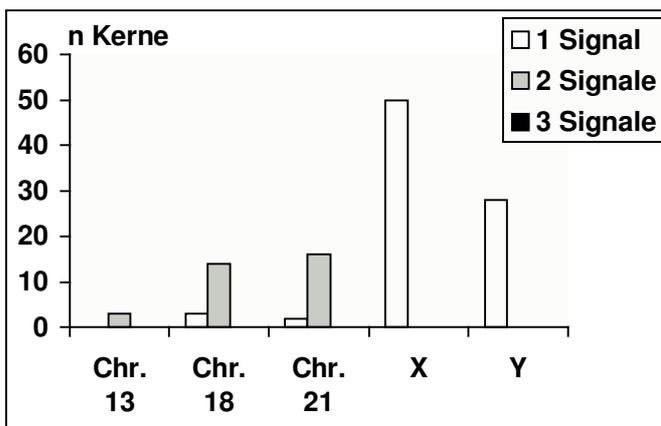


Abb.22 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Auto- und Gonosomen in Fall 125

### 3.3. Pathologische FISH-Befunde

In der konventionellen Chromosomenanalyse wurden folgende pathologischen Karyotypen gefunden (siehe Tab.17): 5 Fälle mit strukturellen Veränderungen (4% aller Fälle, 21% der auffälligen Karyotypen), 7 Fälle mit Trisomie 21 (5% aller Fälle, 29% der auffälligen Karyotypen), 4 Fälle mit Trisomie 18 (3% aller Fälle, 17% der auffälligen Karyotypen), 4 Fälle mit Triploidie (3% aller Fälle, 17% der pathologischen Karyotypen), 2 Fälle mit Monosomie X (2% aller Fälle, 8% der pathologischen Befunde), ein Fall mit Trisomie 13 (0,8% aller Fälle, 4% der pathologischen Befunde) und ein Fall mit der Chromosomenkonstellation 46, XXY, +21 (0,8% aller Fälle, 4% der pathologischen Befunde). 15 Fälle (63% dieser 24 Fälle) zeigten einen auffälligen FISH-Befund mit mehr als 60% aneuploiden Kernen. In 9 Fällen (37%) konnte die auffällige Chromosomenkonstellationen mittels FISH nicht detektiert werden, sie fielen damit in die Gruppe der problematischen FISH-Befunde.

	n Fälle	% aller 129 Fälle	% der path. Karyotypen (konventionelle Chromosomenanalyse)	mit FISH erkannt	mit FISH nicht erkannt
Trisomie 21	6	5	25	4	2
46,XX,-14,+rt (14q21q)	1	0,8	4	+21 erkannt	-
Trisomie 13	1	0,8	4	-	1
Trisomie 18	4	3	17	3	1
Triploidie	4	3	17	4	-
Monosomie X	2	2	8	2	-
48,XXY,+21	1	0,8	4	1	-
46,XX,rca 8p	1	0,8	4	-	1
46,XX,46,t(10;17)	1	0,8	4	-	1
46,XX,del (4p)	1	0,8	4	-	1
46,XX,var Yp	1	0,8	4	-	1
46,XX,inv(3) (p25;q12)	1	0,8	4	-	1

Tab.17 Numerische und strukturelle Aberrationen in der konventionellen Chromosomenanalyse: Anzahl der Fälle, Anteil an allen Fällen und an den pathologischen Karyotypen, Ergebnis der entsprechenden FISH-Untersuchungen

### 3.3.1. Mit FISH erkannte Fälle von Trisomie 21

Von 7 Fällen mit Trisomie 21 (6 freie Trisomien und eine Robertson-Translokation) konnten 5 (Nr. 48,53,49,120,22) durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der unkultivierten Fruchtwasserzellen erkannt werden (siehe Abb.23-25). Die Indikation für die Fruchtwasseruntersuchung waren jeweils sonographische Auffälligkeiten. Die Amniozentese erfolgte in der 32., 36., 12. bzw. 14. (Nr.120 u. 22) Schwangerschaftswoche. Es wurden dabei 21 ml, 20ml, 16 ml bzw. 14 ml (Nr. 120 u. 22) Fruchtwasser entnommen.

In den beiden Fällen (Nummer 48 u. 53) mit hohem Gestationsalter (32. bzw. 36. SSW) und großem Punktatvolumen (20 und 21 ml), sowie in Fall 22 konnten jeweils über 50 Interphasekerne pro Sonde analysiert werden. In den zwei Fällen (Nummer 49 und 120) mit früher Amniozentese (12. bzw. 14. Schwangerschaftswoche) und kleiner Fruchtwassermenge (16 bzw. 14 ml) konnten nur 9 bis 20 Kerne pro Sonde ausgewertet werden, da nur wenig Zellen im Fruchtwasser und Präparat vorhanden waren. In vier Fällen lag klares Fruchtwasser vor, bei Fall 120 wurde es als leicht blutig klassifiziert.

In allen 5 Fällen zeigten mehr als 60% der Kerne, die für Chromosom 21 ausgewertet wurden, 3 Signale. Im Durchschnitt waren in 82% der Kerne 3 Signale vorhanden, in 17% der Kerne 2 Signale, in 0,5% 1 Signal und in 0,5% 4 Signale. In Fall 48 waren in 55 von 59 Kernen, d.h. in 93% der ausgewerteten Kerne, 3 Signale für die Chromosom 21-spezifische Sonde zu sehen. Für Fall 53 konnten in 48 von 54 Kernen, 3 Signale für Chromosom 21 gefunden werden. Dies entspricht 89% der ausgewerteten Kerne für dieses Chromosom. In Fall 49 waren 20 Kerne für die Chromosom 21-Sonde analysierbar, davon zeigten 18, d.h. 90%, 3 Signale. In Fall 120 wiesen 9 der 12 auswertbaren Kerne (75%) 3 Signale für Chromosom 21 auf. In Fall 22 waren dafür 33 von 53 Kernen, entsprechend 62% 3-signalig. In den restlichen, für die Chromosom 21-spezifische Sonde analysierten Kernen waren jeweils 2 Signale zu sehen, lediglich ein Kern des Falles 53 wies 1 Signal auf, sowie ein Kern des Falles 22 vier Signale. Für die anderen untersuchten Chromosomen (13, 18, X, Y) konnten 4 bis 56 Kerne (im Mittel 36) analysiert werden. Dabei waren 50 bis 100% der Kerne euploid für das jeweilige Chromosom.

Für die Fälle 48, 49 und 120 wurde das FISH-Ergebnis durch die konventionelle Karyotypisierung bestätigt. Im Fall 22 konnte die Karyotypisierung ebenfalls das Vorliegen einer Trisomie 21 bestätigen und zusätzlich deren Entstehung durch eine Robertson-Translokation (46,XX, -14,+rt(14q,21q)) klären. Im Fall 53 gelang mit dem zugesandten

Material keine Zellkultur, da kein Zellwachstum stattfand. Infolgedessen konnte keine Metaphasenanalyse durchgeführt werden, der FISH-Befund bleibt unbestätigt.

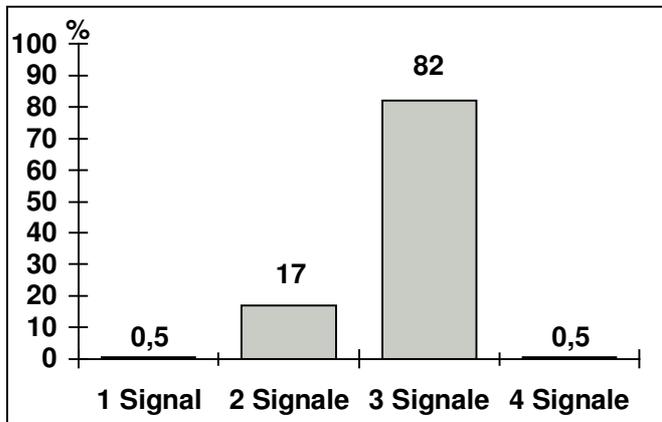


Abb.23 5 FISH-Befunde bei Trisomie 21:  
Durchschnittlicher Prozentsatz an Kernen mit 1, 2, 3 und 4 Signalen für Chromosom 21

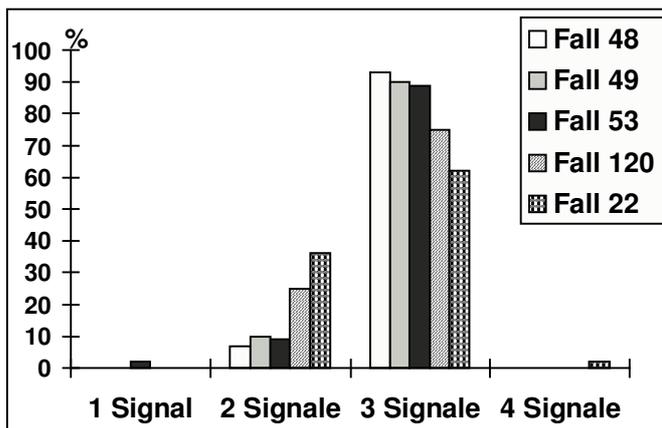


Abb.24 5 FISH-Befunde bei Trisomie 21:  
Prozentsatz der Kerne mit 1, 2, 3 und 4 Signalen für Chromosom 21

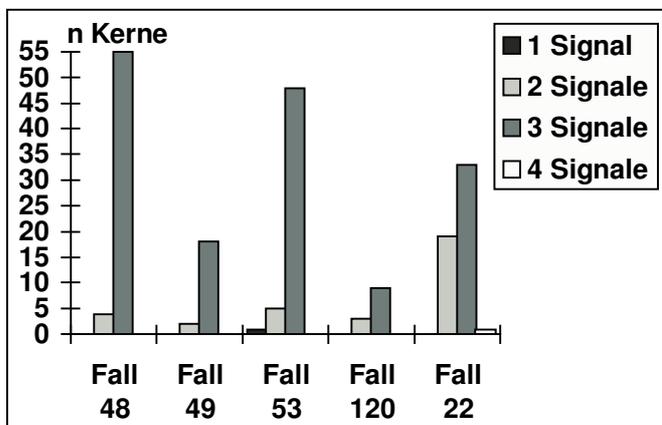


Abb.25 5 FISH-Befunde mit Trisomie 21:  
Anzahl der Kerne mit 1, 2, 3 und 4 Signalen für Chromosom 21

### 3.3.2. Mit FISH erkannte Fälle von Trisomie 18

In drei der vier Fälle, bei denen eine Trisomie 18 durch die Karyotypisierung nachgewiesen wurde, ergab die FISH-Untersuchung der unkultivierten Fruchtwasserzellen vorab ein entsprechendes Signalmuster für die Chromosom 18-spezifische Sonde (Fälle Nummer 58, 97 und 105, Abb.26-28).

Die Indikation für die Fruchtwasseruntersuchung war in Fall 105 der sonographische Befund einer Megazystis (gleichzeitig lag ein erhöhtes Alter der Mutter von 47 Jahren vor) und in Fall 58 der Befund eines komplexen Fehlbildungssyndroms mit Auftreten von vorzeitigen Wehen. Für Fall 97 ist die Indikation unbekannt. Die Amniozentese wurde in den Fällen 58 und 97 jeweils in der 32. laufenden Schwangerschaftswoche durchgeführt. Dabei wurde 100 ml bzw. 35 ml klares Fruchtwasser entnommen. In Fall 105 fand die Punktion in der 16. Schwangerschaftswoche statt. Es wurden 20 ml klares Fruchtwasser aspiriert.

Für die Chromosom18-spezifische Sonde konnten zwischen 23 und 58 Kernen (im Mittel 46 Kerne) analysiert werden. In allen drei Fällen wiesen über 60% der Kerne drei Signale für Chromosom 18 auf. Durchschnittlich waren dies 79%. In durchschnittlich 21% der Kerne waren dagegen nur zwei Signale zu sehen. In Fall 58 wurden für die Chromosom 18-spezifische Sonde 56 Kerne ausgewertet. Davon zeigten 50 Kerne (89%) drei Signale und 6 Kerne (11%) zwei Signale. In Fall 97 wiesen 50 der 58 analysierten Kerne drei Signale für Chromosom 18 auf (86%). Die restlichen Kerne (14%) zeigten zwei Signale für dieses Chromosom. Für Fall 105 konnten insgesamt 23 Kerne ausgewertet werden. Sie zeigten in 61% drei Signale (14 Kerne) und in 39% zwei Signale (9 Kerne). Für die Chromosomen 13, 21, X und Y waren jeweils 10 bis 54 Kerne (im Mittel 26 Kerne) analysierbar. Sie zeigten zu 77 bis 100% ein euploides Signalmuster.

In Fall 105 war durch den vergleichsweise geringen Prozentsatz an dreisignaligen Kernen (61%) von einer Trisomie 18 in der Mehrzahl der Zellen ausgegangen worden. Das heißt, auch eine Mosaikkonstellation wurde in Betracht gezogen. In den anderen beiden Fällen wurde mit einer vollständigen Trisomie 18 gerechnet. Die konventionelle Chromosomenanalyse wies für alle drei Fälle in allen untersuchten Metaphasen ein zusätzliches Chromosom 18 nach.

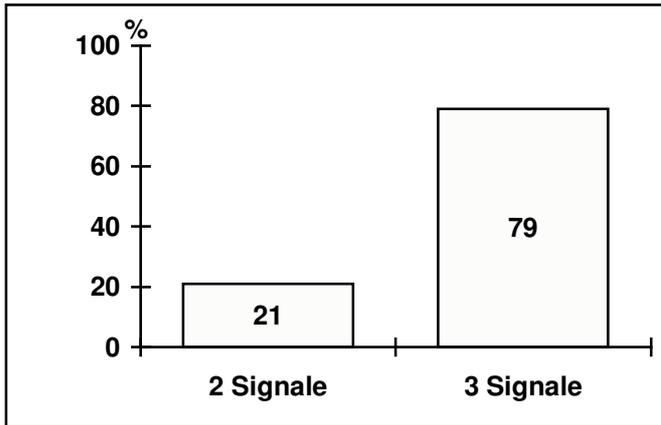


Abb.26 3 FISH-Befunde bei Trisomie 18:  
Durchschnittlicher Prozentsatz der Kerne mit 3 Signalen für Chromosom 18

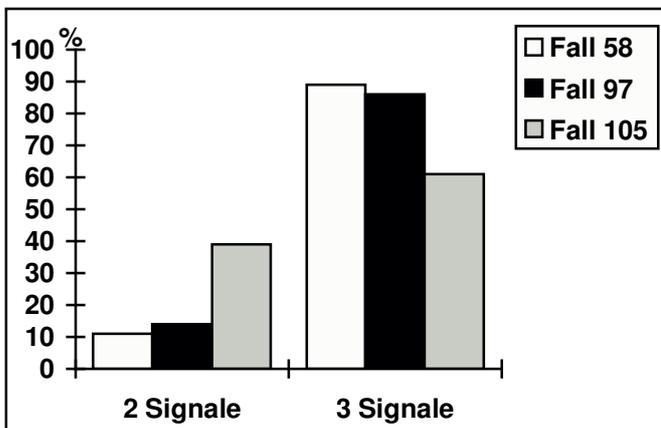


Abb.27 3 FISH-Befunde bei Trisomie 18:  
Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

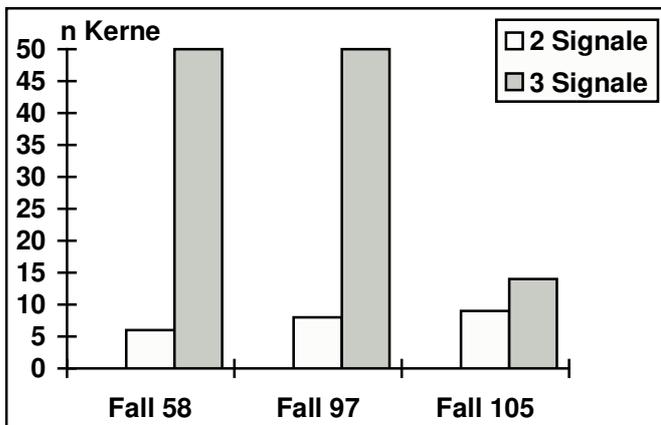


Abb.28 3 FISH-Befunde bei Trisomie 18:  
Anzahl der Kerne mit 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

### 3.3.3. Mit FISH erkannte Fälle von Triploidie

In vier Fällen lag im FISH-Befund in der Mehrzahl der Kerne ein triploider Chromosomensatz für die untersuchten Autosomen vor und die Konstellation XXX (Fälle Nr. 62 und 111) bzw. XXY (Fälle Nr. 85 und 127) für die Gonosomen.

Die Indikation für die Fruchtwasseruntersuchung war in den Fällen 62 und 85 eine sonographisch festgestellte Wachstumsretardierung. In Fall 62 war Geminus II im Vergleich zu Geminus I ca. 8 Wochen im Wachstum zurückgeblieben. In Fall 85 lag eine Retardierung des Feten von ca. vier Wochen gegenüber dem errechneten Schwangerschaftsalter vor. In Fall 111 war bei der Ultraschalluntersuchung eine komplexe Fehlbildung (Truncus arteriosus communis, Extremitätenfehlstellung) entdeckt worden. Die FISH-Analyse an unkultivierten Fruchtwasserzellen erfolgte in Fall 127 nachdem eine Chorionzottenbiopsie einen triploiden Chromosomensatz des Feten ergeben hatte. In diesem Fall wurde die Amniozentese in der 13. Schwangerschaftswoche durchgeführt, wobei 14 ml Fruchtwasser aspiriert werden konnten. In den Fällen 111 und 85 wurde jeweils in der 21. Schwangerschaftswoche Fruchtwasser punktiert. Die Menge betrug für Fall 111 20 ml, für Fall 85 ist sie unbekannt. In Fall 62 fand die Amniozentese in der 26. Schwangerschaftswoche statt, es wurden 19 ml Fruchtwasser gewonnen. Das Aspirat war in Fall 127 leicht blutig, in den anderen Fällen wurde es als klar beurteilt.

In Fall 62 (Tab.18, Abb.29-31) wurden für die Chromosomen 13, 18, 21 und X im Durchschnitt 41 Kerne ausgewertet. Dabei lagen in durchschnittlich 72% der Kerne 3 Signale vor, und in 28% der Kerne 2 Signale. Die Sonden für die Chromosomen 13 und 21 zeigten eine schwächere Signalintensität im Vergleich zu den Sonden für die Chromosomen 18 und X, dies wurde als präparativ bedingt erklärt. Für die Chromosomen 13 und 21 konnten durchschnittlich 32 Kerne ausgewertet werden, für die Chromosomen 18 und X durchschnittlich 50 Kerne. Für die Sonden 13 und 21 zeigten durchschnittlich 19 Kerne (16%) 3 Signale und 13 Kerne (40%) 2 Signale. Für die Sonden 18 und X dagegen wiesen durchschnittlich 84% der Kerne (42 Kerne) 3 Signale auf und 16% (8 Kerne) 2 Signale. Die Hybridisierung für Chromosom 21 ergab als einzige aller Hybridisierungen in den vier Fällen mit Triploidie einen Anteil an Kernen mit 3 Signalen von unter 60% (57%). Dementsprechend lag der Anteil an zweisegmentigen Kernen hier mit 43% am höchsten. Für das Y-Chromosom waren keine Signale sichtbar.

Da insgesamt in der Mehrzahl der ausgewerteten Zellen 3 Signale für die Sonden 13, 18, 21 und X vorlagen, wurde eine überwiegende Triploidie (69,XXX) des Feten angenommen. Die durchflußzytometrische Untersuchung von 50.000 kultivierten Fruchtwasserzellen ergab eine reine Triploidie ohne Hinweis auf eine diploide Zellpopulation. Der diploide Anteil an Kernen in der FISH-Untersuchung wurde deshalb retrospektiv als maternale Zellkontamination interpretiert.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr.13	33	21	64	12	36
Chr.18	50	41	82	9	18
Chr.21	30	17	57	13	43
Chr.X	50	43	86	7	14
im Mittel	41	31	72	10	28

Tab.18 Anzahl der ausgewerteten Kerne und Signalverteilung in Fall 62

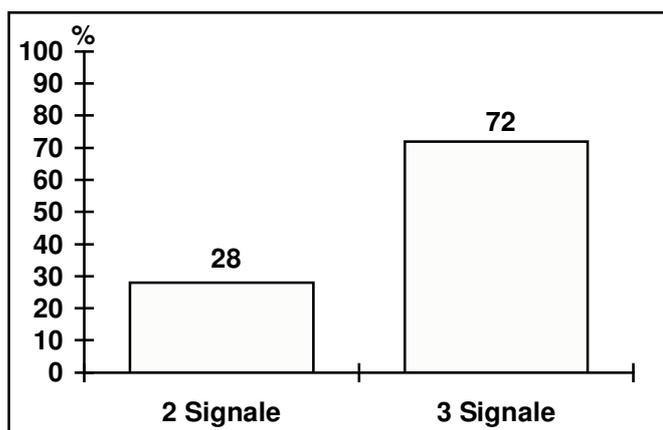


Abb.29 Durchschnittlicher Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für alle Sonden in Fall 62

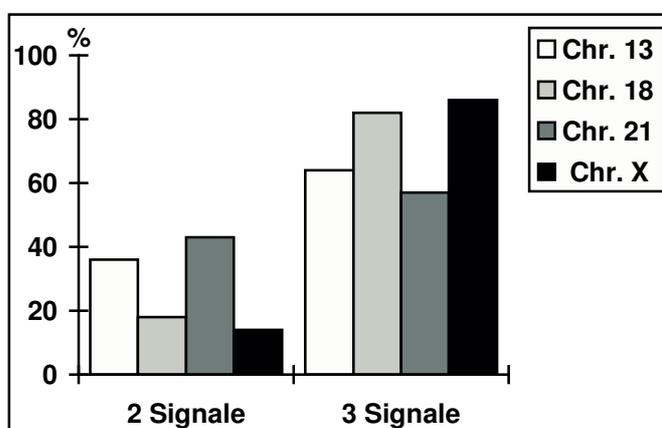


Abb.30 Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für die einzelnen Chromosomen in Fall 62

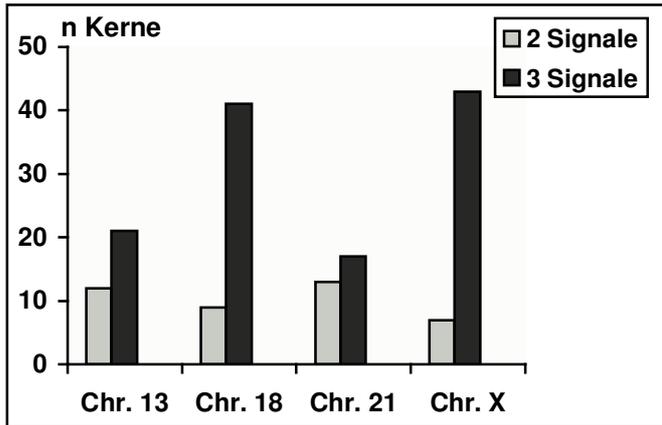


Abb.31 Anzahl der Kerne mit 2 und 3 Signalen je Sonde in Fall 62

In Fall 111 (Tab.19, Abb.32-34) zeigten im Mittel 90% der analysierten Kerne drei Signale und 10% zwei Signale. Durchschnittlich 23 Kerne pro Sonde waren auswertbar. Dieser Durchschnitt ergibt sich aus einer unterschiedlichen Anzahl an signalgebenden Kernen: Für Sonde 13 waren dies drei Kerne, für Sonde 21 9, für Sonde X 37 Kerne und für Sonde 18 41 Kerne. Für das Y-Chromosom waren keine Signale vorhanden. Für alle Sonden waren in über 75% der Kerne drei Signale zu sehen. Im einzelnen waren es 100% für Chromosom 13 (jedoch nur 3 Kerne), 78% (7 Kerne) für Chromosom 21, 88% (36 Kerne) für Chromosom 18 und 92% (34 Kerne) für das X-Chromosom. In den restlichen ausgewerteten Kernen waren jeweils 2 Signale vorhanden. Da die Mehrzahl analysierten Kernen 3 Signale zeigte, wurde eine triploide Chromosomenkonstellation (69,XXX) für die Mehrzahl der fetalen Zellen angenommen. Bei der folgenden konventionellen Chromosomenanalyse fand sich in allen untersuchten 16 Metaphasen der vermutete Karyotyp 69, XXX.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	3	3	100	0	0
Chr. 18	41	36	88	5	12
Chr. 21	9	7	78	2	22
Chr. X	37	34	92	3	8
im Mittel	23	20	90	3	10

Tab.19 Anzahl der ausgewerteten Kerne und Signalverteilung in Fall 111

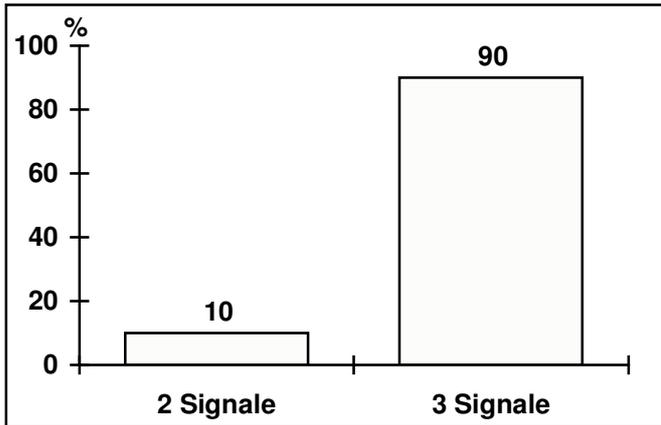


Abb.32 Durchschnittlicher Prozentsatz an 2- und 3signaligen Kernen für alle Sonden in Fall 111

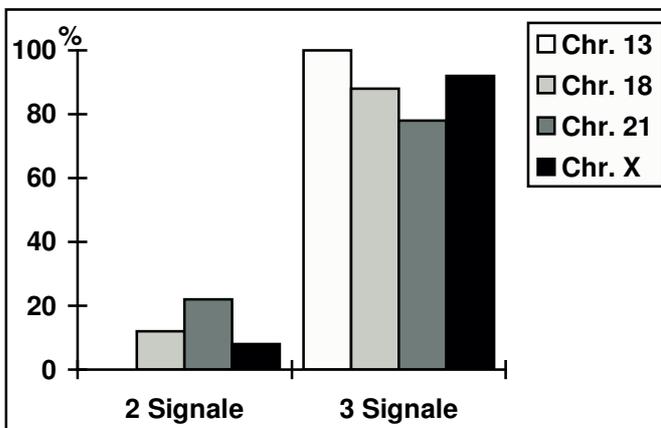


Abb.33 Prozentsatz an Kernen mit 2 und 3 Signalen für die einzelnen Chromosomen in Fall 111

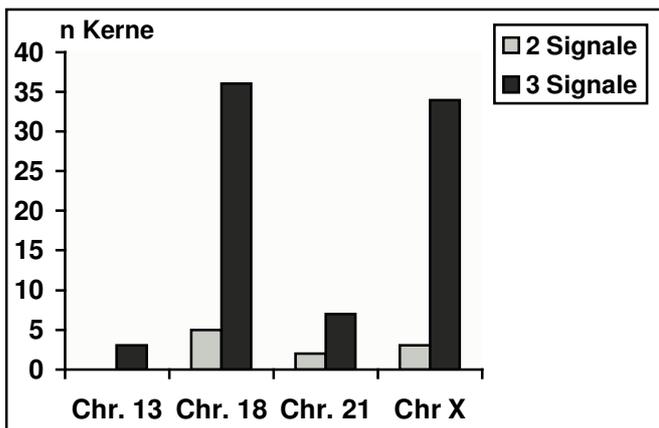


Abb.34 Anzahl der Kerne mit 2 und 3 Signalen je Sonde in Fall 111

In Fall 85 (Tab.20, Abb.35-37) konnten für die Autosomen durchschnittlich 40 Kerne analysiert werden. Sie zeigten im Mittel in 85% 3 Signale und in 15% 2 Signale. Für die Gonosomen waren in allen 20 ausgewerteten Kernen 2 Signale für das X-Chromosom und

1 Signal für das Y-Chromosom zu sehen. Für Chromosom 21 wiesen 44 von 50 Kernen (88%) 3 Signale auf und 6 Kerne (12%) zwei Signale. Für Chromosom 18 wurden 21 Kerne analysiert, von denen 19 (91%) 3 Signale und 2 (9%) zwei Signale zeigten. Die Signale für Chromosom 13 waren oft schwach. Dies könnte der Grund dafür sein, daß in 12 von 50 Kernen (24%) 2 Signale vorhanden waren und in 38 Kernen (76%) drei Signale. Das heißt, der Anteil an 2signaligen Kernen war mindestens doppelt so hoch wie für die anderen Sonden.

Insgesamt lag für die untersuchten Autosomen in über 75% der Kerne ein dreifaches Signal vor und für die Gonosomen in 20 von 20 Kerne das Signalmuster XXY. Deshalb wurde von einem triploiden Chromosomensatz in der überwiegenden Mehrzahl der Kerne ausgegangen. Die anschließende konventionelle Karyotypisierung ergab für alle untersuchten Metaphasen (n=16) die Chromosomenkonstellation 69, XXY. Die aufgrund des FISH-Befundes erhobene Verdachtsdiagnose wurde somit bestätigt.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale		1 Signal	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	50	38	76	12	24	0	0
Chr. 18	21	19	91	2	9	0	0
Chr. 21	50	44	88	6	12	0	0
Autosomen im Mittel	40	34	85	7	15	0	0
Chr. X	20	0	0	20	100	0	0
Chr. Y	20	0	0	0	0	20	100

Tab.20 Anzahl der ausgewerteten Kerne und Signalverteilung in Fall 85

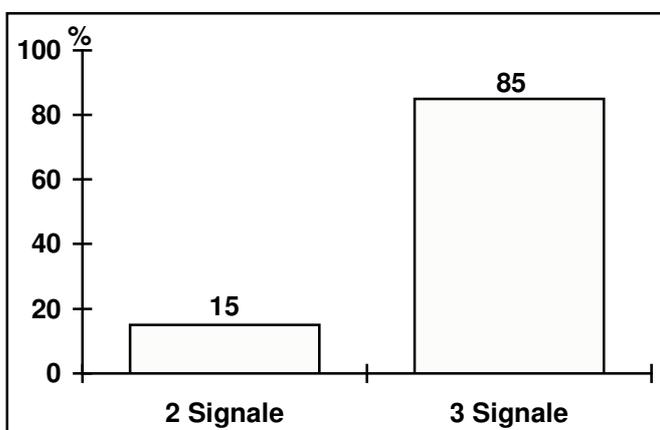


Abb.35 Durchschnittlicher Prozentsatz an 2 und 3signaligen Kernen für alle Autosomen in Fall 85

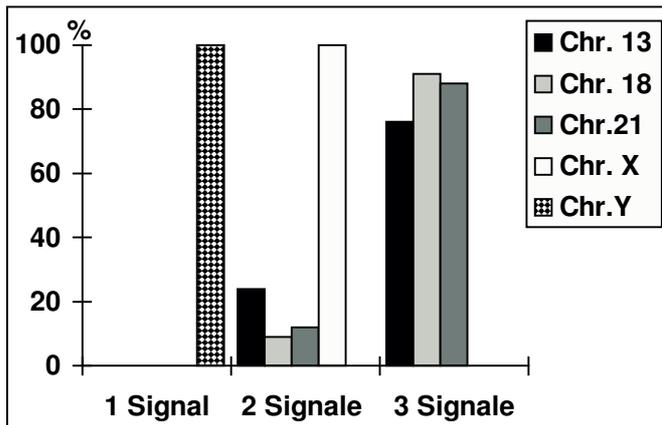


Abb.36 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die einzelnen Sonden in Fall 85

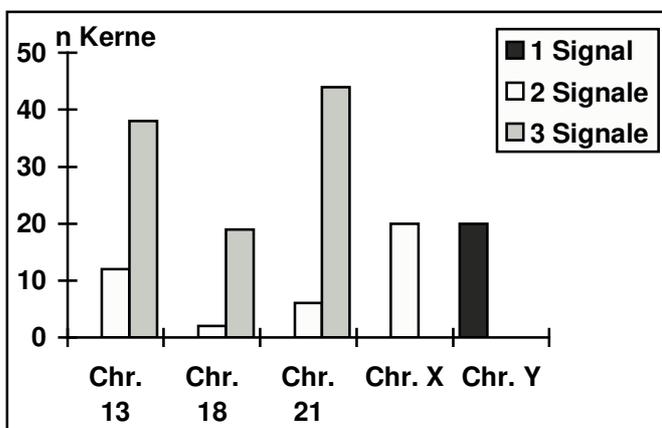


Abb.37 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen je Sonde in Fall 85

In Fall 127 (Tab.21, Abb.38-40) war das Fruchtwasser zellarm. Für die Autosomen konnten durchschnittlich 16 Kerne (14 - 17) ausgewertet werden, für das Y-Chromosom 13 Kerne und für das X-Chromosom 7 Kerne. Die X-Chromosom-spezifische Sonde zeigte auffällig oft Kreuzhybridisierungen. In 5 Kernen (71%) waren 2 Signale für das X-Chromosom nachweisbar, in 2 Kernen (29%) dagegen nur eines. Für das Y-Chromosom wiesen alle 13 Kerne 1 Signal auf. Für die Autosomen zeigten im Mittel 72% der Kerne 3 Signale und 28% 2 Signale. Für Chromosom 13 waren in 14 von 17 Kernen (82%) 3 Signale zu sehen, in 3 Kernen (18%) 2 Signale. Für Chromosom 18 wurden in 9 von 14 Kernen (64%) 3 Signale gefunden und in 5 Kernen (36%) 2 Signale. Für Chromosom 21 waren in 12 von 17 Kernen (71%) 3 Signale vorhanden und in 5 Kernen (29%) 2 Signale. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für zumindest 2/3 der verfügbaren Kerne die Chromosomenkonstellation 69,XXY angenommen. Für den Feten wurde deshalb von einer Mosaikkonstellation mit deutlichem Überwiegen der triploiden Zellen ausgegangen.

Es wurde auch eine geringfügige maternale Zellkontamination als Ursache des diploiden Signalmusters in einigen Zellen für möglich gehalten. Die FISH- Untersuchung war durchgeführt worden, nachdem eine vorausgegangene Chorionzottenbiopsie den Hinweis auf einen triploiden Chromosomensatz ergeben hatte. Durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte der Verdacht bestätigt werden. Eine Metaphasenanalyse kultivierter Fruchtwasserzellen erfolgte nicht mehr.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale		1 Signal	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	17	14	82	3	18	0	0
Chr. 18	14	9	64	5	36	0	0
Chr. 21	17	12	71	5	29	0	0
Autosomen im Mittel	16	12	72	4	28	0	0
Chr. X	7	0	0	5	71	2	29
Chr. Y	13	0	0	0	0	13	100

Tab.21 Anzahl der ausgewerteten Kerne und Signalverteilung in Fall 127

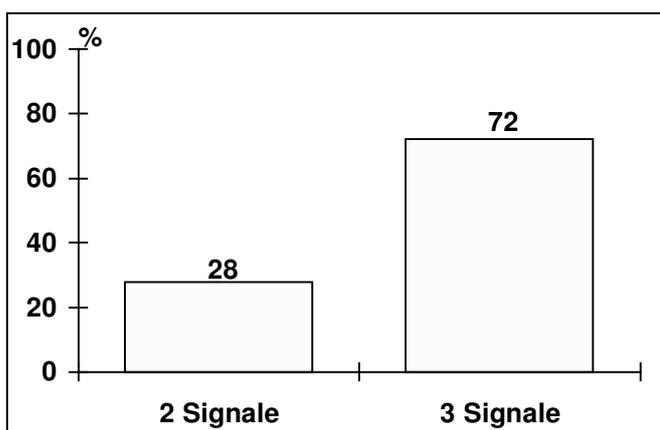


Abb.38 Durchschnittlicher Prozentsatz an 2- und 3signaligen Kernen für alle Autosomen in Fall 127

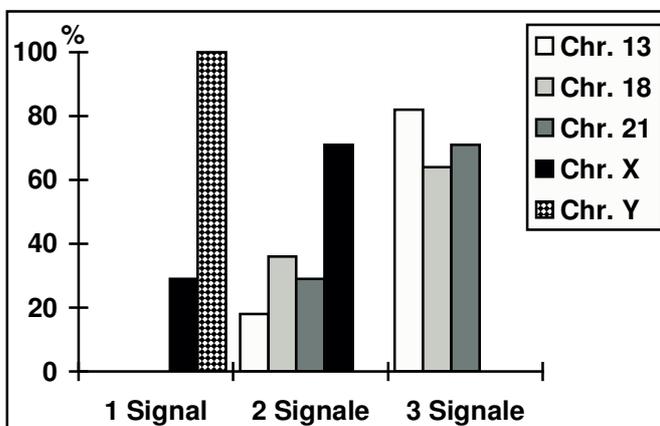


Abb.39 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die einzelnen Chromosomen in Fall 127

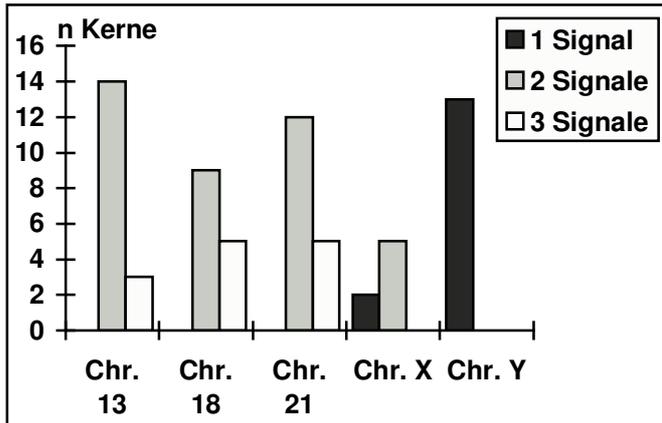


Abb.40 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen je Sonde in Fall 127

Zusammenfassend (Tab.22 und 32, Abb.41-44) konnten für die autosomalen Sonden in den vier Fällen mit triploidem Chromosomensatz im FISH-Befund durchschnittlich 28 Kerne ausgewertet werden. Im Mittel zeigten 78% (22 Kerne) 3 Signale und 22% (6 Kerne) 2 Signale. Für Chromosom 13 waren im Durchschnitt 28 Kerne analysierbar. 81% davon wiesen 3 Signale auf und 19% 2 Signale. Für Chromosom 18 wurden im Mittel 32 Kerne ausgewertet. 3 Signale waren dabei in 81% der Kerne sichtbar und 2 Signale in 19%. Für Chromosom 21 konnten durchschnittlich 27 Kerne analysiert werden. In 73% davon waren 3 Signale vorhanden und in 27% 2 Signale.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 62	38	26	67	11	33
Fall 111	18	15	89	2	11
Fall 85	40	34	85	7	15
Fall 127	16	12	72	4	28
im Mittel	28	22	78	6	22

Tab.22 Durchschnittliche Anzahl an auswertbaren Kerne und Signalverteilung je Triploidie-Fall für die Autosomen

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	3 Signale		2 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr. 13	28	19	81	7	19
Chr. 18	31	26	81	5	19
Chr. 21	27	20	73	7	27
Im Mittel	28	22	78	6	22

Tab.23 Hybridisierungsverhalten der autosomalen Sonden in allen Triploidiefällen

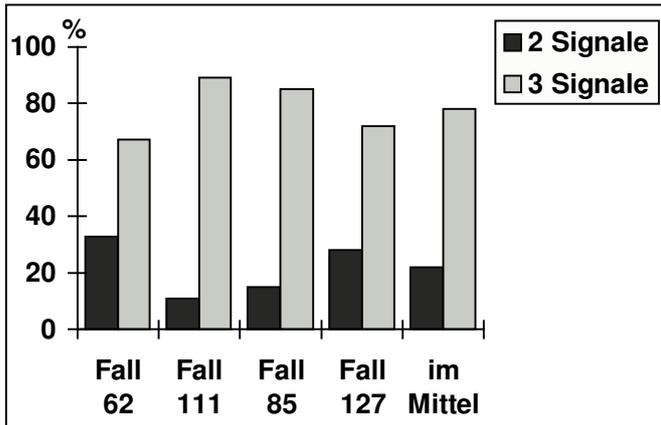


Abb.41 Durchschnittlicher Prozentsatz an Kernen mit 2 und 3 Signalen je Triploidiefall für die Autosomen

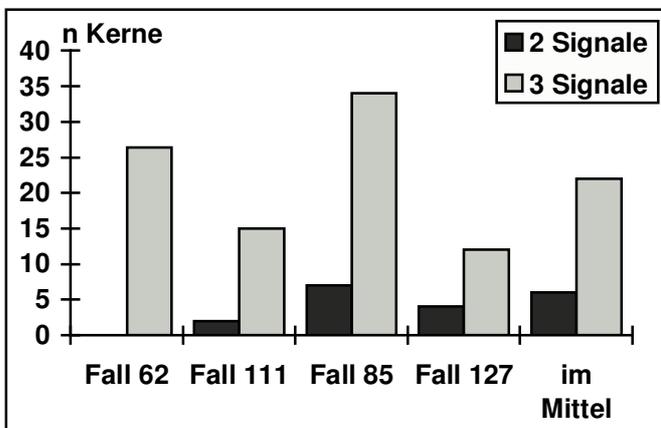


Abb.42 Durchschnittliche Anzahl an Kernen mit 2 und 3 Signalen je Triploidiefall für die Autosomen

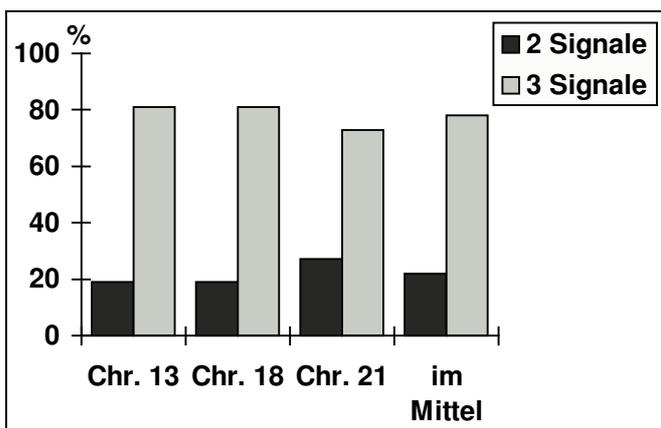


Abb.43 Durchschnittlicher Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für die Autosomen in allen Triploidiefällen

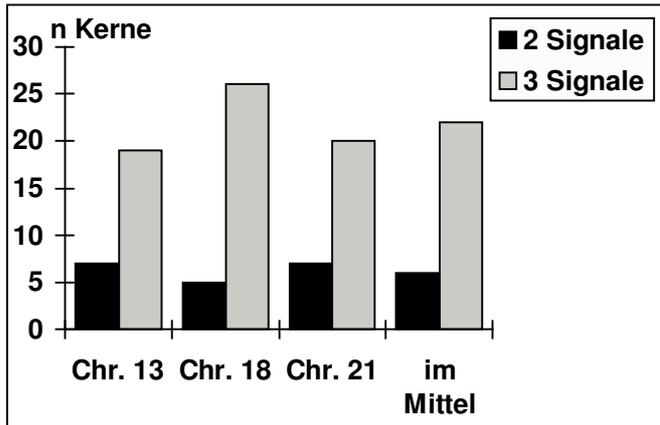


Abb.44 Durchschnittliche Anzahl der Kerne mit 2 und 3 Signalen für die Autosomen in allen Triploidiefällen

In den Fällen (Fall 62 und 111, Tab.24) mit Gonosomenkonstellation XXX konnten für das X-Chromosom durchschnittlich 44 Kerne ausgewertet werden. Sie zeigten im Mittel in 89% 3 Signale und in 11% 2 Signale. Für das Y-Chromosom waren keine Signale zu sehen. In den Fällen (Nr. 85 und 127, Tab.25) mit dem Geschlechtschromosomensatz XXY waren für das X-Chromosom durchschnittlich 14 Kerne analysierbar und für das Y-Chromosom durchschnittlich 17 Kerne. Für Chromosom X wiesen 86% der Kerne 2 Signale auf und 14% ein Signal. Für das Y-Chromosom war in allen Kerne 1 Signal zu sehen.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne für Chromosom X	3 Signale		2 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 62	50	43	86	7	14
Fall 111	37	34	92	3	8
Im Mittel	44	39	89	5	11

Tab.24 Gonosomenkonstellation XXX in zwei Triploidiefällen

XXY	Anzahl der ausgewerteten Kerne		2 Signale				1 Signal			
			n Kerne		% Kerne		n Kerne		% Kerne	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Fall 85	20	20	20	0	100	0	0	20	0	100
Fall 127	7	13	5	0	71	0	2	13	29	100
Im Mittel	14	17	13	0	86	0	1	17	14	100

Tab.25 Gonosomenkonstellation XXY in zwei Triploidiefällen

### 3.3.4. Mit FISH erkannte Fälle von Monosomie X

In Fall 8 und Fall 30 (Abb.45) ergab sich im FISH-Befund der Hinweis auf das Vorliegen des Chromosomensatzes 45, X0. Aufgrund sonographisch festgestellte Auffälligkeiten der Feten (Hygroma colli in Fall 8 und Hydrops fetalis in Fall 30) waren jeweils in der 14. Schwangerschaftswoche je 15 ml Fruchtwasser entnommen worden. In Fall 8 zeigten alle 50 analysierten Kerne ein X-Signal und kein Signal für das männliche Geschlechtschromosom. Ein Kern wies sowohl für das X- als auch für das Y-Chromosom ein Signal auf. Diese Konstellation wurde als vereinbar mit einer Monosomie X des Feten gewertet. Die konventionelle Chromosomenanalyse wies den vermuteten Chromosomensatz für alle untersuchten Metaphasen nach.

In Fall 30 (Abb.46) konnten für Chromosom X nur 12 Kerne ausgewertet werden. Davon zeigten 9 Kerne (75%) 1 Signal und 3 Kerne (25%) 2 Signale. Für das Y Chromosom waren keine Signale sichtbar. Diese Konstellation wurde als Hinweis auf eine Monosomie X des Feten gewertet. Wegen der geringen Zahl an auswertbaren Kerne und teilweise diffuser Hybridisierungssignale durch gesprenkeltes Aussehen von Kernen und Untergrund konnte jedoch keine definitive Aussage getroffen werden. Die Karyotypisierung ergab in allen untersuchten Metaphasen den Chromosomensatz 45,X0. Damit wurde die Richtigkeit des Hinweises aus der FISH-Untersuchung bestätigt.

Für die anderen hybridisierten autosomalen Sonden liegen für Fall 8 keine Angaben vor. In Fall 30 konnten jeweils zwischen 12 und 17 Kerne (im Durchschnitt 14) ausgewertet werden. Sie wiesen in 92 bis 94% (durchschnittlich 93%) ein euploides Signalmuster auf.

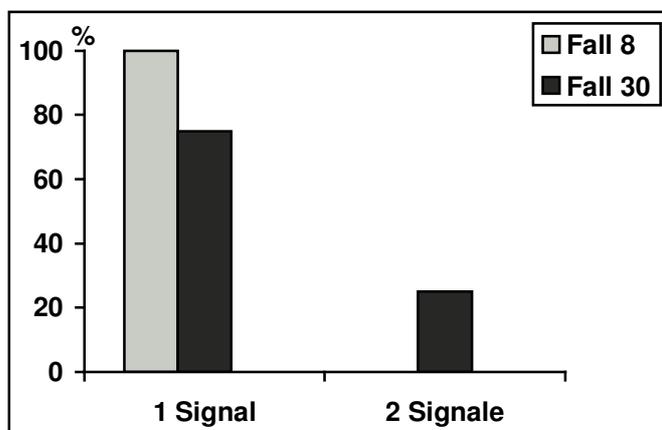


Abb.45 Prozentsatz der Kerne mit 1 und 2 Signalen für Chromosom X in den Monosomie X-Fällen

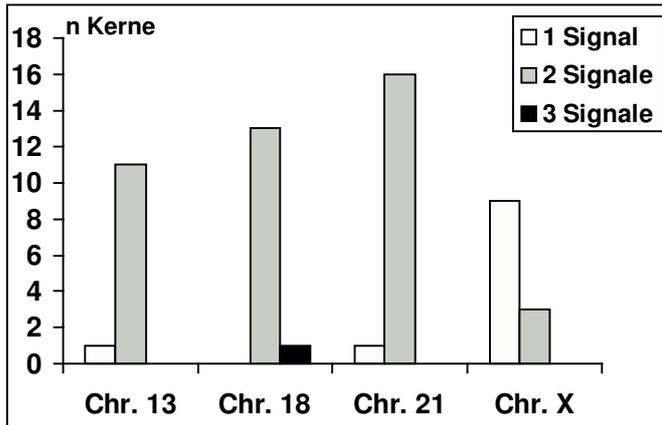


Abb.46 Anzahl der Kerne mit 1, 2, und 3 Signalen für die einzelnen Chromosomen in Fall 30

### 3.3.5. Mit FISH erkannter Fall mit der Konstellation 48, XXY, +21

In Fall 50 (Abb.47) wurden in der 14. Schwangerschaftswoche 18 ml klares Fruchtwasser entnommen. Bei dem Feten fiel sonographisch, im Vergleich zum zweiten Zwilling, eine verdickte Nackenfalte auf. Für alle Sonden konnten über 50 Kerne ausgewertet werden. Für die Chromosomen 13 und 18 waren jeweils in 96% der Kerne 2 Signale erkennbar. Die restlichen 3- bis 4% der Kerne zeigten 1 Signal. Für Chromosom 21 waren dagegen in 50 von 55 Kernen (91%) 3 Signale zu sehen. 9% der Kerne wiesen 2 Signale auf. Für die gonosomalen Sonden waren in 52 von 59 Kerne (88%) zwei X-Signale und ein Y-Signal vorhanden. In weiteren 5 Kernen (9%) waren nur 2 X-Signale zu erkennen und in 2 Kernen (3%) die Konstellation XY. Die letzteren Befunde wurden als maternale bzw. geminale Kontamination gewertet, sodass sich für den Feten der wahrscheinliche Chromosomensatz 48,XXY,+21 ergab. In der konventionellen Karyotypisierung war ebendiese Chromosomenkonstellation in 11 von 16 Metaphasen nachweisbar. Drei Metaphasen hatten einen weiblichen Chromosomensatz mit einem zusätzlichen Chromosom 21. Zwei Metaphasen die Konstellation 46,XX. Hierfür wurde eine mütterliche Zellkontamination als Ursache in Betracht gezogen. Insgesamt konnte der FISH-Befund in der Mehrzahl der Metaphasen bestätigt werden.

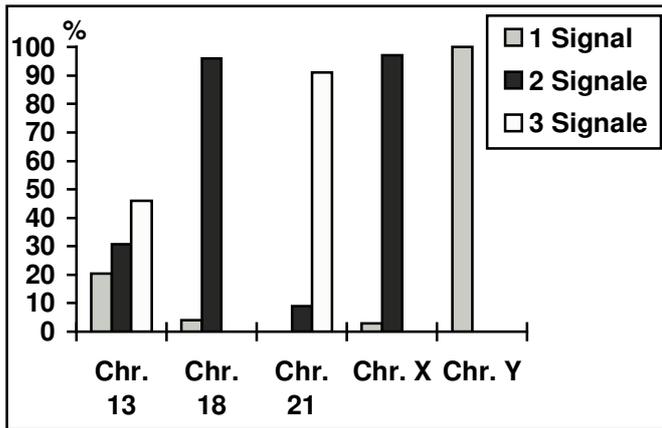


Abb.47 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen je Sonde in Fall 50

### **3.4. Problematische FISH-Befunde**

#### **3.4.1. Problematische FISH-Befunde unter den Fällen mit unauffälligem Karyotyp**

##### **3.4.1.1. Hybridisierung ergab keine Signale für alle verwendeten Sonden**

In 12 Fällen (Nr. 5,32,33,35,37,75,77,79,80,97,113,119; siehe Tab.26) mit letztendlich unauffälligem Befund in der konventionellen Chromosomenanalyse (entsprechend 11% der 105 Fälle mit unauffälligem Karyotyp und 9% aller 129 Fälle) war für keine der hybridisierten Sonden eine Auswertung möglich. Dabei nimmt Fall 35 insofern eine Sonderstellung ein, als das hybridisierte Material hierbei aus dem Hygrom (=Indikation) des Feten abpunktierte Flüssigkeit war, nicht Fruchtwasser wie in allen übrigen Fällen. Die 50 ml Hygromflüssigkeit wurden in der 26. Schwangerschaftswoche gewonnen und zeigten Blutbeimengungen. In Fall 32 wurden 20 ml klares Fruchtwasser in der 33. Schwangerschaftswoche gewonnen, da der Fet eine Spina bifida mit konsekutivem Hydrocephalus aufwies. Das Präparat wurde nur 2 Stunden zur Hybridisierung inkubiert und zeigte bei der Auswertung keine Signale.

In den Fällen 5,75,77,79,80,97 war die Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht möglich, da zu wenig Material vorlag. In Fall 97 waren die wenigen Zellen zudem stark aufgequollen und es waren massenhaft Bakterien zu sehen. Die Amniozentese wurde in diesen Fällen in der 13. bis 16. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Dabei konnten zwischen 13 und 18 ml klares Fruchtwasser gewonnen werden. Die Indikationen waren sonographische Auffälligkeiten (Nr. 5,79,80), ein erhöhtes Altersrisiko der Mutter (Nr. 97), ein positiver Triple-Test (Nr. 75) sowie der Zustand nach Geburt eines Kindes mit Trisomie 18 und Spätabort bei Trisomie 5 in Fall 77.

In den Fällen 33, 37, 113 und 119 zeigten sich nach der Hybridisierung bei ausreichender Zellzahl keine Signale, ohne daß eine eindeutige Ursache erkennbar gewesen wäre. Die Fruchtwasserentnahme wurde jeweils in der 20. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Die Indikation waren sonographische Auffälligkeiten (Nr. 33,113,119) bzw. ein erhöhtes Altersrisiko in Fall 31. Fruchtwassermenge und -aspekt sind in 3 Fällen unbekannt, in Fall 33 wurden 20 ml klares Fruchtwasser abpunktiert. In Fall 33 wurde als eventuelle Ursache

für das Fehlschlagen der Hybridisierung eine Überalterung der Proben in Betracht gezogen. In Fall 113 fiel auf, daß die Zellen stark aufgequollen waren.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation	Probleme
Fall 35	26+6	50 ml (Hygrom- flüssigkeit)	Blut- beimengung	Hygrom Geminus II	Zellen haben Hybridisierung nicht überstanden
Fall 32	33+6	20 ml	klar	Spina bifida, Hydrocephalus	Hybridisierung nur 2 Stunden
Fall 5	13+5	13 ml	klar	Nackenödem 4,2 mm, V.a. AV-Kanal	Zu wenig Material
Fall 75	16	16 ml	klar	Pos. Triple-Test (1:17)	Zu wenig Material
Fall 77	16+3	18 ml	klar	Z.n. Kind m. Tris.18, Z.n. Spätabort bei Trisomie 5	Zu wenig Material
Fall 79	14+1	15 ml	klar	Hygroma colli	Zu wenig Material
Fall 80	13+6	16 ml	klar	Geminus I: Nackenödem 4 mm, relativ klein	Zu wenig Material
Fall 97	13+5	14 ml	klar	Altersrisiko	Bakterien; Signale kaum erkennbar, Zellen stark aufgequollen
Fall 113	20+5	?	?	Omphalocele	Keine Signale, Zellen aufgequollen
Fall 119	20+5	?	klar	Pyelektasie bds., double outlet right ventricle	Keine Signale, Ursache ?
Fall 33	20+2	20 ml	klar	Omphalocele, komplexes Vitium	Keine Signale, evt. Proben zu alt
Fall 37	20+4	?	?	Altersrisiko	Keine Signale

Tab.26 12 Fälle mit fehlenden Signalen für alle Sonden

### 3.4.1.2. Keine Signale für eine oder mehrere Sonden je Fall

In 18 Fällen mit unauffälligem Karyotyp (Nr.2,6,7,10,11,34,38,43,59,60,66,68,70,71,84, 91,108,114) waren für eine oder mehrere Sonden pro Fall keine Signale sichtbar. Dies entspricht 17% der 105 Fälle mit unauffälligem Karyotyp und 14% aller 129 Fälle. Die einzelnen Sonden waren dabei unterschiedlich häufig betroffen (Abb.48): Die Sonde für Chromosom 13mal, für Chromosom 21 12mal, für Chromosom 18 5mal und für Chromosom X und Y je 3mal.

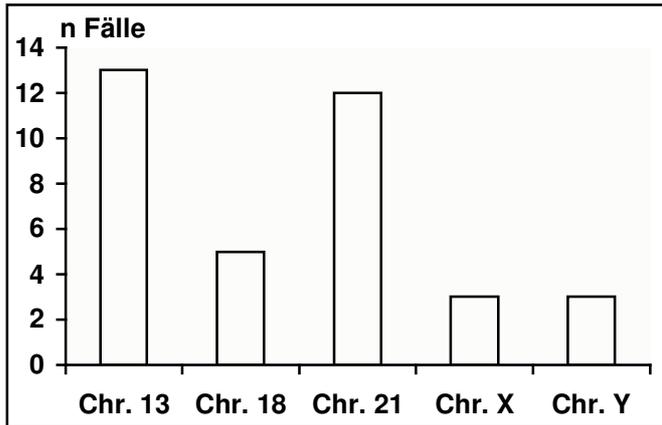


Abb.48 18 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der betroffenen Fälle für die einzelnen Chromosomen

In 7 Fällen (39% dieser Fälle; Tab.27, Abb.49 und 50) mit Versagen der Hybridisierung einzelner Sonden konnten für die nichtbetroffenen Sonden mindestens 10 Kerne (einzige Ausnahme: Fall 2, Chromosom 21: hier waren nur 8 Kerne auswertbar) ausgezählt werden, und es traten keine zusätzlichen Probleme bei der Auswertung auf. In Fall 2 waren nur für Sonde 13 keine Signale zu sehen, für die Chromosomen 18 und 21 waren in 15 bzw. 8 Kernen (jeweils 100% der auswertbaren Kerne) 2 Signale sichtbar und für die Gonosomen in allen 40 auswertbaren Kernen die Konstellation XY. In den Fällen 68, 70, 71 und 108 gelang die Hybridisierung für die Chromosomen 13 und 21 nicht. Für die anderen Sonden zeigte sich in 25 bis 50 auswertbaren Kernen jeweils in weniger als 10% (0-6%) der Kerne ein aneuploides Signalmuster. In den Fällen 59 und 91 zeigten sich nur für die Chromosomen 13 und 21 Signale, während die Hybridisierung für die Chromosomen 18 und XY fehlschlug. Für Chromosom 13 waren 16 bzw. 22 Kerne auswertbar, von denen 94 bzw. 85% 2 Signale zeigten. Für Chromosom 21 waren 18 bzw. 36 Kerne analysierbar, sie wiesen in 79 bzw. 97% 2 Signale auf. Der Anteil der aneuploiden, d.h. 3signaligen Nuclei betrug jeweils 0–5%.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation	Keine Signale für Chromosom
Fall 2	17+6	20 ml	klar	Pathologischer Triple-Test (1:160)	13
Fall 68	38+0	30 ml	klar	Fetale Retardierung, V.a. Aortenisthmusstenose, singuläre Nabelschnurarterie	13, 21
Fall 70	32+5	20 ml	klar	Zystische Nierendegeneration Potter IIa	13, 21
Fall 71	20+5	?	klar	Altersrisiko	13, 21
Fall 108	33+1	22 ml	klar	Massive fetale Hydronephrose	13, 21
Fall 59	13+3	13 ml	klar	Nackenödem 3,2 mm	18, XY
Fall 91	18+1	18 ml	klar	Pathologischer Triple-Test	18, XY

Tab.27 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden je Fall und mindestens 10 auswertbaren Kernen für die übrigen Sonden

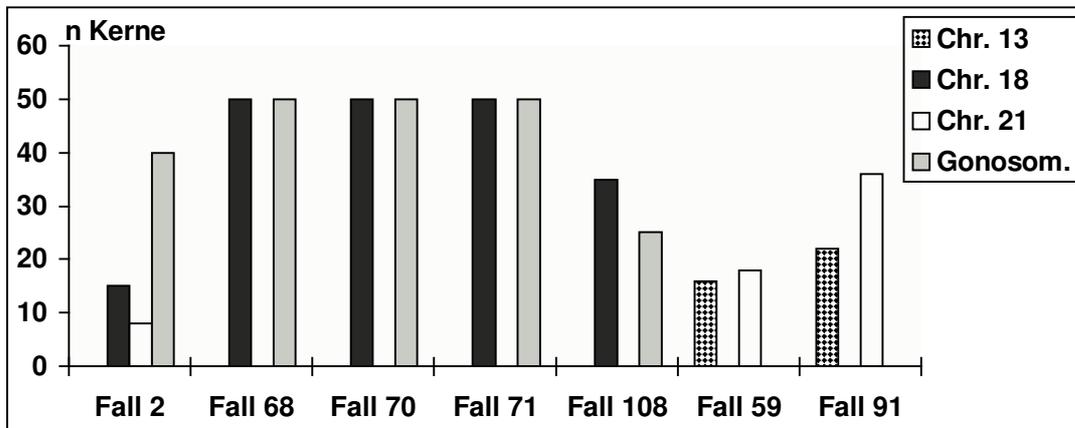


Abb.49 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der auswertbaren Kerne

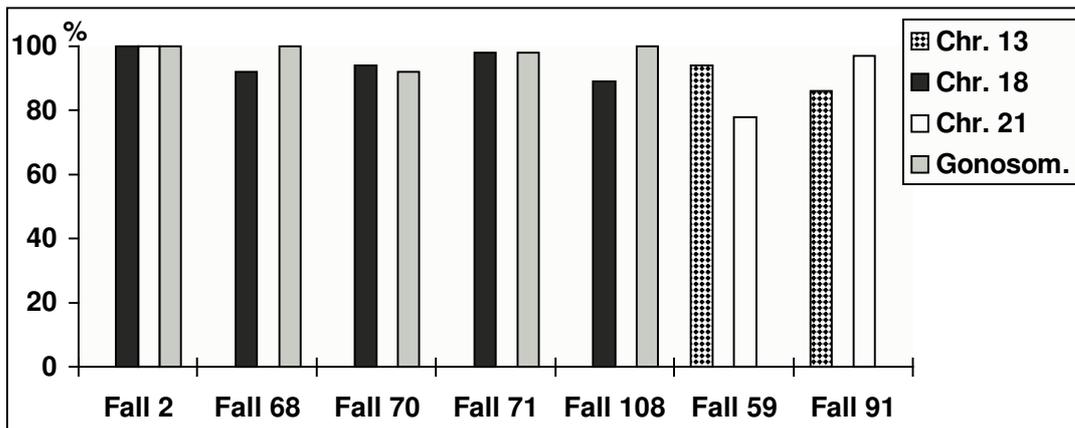


Abb.50 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden: Prozentsatz der 2-signaligen Kerne für die Autosomen und der XX bzw. XY-signaligen Kerne für die Gonosomen

In weiteren 4 Fällen (Nr. 38,43,60 und 114; Tab.28, Abb.51) mit Versagen der Hybridisierung für eine oder mehrere Sonden waren für die nichtbetroffenen Sonden nur sehr wenige Kerne analysierbar. In Fall 38 und Fall 43 waren für Chromosom 21 keine signalgebenden Nuclei vorhanden, für Chromosom 13 waren es 2 bzw. 1, für die Chromosomen 18 3 bzw.

8 und für die Gonosomen 3 bzw. 17 jeweils euploidsignalige Kerne. In Fall 60 waren einzig für das X-Chromosom 8 Kerne auszuzählen, die alle die Konstellation XX zeigten. In Fall 114 waren lediglich für Chromosom 21 3 2signalige, Kerne zu sehen.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation	Keine Signale für Chromosom
Fall 38	28+0	20 ml	klar	Fetale Retardierung, pathologischer Doppler	21
Fall 43	15+4	?	leicht blutig	Altersrisiko	21
Fall 60	25+4	20 ml	klar	fetaler Hydrothorax	13,18,21
Fall 114	16+0	16 ml	klar	schmales Nackenödem	13,18,X,Y

Tab.28 4 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere der restlichen Sonden

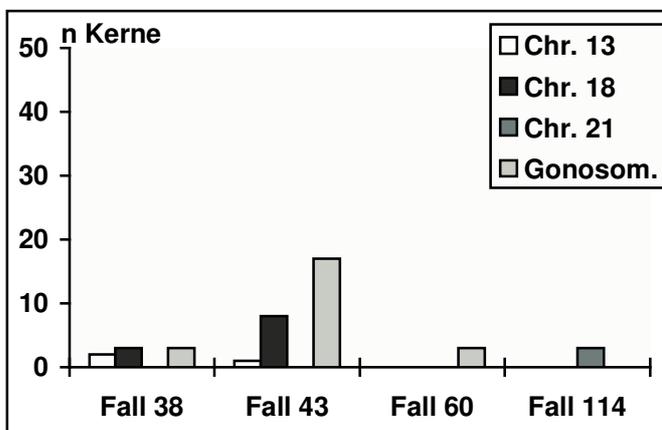


Abb.51 4 Fälle mit fehlenden Signalen für einen oder mehrere Kerne: Anzahl der auswertbaren Kerne

In 7 Fällen (Nr. 6,7,10,11,34,66,84) mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden traten zudem für einige der analysierbaren Chromosomen mehr als 10% aneuploide Kerne auf (Tab.29, Abb.52 und 53). In Fall 10 waren für Chromosom 18 keine signalgebenden Kerne vorhanden, für Chromosom 13 zeigten 2 Kerne (12%) 1 Signal, 11 Kerne (65%) 2 Kerne und 4 Kerne (23%) 3 Signale. Für Chromosom 21 zeigten 1 Kern (4%) 1 Signal, 19 Kerne (79%) 2 Signale und 4 Kerne (17%) 3 Signale. Für die Gonosomen zeigten 50 Kerne (93%) die Konstellation XY und 4 Kerne (7%) 2 X-Signale. In Fall 11 waren für Chromosom 13 keine Signale zu sehen, für Chromosom 18 5 Kerne (100%) mit 2 Signalen und für die Gonosomen 11 Kerne (100%) mit XY-Signalgebung. Für Chromosom 21 waren neben 9 Kernen (64%) mit 2 Signalen jeweils 1 Kern (7%) mit 1 bzw. 4 Signalen vorhanden, sowie 3 Kerne (22%) mit 3 Signalen.

In den Fällen 6,7,34,66 und 84 waren jeweils für die Autosomen 13 und 21 keine Signale zu sehen. In Fall 6 ergab die Analyse von Chromosom 18 neben 11 diploiden Kernen (73%) 1 Kern (7%) mit 1 Signal und 3 Kerne (20%) mit 3 Signalen. Für die Gonosomen zeigten 22 Kerne (96%) das Signalmuster XY und 1 Kern (4%) XYY-Konstellation. In Fall 66 ergab die Hybridisierung für Chromosom 18 in 30 Kernen (85%) 2 Signale, in 3 Kernen (9%) 1 Signal und in 2 Kernen (6%) 3 Signale. Das Signalmuster für die Gonosomen war auffällig inkonsistent: Es waren 18 XY-Kerne (64%), 6 X0-Kerne (21%), 3 XX-Kerne (11%) und 1 XXY-Kern (4%) vorhanden. In Fall 84 waren alle für Chromosom 18 ausgewerteten 20 Kerne diploid, für die Gonosomen wiesen 16 Kerne (70%) das Signalmuster XY, 4 Kerne (17%) das Muster XXY und 3 Kerne (13%) das Muster XX auf. In Fall 7 waren 94 ausgewertete Kerne (84%) für Chromosom 18 2signalig, 6 Kerne (5%) 1signalig, 1 Kern (1%) 3signalig und 10 Kerne (9%) 4signalig, sowie 1 Kern (1%) 6signalig. Die Gonosomen zeigten in diesem Fall ebenfalls ein heterogenes Signalmuster mit 130 XX-signaligen Kernen (89%), 9 XXXX-signaligen Kernen (6%), 4 XO-signaligen Kernen (3%), und jeweils einem XXX- bzw. XXXXXX-Kern (1%). In Fall 34 zeigten für Chromosom 18 29 Kerne (59%) 2 Signale, 2 Kerne (4%) 3 Signale 17 Kerne (35%) 4 Signale und 1 Kern (2%) 5 Signale. Für die Gonosomen wiesen 28 Kerne (56%) 2 X-Signale, 1 Kern (2%) 3 X-Signale, 20 Kerne (40%) 4 X-Signale und 1 Kern 5 X-Signale auf.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation	Keine Signale für Chromosom
Fall 10	13+4	13 ml	stark blutig	Altersrisiko	18
Fall 11	16+1	17 ml	klar	Altersrisiko	13
Fall 6	15+6	16 ml	klar	Altersrisiko	13, 21
Fall 66	19+1	20 ml	klar	Z.n. Nackenödem	13, 21
Fall 84	21+4	15 ml	leicht blutig	Plexus chorioideus –Zyste, Patientenwunsch	13, 21
Fall 7	14+2	6 ml	blutig	Altersrisiko	13,21
Fall 34	18	20 ml	?	Altersrisiko	13, 21

	Mindestens 10% aneuploide Kerne für Chromosom:	Bemerkungen, Interpretation
Fall 10	13, 21	Möglichkeit einer geringfügigen triploiden Zellpopulation, kein Wachstum in der Zellkultur, deshalb keine Karyotypisierung möglich
Fall 11	21	-
Fall 6	18	-
Fall 66	XY	Suboptimales Präparat
Fall 84	XY	Maternale Zellkontamination, Evt. geringfügige Klinefelter- o. triploide Zellpopulation

Fall 7	18, XY	V.a. maternale Zellkontamination, Wachstumsverhalten u. Zellmorphologie atypisch
Fall 34	18, XY	Hoher Anteil an tetraploiden Zellen, bei unzureichendem Zellwachstum kein Karyotypisierung möglich

Tab.29 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrere der übrigen Sonden

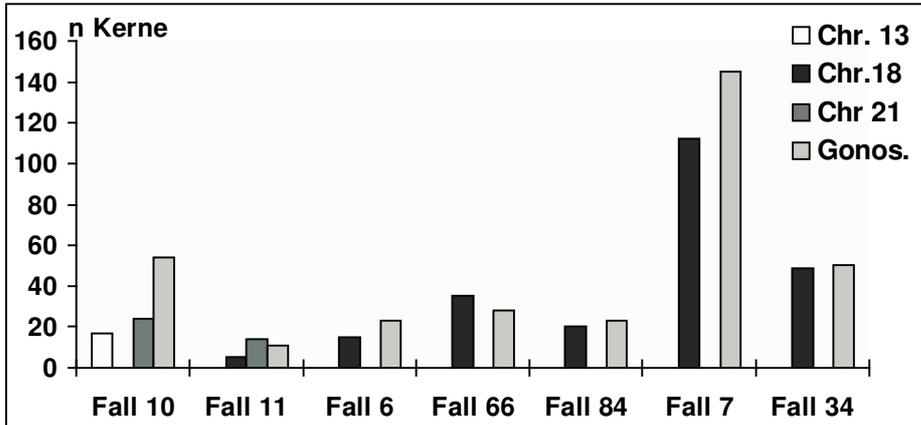


Abb.52 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrere der übrigen Sonden: Anzahl der analysierten Kerne je Sonde

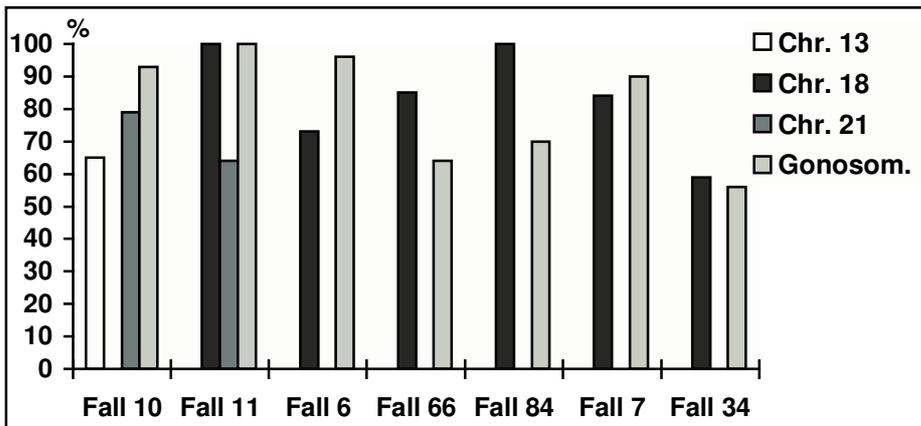


Abb.53 7 Fälle mit fehlenden Signalen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrere der übrigen Sonden: Prozentsatz der diploid signaligen Kerne für Autosomen und Gonosomen

### 3.4.1.3. Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall

In 21 Fällen (Nr. 4,41,61,64,74,76,78,83,86,87,88,93,95,98,100,101,103,105,112,123,124) mit letztendlich unauffälligem Karyotyp zeigten 10 oder mehr Prozent der Kerne für eine oder mehrere Sonden ein aneuploides Signalmuster. Aneuploid bedeutet für die Autosomen 3signalige Kerne, für die Gonosomen nicht XY- bzw. XX-Konstellation

aufweisende Kerne. Diese Fälle entsprechen 20% der Fälle mit unauffälligem Karyotyp und 16% aller Fälle. Die einzelnen Sonden waren dabei unterschiedlich häufig betroffen (Abb.54): nämlich die Gonosomen 9mal, Chromosom 21 7mal und Chromosom 18 und Chromosom 13 jeweils 6mal. In 15 Fällen waren mindestens 10 - 49 Kerne pro Sonde auswertbar, in 6 Fällen für eine oder mehrere Sonden jedoch nur weniger als 10 Kerne.

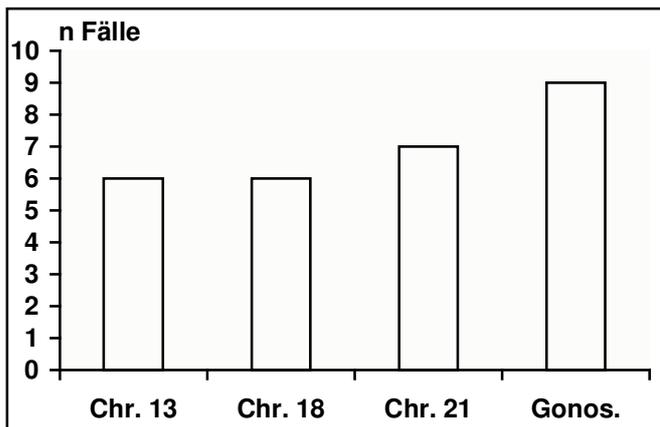


Abb.54 21 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der betroffenen Fälle für die einzelnen Chromosomen

#### 3.4.1.3.1. Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall und mindestens 10-49 auswertbaren Kerne pro Sonde

In den 15 Fällen (Nr. 61,64,74,76,78,83,87,93,95,98,103,105,112,123,124; Tab.30, Abb.55 und 56) mit mindestens 10 bis 49 analysierbaren Kernen je Sonde zeigten sich für Chromosom 13 und 18 4mal, für Chromosom 21 5mal und für die Gonosomen 6mal mindestens 10% aneuploide Kerne. Im Durchschnitt aller dieser Fälle waren für Chromosom 13 22 Kerne analysierbar, von denen im Mittel 2 Kerne (12%) 1 Signal, 19 Kerne (82%) 2 Signale und 1 Kern (6%) 3 Signale aufwiesen. Für Chromosom 18 konnten durchschnittlich 37 Kerne ausgezählt werden. Im Mittel zeigten dabei 3 Kerne (9%) 1 Signal, 32 Kerne (86%) 2 Signale und 2 Kerne (5%) 3 Signale. Für Chromosom 21 waren im Mittel 26 Kerne auswertbar, dabei waren in durchschnittlich 1 Kern (5%) 1 Signal, in 24 Kernen (89%) 2 Signale und in 1 Kern (6%) 3 Signale zu sehen. Für die Gonosomen waren im Durchschnitt 39 Kerne zu analysieren, die in 37 Kernen (93%) die Konstellation XX oder XY hatten, und in 3 Kernen (7%) unterschiedliche abweichende Signalmuster.

	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Chr.13	22	19	82	2	12	1	6
Chr.18	37	32	86	3	9	2	5
Chr.21	26	24	89	1	5	1	6
Alle Autosomen	28	25	86	2	9	1	6

Tab.30 15 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrerer Sonden je Fall und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittliche Anzahl an auswertbaren Kernen und Signalverteilung für die Autosomen

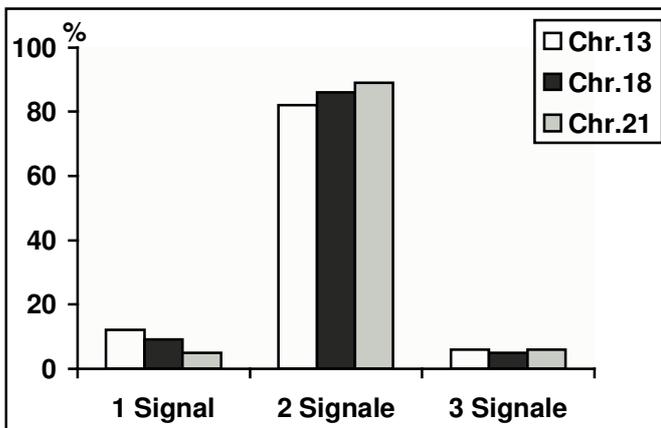


Abb.55 15 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrerer Sonden je Fall und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittlicher Prozentsatz an 1-, 2-, und 3-signaligen Kernen für die Autosomen

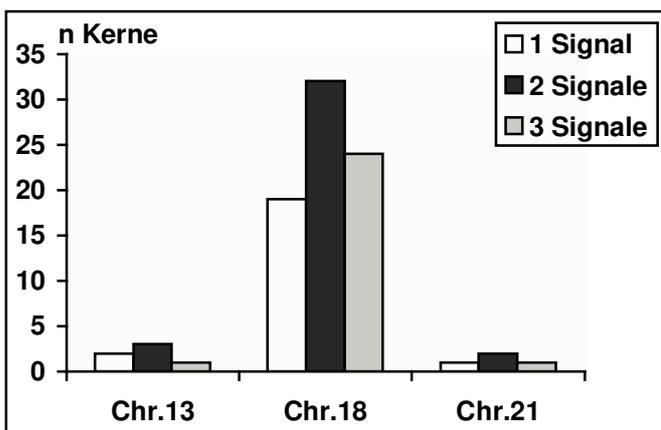


Abb.56 15 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für eine oder mehrere Sonden je Fall und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Durchschnittliche Anzahl der auswertbaren Kerne für die autosomalen Sonden

In 4 Fällen (Nr. 83,95,112,123) waren für Chromosom 13  $\geq 10\%$  3-signalige, d.h. aneuploide Kerne vorhanden (Tab.31 und 32, Abb.57 und 58). In den Fällen 83 und 112 zeigten weitere Sonden ebenfalls in mehr als 10% der Kerne ein aneuploides Signalmuster. Die Entnahme von 15 - 21 ml klaren Fruchtwassers erfolgte zwischen der 14. und 21. Schwangerschaftswoche. Indikation waren sonographische Auffälligkeiten des Feten bzw. ein erhöhtes Altersrisiko (Fall 95).

In Fall 95 waren für Chromosom 13 15 Kerne auswertbar, von denen 13 Kerne (87%) 2 Signale zeigten und 2 Kerne (13%) 3 Signale. Für die anderen Sonden (18, 21, XY) konnten 16 bis 39 Kerne beurteilt werden, von denen 14 bis 39 (88-100%) eine euploide Signalkonstellation aufwiesen. Die Signale für die Autosomen 13 und 21 waren sehr schwach. Die 3-signaligen Kerne für Chromosom 13 wurden als Kreuzhybridisierung und damit nicht als Hinweis auf eine Aneuploidie gewertet. In Fall 123 waren für Chromosom 13 10 Kerne auszählbar, davon zeigten 9 Kerne (90%) 2 Signale und 1 Kern (10%) 3 Signale. Für die anderen hybridisierten Sonden waren 48 Kerne (Chromosomen 18 und Gonosomen) bzw. 11 Kerne (Chromosom 21) analysierbar, die zu 100% ein diploides bzw. XX-Signalmuster aufwiesen. Die Aussagekraft bezüglich der Chromosomen 13 und 21 wurde aufgrund der unzureichenden Zahl der beurteilbaren Kerne als begrenzt eingeschätzt. In Fall 112 waren für Chromosom 13 39 Kerne auswertbar. Dabei waren in 25 Kernen (64%) 2 Signale sichtbar, in 8 Kernen (21%) 1 Signal und in 6 Kernen (15%) 3 Signale. Für die Chromosomen 18 und 21 waren 23 bzw. 49 Kerne analysierbar, die in 73% bzw. 94% 2signalig waren. In den restlichen Kernen war jeweils nur 1 Signal zu sehen. Für die Gonosomen waren mehr als 10% der Kerne aneuploid (siehe entsprechender Abschnitt). Die 3signaligen Kerne für Chromosom 13 wurden als Kreuzhybridisierung interpretiert und gaben damit keinen definitiven Hinweis auf eine Trisomie. In Fall 83 waren für Chromosom 13 16 Kerne beurteilbar. Davon waren in 12 Kernen 2 Signale (75%) und in jeweils 2 Kernen (jeweils 12,5%) 1 bzw. 3 Signale vorhanden. Für die restlichen hybridisierten Sonden waren 11- 51 Kerne auswertbar. Dabei waren nur für Chromosom 18 weniger als 10%, nämlich 8% aneuploide Kerne zu sehen, für Chromosom 21 und die Gonosomen jedoch mehr als 10% (siehe entsprechende Abschnitte). Trotz überwiegender Disomie für die untersuchten Chromosomen konnte wegen des relativ uniformen Auftretens von Kernen mit jeweils 3 Signalen eine geringfügige triploide Zellpopulation nicht definitiv ausgeschlossen werden.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 95	16	15 ml	klar	Altersrisiko
Fall 123	21+2	21 ml	klar	Retardierter Drilling III, Hydrozephalus
Fall 112	14+0	15 ml	klar	Grenzwertige Nackenfalte Geminus II
Fall 83	19+2	18 ml	klar	V.a. symmetr. Retard., Oligohydramnion, Terminunklarheit

	Mehr als 10% aneuploide Kerne für Chromosom.	Bemerkungen, Interpretation
Fall 95	13	Signale 13, 21 schwach, Kreuzhybridisierung
Fall 123	13	Unzureichende Anzahl d. Kerne für 13/21: begrenzte Aussage
Fall 112	13, XY	Kreuzhybridisierung
Fall 83	13, 21, XY	Signale 13/21 schwach, X-Signal oft gespalten; Evt. geringfügige triploide Zellpopulation

Tab.31 4 Fälle mit mindestens 10–49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 13

Chromosom 13	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 95	15	13	87	0	0	2	13
Fall 123	10	9	90	0	0	1	10
Fall 112	39	25	64	8	21	6	15
Fall 83	16	12	75	2	12,5	2	12,5

Tab.32 4 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 13 und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Anzahl der auswertbaren Kerne und Signalverteilung

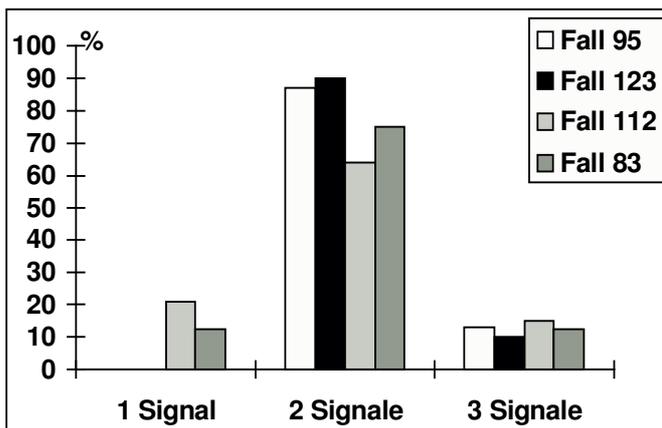


Abb.57 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 13: Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 13

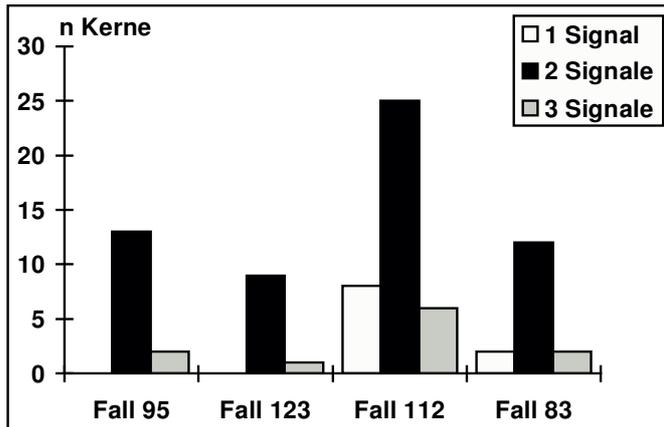


Abb.58 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 13:  
Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 13

In 4 Fällen (Nr. 87,98,105 und 124) waren für Chromosom 18 10 oder mehr Prozent der Kerne 3signalig, d.h. aneuploid (Tab.33 und 34, Abb.59 und 60). Die Amniozentese erfolgte zwischen der 14. und 30. Schwangerschaftswoche. Es wurden in Fall 98 19 ml dunkelbraunen Fruchtwassers und in Fall 124 15 ml klaren Fruchtwassers entnommen. In den Fällen 87 und 105 ist das Volumen des jeweils klaren Aspirates unbekannt. Die Indikation zur Fruchtwasserpunktion waren in allen vier Fällen sonographische Auffälligkeiten.

In Fall 87 zeigten von 50 für Chromosom 18 analysierbaren Kerne 45 Kerne (90%) 2 Signale und 5 Kerne (10%) 3 Signale. Für die übrigen untersuchten Sonden waren 42 – 50 Kerne beurteilbar, die in 94 - 98% ein euploides Signalmuster aufwiesen. 5 - 6 % der Kerne waren für die Autosomen jedoch ebenfalls 3signalig, für die Gonosomen zeigten 2% der Kerne ein abweichendes Signalmuster. Aufgrund dieser Rate an Zellen mit aneuploidem Signalmuster konnte eine Mosaikkonstellation nicht definitiv ausgeschlossen werden. In Fall 98 waren für Chromosom 18 41 Kerne analysierbar, wovon 37 Kerne (90%) 2 Signale aufwiesen und 4 Kerne (10%) 3 Signale. Die restlichen Hybridisierungen ergaben in 87 - 100% der 15 bis 40 beurteilbaren Kerne 2 Signale für die Autosomen bzw. die Konstellation XY. Eine Subpopulation an Zellen mit Trisomie 18 konnte somit nicht ausgeschlossen werden, jedoch wurden die 3-signaligen Kerne als erfahrungsgemäß eher präparationsbedingt eingeschätzt.

In Fall 124 lagen für Chromosom 18 21 analysierbare Kerne vor. 16 Kerne (76%) waren diploid, 2 Kerne (10%) triploid und 3 Kerne (14%) waren 1signalig für dieses Chromosom. Für die anderen Autosomen waren 28 bzw. 32 Kerne beurteilbar, die in weniger als

10% triploid waren (4 bzw. 0%). Die 16 für die Gonosomen ausgezählten Kerne zeigten alle die Konstellation XY. Die 3-signaligen Kerne für Chromosom 18 wurden aufgrund ihres, nicht näher beschriebenen Hybridisierungsverhaltens, nicht definitiv als trisom interpretiert. In Fall 105 waren 28 auswertbare Kerne für Chromosom 18 vorhanden, davon waren 21 Kerne (75%) 2-signalig, 3 Kerne (11%) 3-signalig und 4 Kerne (14%) 1-signalig. Für Chromosom 21 lag der Anteil der aneuploiden Kerne ebenfalls über 10% (siehe entsprechender Abschnitt), Für Chromosom 13 lagen keine triploiden Zellen, für die Gonosomen nur XX-signalige Zellen vor. Die Kerne mit 3 Signalen für Chromosom 18 wurden wegen der diffusen Struktur der Signale nicht definitiv als trisom eingeschätzt.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 87	30+4	?	klar	Symmetrische fetale Retardierung
Fall 98	24+0	19 ml	dunkelbraun	Schwere symmetrische Retardierung
Fall 124	14+3	15 ml	klar	Nackenfalte 2,4 mm; Verunsicherung d. Patientin
Fall 105	20+6	?	klar	Massiver Hydrops fetalis

	Mindestens 10% aneuploide Kerne für Chromosom:	Bemerkungen, Interpretation
Fall 87	18	Mosaikkonstellation kann nicht ausgeschlossen werden
Fall 98	18	Evt. Subpopulation von Zellen mit Trisomie 18, erfahrungsgemäß sind die 3-signaligen Kerne für Chromosom 18 jedoch eher präparationsbedingt
Fall 124	18	3-signalige Kerne für Chr. 18 können aufgrund des Hybridisierungsverhaltens nicht definitiv als trisom interpretiert werden
Fall 105	18, 21	3-signalige Kerne für Chr. 18 können wegen diffuser Struktur nicht definitiv als trisom interpretiert werden

Tab.33 4 Fälle mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 18

Chromosom 18	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 87	50	45	90	0	0	5	10
Fall 98	39	37	90	0	0	4	10
Fall 124	21	16	76	3	14	2	10
Fall 105	28	21	75	4	14	3	11

Tab.34 4 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 18 und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde

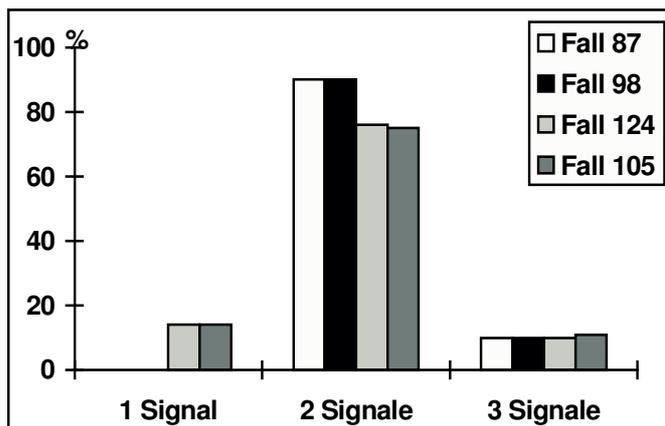


Abb.59 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 18: Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

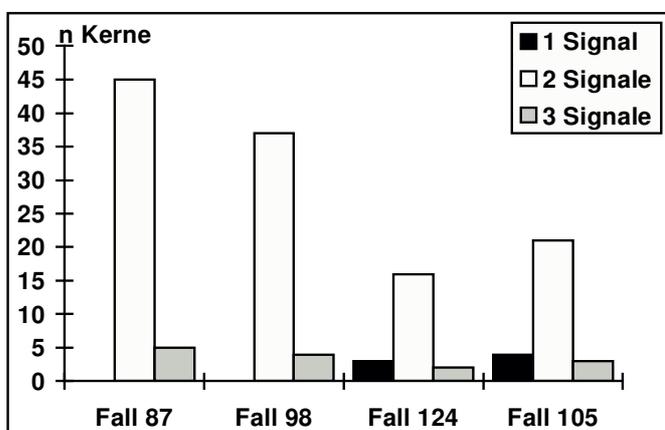


Abb.60 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 18: Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

In 5 Fällen (Nr. 76,78,103,105 und 83) lag für Chromosom 21 der Anteil an aneuploiden, d.h. 3signaligen Kernen bei 10% oder darüber (Tab.35 und 36, Abb.61 und 62). Die Fruchtwasserentnahme fand hierbei zwischen der 19. und 28. Schwangerschaftswoche statt. Für Fall 105 ist die Menge des entnommenen Fruchtwassers unbekannt, in den übrigen Fällen waren es 18 bis 22 ml. Der Aspekt des Aspirates war in Fall 76 als trübe, in Fall 103 als leicht blutig, in den restlichen Fällen als klar beurteilt worden. Die Indikation zur Fruchtwasseruntersuchung war in Fall 103 ein erhöhtes Altersrisiko, in den anderen Fällen waren es jeweils sonographische Auffälligkeiten (in Fall 78 in Kombination mit einem erniedrigten Serumwert für AFP bei der Mutter).

In Fall 76 waren für Chromosom 21 28 Kerne auswertbar, wovon 24 Kerne (86%) 2 Signale zeigten, 1 Kern (3%) 1 Signal und 3 Kerne (11%) 3 Signale. Für die Chromosomen 13, 18 und XY lag der Anteil an aneuploiden Kernen bei 0 – 4 %. Dies

wurde als möglicher Hinweis auf eine geringfügige triploide Zellpopulation gewertet. In Fall 78 wiesen von insgesamt 25 auswertbaren Kernen 19 Kerne (76%) 2 Signale auf, 3 Kerne (12%) 1 Signal und ebenfalls 3 Kerne (12%) 3 Signale. Bei den übrigen hybridisierten Sonden ergab sich für 3 bis 7% der Kerne ein aneuploides Signalmuster. Die Signale für die Sonden 13 und 21 waren dabei schwach, diejenigen für Sonde 18 zum Teil diffus. Die 3-signaligen Kerne wurden als möglicher Hinweis auf eine geringfügige triploide Zellpopulation interpretiert. In Fall 103 waren für Chromosom 21 16 Kerne beurteilbar. In 12 Kernen (75%) waren 2 Signale vorhanden, in 1 Kern (6%) 1 Signal und in 3 Kernen (19%) 3 Signale. Für die restlichen Sonden wurde in 4 bis 8% der analysierbaren Kerne eine aneuploide Signalkonstellation gesehen. Die 3-signaligen Kerne wurden als Kreuzhybridisierung ohne pathologische Bedeutung interpretiert. In Fall 105 waren 17 von 20 auswertbaren Kernen (85%) 2-signalig für Chromosom 21 und 3 Kerne (15%) 3-signalig. Für Chromosom 18 lag der Anteil an trisomen Kernen ebenfalls über 10%, wie in dem entsprechenden Abschnitt erläutert. Für die Chromosom 13 und XY waren keine Zellen mit aneuploidem Signalmuster zu sehen. Die 3-signaligen Kerne für Chromosom 21 wurden wegen Kreuzhybridisierung, bei zudem schwacher Signalintensität für die Chromosomen 13 und 21, nicht definitiv als trisom interpretiert. In Fall 83 waren in 8 (73%) von 11 beurteilbaren Kernen 2 Signale sichtbar, in 1 Kern (9%) 1 Signal und in 2 Kernen (18%) 3 Signale. Für die Chromosomen 13 und XY wiesen ebenfalls mehr als 10 Prozent der Kerne ein aneuploides Signalmuster auf (siehe entsprechende Abschnitte). Für Chromosom 18 waren in 8% der Kerne 3 Signale vorhanden. Das uniforme Auftreten von Kernen mit jeweils 3 Signalen wurde als möglicher Hinweis auf eine geringfügige triploide Zellpopulation eingeschätzt.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 76	28+3	22 ml	trübe	Dezent dilatierte NBKS, symmetrische Retardierung
Fall 78	21+1	20 ml	klar	Milde Pyelektasie, Plexuschorioideus-Zyste, AFP-Wert im Serum niedrig
Fall 103	21+1	19 ml	leicht blutig	Altersrisiko
Fall 105	20+6	?	klar	Massiver Hydrops fetalis
Fall 83	19+2	18 ml	klar	V.a. symmetrische Retardierung, Oligohydramnion, Terminunklarheit

	Mindestens 10% aneuploide Kerne für Chromosom:	Bemerkungen, Interpretation
Fall 76	21	Möglicher Hinweis auf geringfügige triploide Zellpopulation
Fall 78	21	Signale von Probe 13/21 schwach; möglicher Hinweis auf geringfügige triploide Zellpopulation
Fall 103	21	Kreuzhybridisierung ohne pathologische Bedeutung
Fall 105	18, 21	Signale von Probe 13/21 sehr schwach; 3-signalige Kerne für Chromosom 21 wegen Kreuzhybridisierung nicht definitiv als trisomie interpretiert
Fall 83	13, 21, XY	Signale von Probe 13/21 sehr schwach; möglicher Hinweis auf geringfügige triploide Zellpopulation

Tab.35 5 Fälle mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 21

Chromosom 18	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 76	28	24	86	1	3	3	11
Fall 78	25	19	76	3	12	3	12
Fall 103	16	12	75	1	6	3	19
Fall 105	20	17	85	0	0	3	15
Fall 83	11	8	73	1	9	2	18

Tab.36 5 Fälle mit mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 21 und mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde: Anzahl der auswertbaren Kerne und Signalverteilung

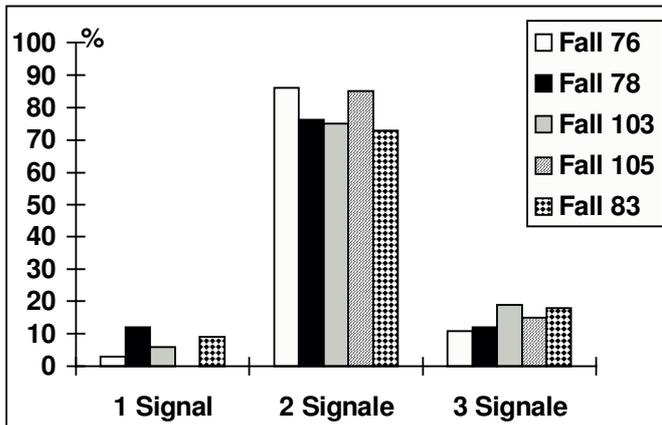


Abb.61 5 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 21: Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 21

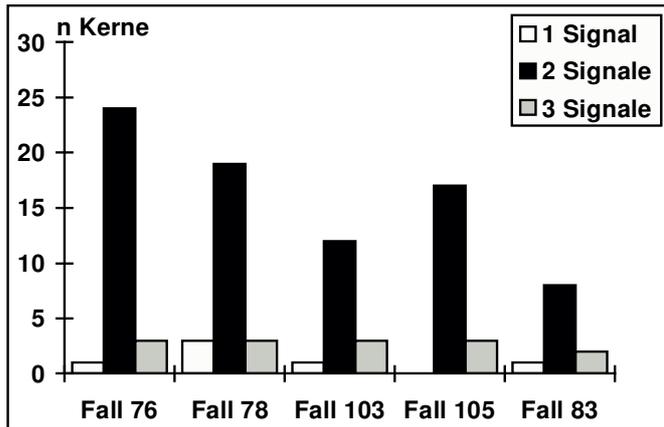


Abb.62 5 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 21:  
Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 21

Für die Gonosomen war in 6 Fällen (Nr. 61,64,74,83,93,112) in mindestens 10% der Kerne ein von den Gonosomenkonstellationen XX oder XY abweichendes Signalmuster vorhanden (Tab.37-39, Abb.63-66). Die Amniozentese wurde in diesen Fällen zwischen der 14. und der 32. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Es wurden 14 bis 20 ml Fruchtwasser entnommen, für Fall 93 ist das Volumen unbekannt. In den Fällen 74, 83 und 112 wurde das Aussehen des Aspirates als klar, in den Fällen 64 und 83 als leicht blutig und in Fall 61 als blutig beurteilt. In Fall 74 bestand die Indikation zur Amniozentese aufgrund eines pathologischen Triple-Testes, in den übrigen Fällen aufgrund sonographischer Auffälligkeiten des Feten.

In Fall 83 waren neben 42 Kernen (86%) mit Gonosomenkonstellation XX 7 Kerne (14%) mit dem Signalmuster XXX vorhanden. Dieser Fall wurde für die Autosomen bereits in den vorangehenden Abschnitten besprochen. Für die X-Signale war auffällig, daß eines von beiden Signalen oft gespalten, oder ein drittes sehr schwaches Signal vorhanden war. Letztendlich wurde das uniforme Auftreten von 3-signaligen Kernen als möglicher Hinweis auf eine geringfügige triploide Zellpopulation gewertet. In Fall 112 zeigten von 43 für die Geschlechtschromosomen auswertbaren Kernen 38 Kerne (88%) eine weibliche Gonosomenkonstellation, 5 Kerne (12%) wiesen jedoch nur ein X-Signal auf. Das für Chromosom 13 ebenfalls auffällige FISH-Ergebnis ist im entsprechenden Abschnitt wiedergegeben. Zur Interpretation des FISH-Befundes für die Gonosomen wurden keine näheren Angaben gemacht. In Fall 93 konnten für die Gonosomen 30 Kerne analysiert werden. Dabei waren in 27 Kernen (90%) jeweils ein Signal für die Chromosomen X und Y vorhanden, in 3 Kernen (10%) jedoch stattdessen 2 X-Signale. Für die Autosomen

waren keine 3-signaligen Kerne sichtbar. Bei der Auswertung fielen sehr schwache Signale für die Chromosomen Y und 18 auf, sowie eine relativ geringe Anzahl an beurteilbaren Kernen bei insgesamt ausreichender Materialmenge. Die Kerne mit 2 Signalen für das X-Chromosom wurden bei leicht blutig tingiertem Fruchtwasser als möglicher Hinweis auf maternale Zellkontamination gewertet. In Fall 61 waren 50 Zellen für die gonosomalen Sonden beurteilbar. Davon zeigten 40 Kerne (80%) die Gonosomenkonstellation XY. Abweichend davon waren in 6 Kernen (12%) 2 X-Signale und in 4 Kernen (8%) ein X- und 2 Y-Signale zu sehen. Für die Autosomen betrug der Anteil an 3-signaligen Kernen 0–4%. Die Kerne mit weiblichem Geschlechtschromosomensatz wurden als möglicher Hinweis für eine maternale Zellkontamination bei blutigem Fruchtwasser eingeschätzt. Das Vorhandensein höherploider (z.B. Tetraploidie) Kerne wurde für wahrscheinlich gehalten. In Fall 64 konnten für die Geschlechtschromosomen 36 Zellen ausgewertet werden. 30 Kerne (83%) wiesen die männliche Gonosomenkonstellation XY auf, 4 Kerne (11%) jeweils nur ein X-Signal und 2 Kerne (6%) 2 X-Signale. Für die Autosomen waren keine 3-signaligen Kerne sichtbar. Bei der Auswertung fiel auf, daß nur wenige Zellen bei relativ zellarmem Fruchtwasser hybridisiert hatten. Die Signale für die Sonden 13/21 und 18 waren schwach ausgeprägt bzw. diffus. Die Kerne mit nur einem Signal für das X-Chromosom wurden als potentielle Monosomie X-Zellen eingestuft. Für die beiden Zellen mit zwei X-Signalen wurde, bei leicht blutig tingiertem Fruchtwasser ein mütterlicher Ursprung angenommen. In Fall 74 waren für die Chromosomen XY 30 Kerne analysierbar. 23 Kerne (77%) zeigten das Signalmuster XY. In 4 Kernen (13%) waren 2 X- und 2 Y-Signale vorhanden, in 2 Kernen (7%) jeweils nur ein X-Signal und in 1 Kern (3%) 2 X-Signale. Für die Autosomen waren 0 - 7% der Kerne 3-signalig, d.h. aneuploid. Über die Interpretation des FISH-Befundes ist nichts bekannt.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 83	19+2	18 ml	klar	V.a. symmetrische Retardierung, Oligohydramnion, Terminunklarheit
Fall 112	14+0	15 ml	klar	Grenzwertige Nackenfalte Geminus II
Fall 93	32+0	?	leicht blutig	Symmetrische Retardierung, fliehendes Kinn
Fall 61	26+6	19 ml	blutig	Diskordantes Gemini-Wachstum
Fall 64	20+2	20 ml	leicht blutig	V.a. Transposition der großen Arterien DD Truncus arteriosus communis
Fall 74	15+5	14 ml	klar	Pathologischer Triple-Test (1:325)

	Mindestens 10% aneuploide Kerne für Chromosom:	Bemerkungen, Interpretation
Fall 83	XY, 13, 21	13/ 21 Signale sehr schwach, X-Signale oft gespalten oder sehr schwaches drittes Signal vorhanden; möglicher Hinweis auf geringfügige triploide Zellpopulation
Fall 112	XY, 13	Keine Bemerkung zur Gonosomenkonstellation
Fall 93	XY	Signale für Chrom. 18, Y sehr schwach, wenige Kerne analysierbar bei ausreichender Materialmenge; möglicher Hinweis auf maternale Zellkontamination bei leicht blutig tingiertem Fruchtwasser
Fall 61	XY	Möglicher Hinweis auf maternale Zell-Kontamination, Vorhandensein höherploider Zellen (z.B. Tetraploidie) wahrscheinlich
Fall 64	XY	Relativ zellarmes Fruchtwasser, wenige Zellen haben hybridisiert; Signale 13/21 schwach, Signale 18 diffus; XO-Zellen als potentielle Monosomie X-Zellen gewertet, XX-Zellen wahrscheinlich maternalen Ursprungs bei leicht blutig tingiertem Fruchtwasser
Fall 74	XY	Nicht bekannt

Tab.37 6 Fälle mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% aneuploiden Kernen für die Gonosomen

	Fall 83		Fall 112	
	n	%	n	%
XX	42	86	38	88
XO	0	0	5	12
XXX	7	14	0	0

Tab.38 2 Fälle mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% Kernen mit XXX-Signalmuster bei weiblichem Karyotyp

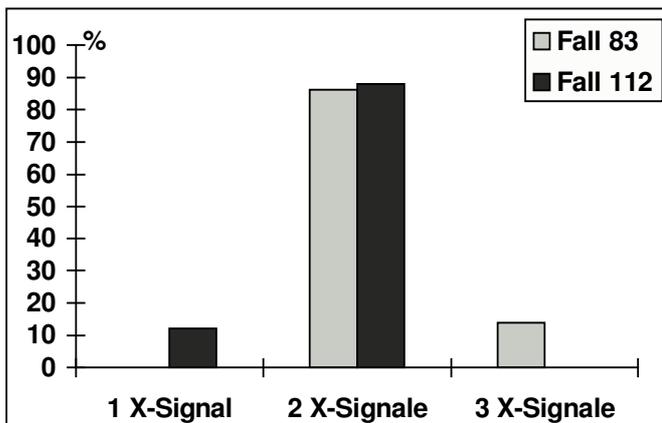


Abb.63 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und weiblichem Karyotyp: Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 X-Signalen

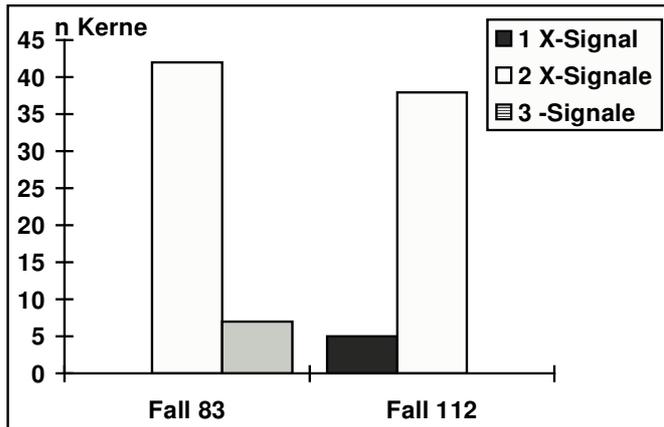


Abb.64 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und weiblichem Karyotyp: Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 X-Signalen

Kerne:	Fall 93		Fall 61		Fall 64		Fall 74	
	n	%	n	%	n	%	n	%
XY	27	90	40	80	30	83	23	77
XX	3	10	6	12	2	6	1	3
X0	0	0	0	0	4	11	2	7
XYY	0	0	4	8	0	0	0	0
XXYY	0	0	0	0	0	0	4	13

Tab.39 4 Fälle mit mindestens 10-49 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% Kernen mit abweichendem Signalmuster bei männlichem Karyotyp

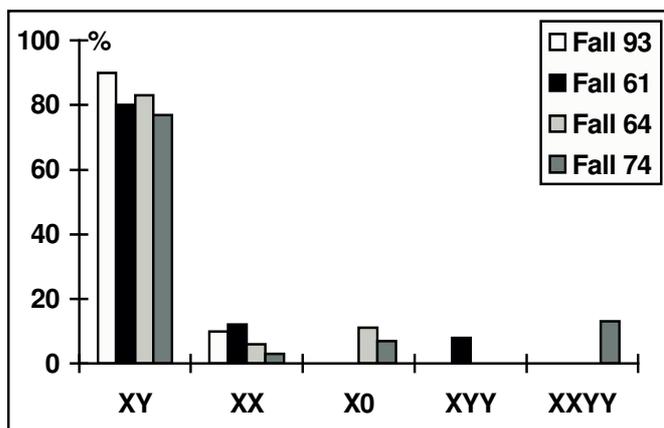


Abb.65 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und männlichem Karyotyp: Prozentsatz der Kerne mit XY- und abweichendem Signalmuster

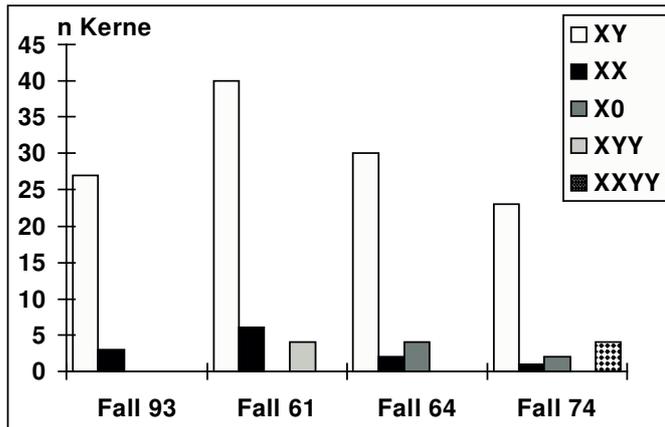


Abb.66 4 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und männlichem Karyotyp: Anzahl der Kerne mit XY- und abweichendem Signalmuster

### 3.4.1.3.2. Kontrollbedürftige FISH-Befunde: $\geq 10\%$ aneuploide Kerne für eine oder mehrere Sonden je Fall und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden

In 6 Fällen (Nr. 4,41,86,88,100,101) mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für eine oder mehrere Sonden waren ebenfalls für eine oder mehrere Sonden nur weniger als 10 Kerne auswertbar (siehe Tab.40, Abb.67). Mindestens 10% aneuploide Kerne waren für Chromosom 13, 18 und 21 je 2 mal und für die Gonosomen 3 mal auszählbar. Die Amniozentese wurde in diesen Fällen zwischen der 15. und 20. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Es wurden dabei 15 bis 20 ml Fruchtwasser entnommen. Für Fall 4 sind Volumen und Aspekt des Aspirates unbekannt. In den Fällen 86 und 101 war die Probe jeweils leicht blutig gefärbt, in Fall 88 etwas gelblich und in den übrigen Fällen klar. Die Indikation zur Chromosomenuntersuchung war in den Fällen 4, 101 und 88 aufgrund eines erhöhten Altersrisikos der Mutter gegeben. In Fall 100 zeigte der Triple-Test ein pathologisches Ergebnis. In Fall 41 war der Fet sonographisch auffällig.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 41	20+5	20 ml	klar	Milde Pyelektasie und massive Magenfüllung
Fall 100	17+6	18 ml	klar	Pathologischer Triple-Test
Fall 88	15+1	16 ml	gelblich	Altersrisiko (41 Jahre)
Fall 86	17	17 ml	leicht blutig	Altersrisiko, Z.n. Plazentalösung, Z.n. Kind mit Asphyxie
Fall 4	16	?	?	Altersrisiko
Fall 101	15	15 ml	leicht blutig	Altersrisiko

	Mindestens 10% aneuploide Kerne für Chromosom:	Bemerkungen, Interpretation
Fall 41	13	-
Fall 100	13	Aufgrund schwacher Signale und Kreuzhybridisierung ist eine definitive Interpretation der wenigen Signale für Chromosom 13 nicht möglich
Fall 88	18, 21	Im gesamten Präparat nur 41 Zellkerne. Aussage zur Zahl der Chromosomen 13, 18, 21 nicht möglich, Hinweis auf männlichen Chromosomensatz
Fall 86	18, 21, XY	Im gesamten Präparat nur wenig Zellkerne, viele Zellkerne haben nicht hybridisiert, Aussage zur Zahl der Chromosomen 13, 18, 21 nicht möglich, Signale 13/21 sehr schwach
Fall 4	XY	-
Fall 101	XY	Extrem zellarmes Präparat, aufgrund der geringen Kernzahl keine definitive Beurteilung möglich; für das X-Chromosom war manchmal neben 2 Signalen ein weiteres Leuchten zu sehen

Tab.40 6 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kerne für eine oder mehrere Sonden und weniger als 10% auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden

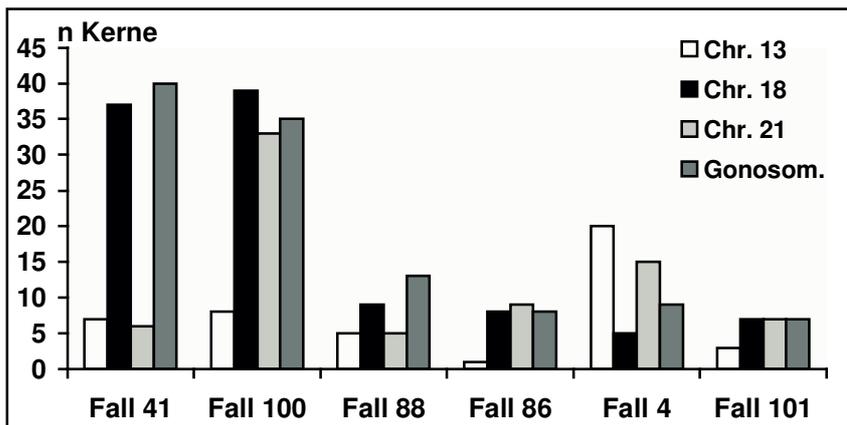


Abb.67 6 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für eine oder mehrere Sonden, sowie weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden je Fall: Anzahl der auswertbaren Kerne für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY in den einzelnen Fällen

Für Chromosom 13 waren in den Fällen 41 und 100 mehr als 10% aneuploide, d.h. 3signalige Kerne vorhanden (Tab.41, Abb.68 und 69). In Fall 41 waren für Chromosom 13 insgesamt 7 Kerne beurteilbar, von denen jeweils 3 Kerne (jeweils 43%) 1 bzw. 2 Signale zeigten. In 1 Kern (14%) waren 3 Signale zu sehen. Für die anderen hybridisierten Sonden (18, 21, XY) konnten 6 bis 40 Kerne ausgezählt werden. Es waren dabei 0 bis 3% aneuploide Kerne zu sehen. In der Interpretation wird das kontrollbedürftige Signalmuster für Chromosom 13 nicht erwähnt. In Fall 100 waren in 3 (38%) von 8 analysierbaren Kernen 3 Signale zu sehen, in 1 Kern (12%) 1 Signal und in 4 Kernen (50%) 2 Signale.

Für die übrigen Chromosomen waren 33 bis 39 Kerne beurteilbar, die keine aneuploiden Signalkonstellationen zeigten. Eine definitive Interpretation der wenigen Signale für Chromosom 13 war aufgrund von schwachen Signalen und Kreuzhybridisierung nicht möglich.

Chromosom 13	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 41	7	43	3	43	3	14	1
Fall 100	8	50	4	12	1	38	3

Tab.41 2 Fälle mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 13: Anzahl der auswertbaren Kerne und Signalverteilung

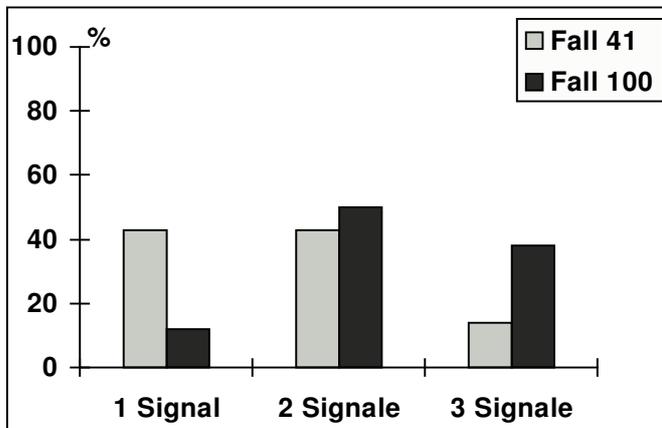


Abb.68 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 13 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 13

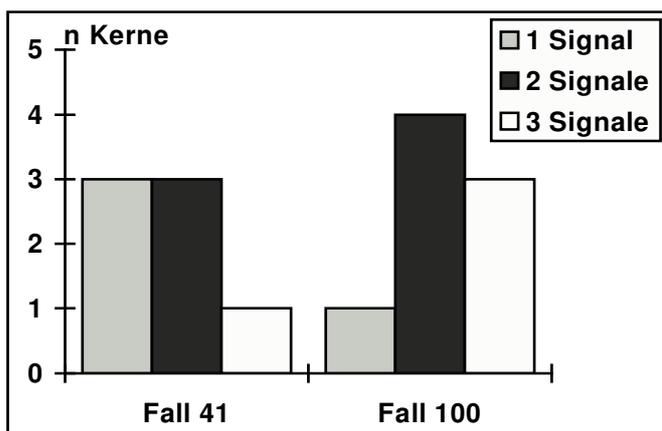


Abb.69 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 13 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 13

In den Fällen 88 und 86 lagen für die Chromosomen 18 und 21 jeweils mehr als 10% aneuploide Kerne vor, in Fall 86 zusätzlich auch für die Gonosomen. Für Chromosom 13 waren in Fall 88 keine aneuploiden Kerne (80% 2 Signale, 20% 1 Signal) vorhanden, in Fall 86 war hierfür nur 1 Kern beurteilbar, der nur ein Signal zeigte. In diesem Fall konnten im gesamten Präparat nur wenige Zellkerne gefunden werden, die zudem häufig nicht hybridisiert hatten. Die Signale für die Sonden 13/21 waren sehr schwach. Insgesamt konnte daher mit dem FISH-Befund keine verlässliche Aussage zur Zahl der Chromosomen gemacht werden. In Fall 88 waren ebenfalls nur wenige Zellkerne vorhanden, weshalb ebenfalls keine zuverlässige Aussage über die Autosomen möglich war. Für die Gonosomen lag der Hinweis auf einen männlichen Chromosomensatz vor. Für Chromosom 18 (siehe Tab.42, Abb.70 und 71, 74-77) waren in Fall 88 9 Kerne analysierbar, von denen 8 Kerne (89%) 2 Signale aufwiesen und 1 Kern (11%) 3 Signale. In Fall 86 konnten für Chromosom 18 8 Kerne beurteilt werden. Davon waren in 6 Kernen (75%) 2 Signale zu sehen und in 2 Kernen (25%) 3 Signale.

Chromosom 18	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 88	9	8	89	0	0	1	11
Fall 86	8	6	75	0	0	2	25

Tab.42 2 Fälle mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 18: Anzahl der auswertbaren Kerne und Signalverteilung

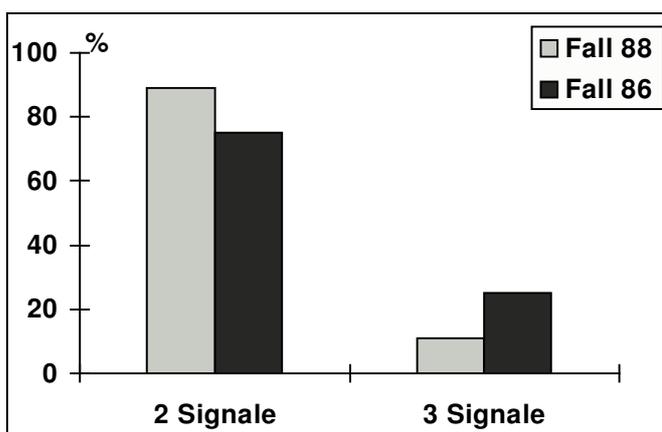


Abb.70 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 18 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

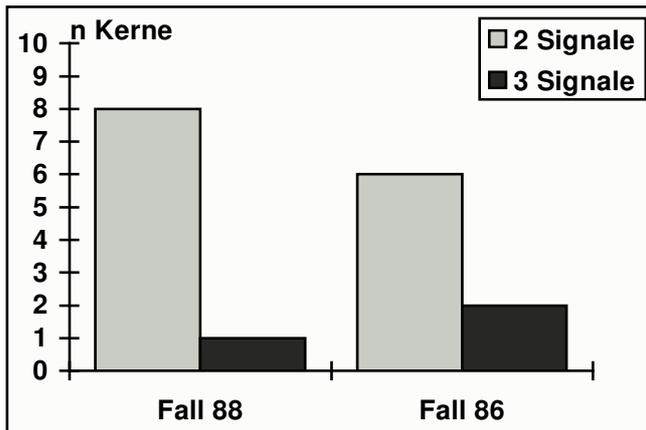


Abb.71 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 18 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für Chromosom 18

Für Chromosom 21 (Tab.43, Abb.72-77) waren in Fall 88 5 Kerne auszählbar. Davon waren in 3 Kernen (60%) 2 Signale und in 2 Kernen (40%) 3 Signale sichtbar. In Fall 86 konnten für die Sonde 21 9 Kerne analysiert werden. 7 Kerne (78%) wiesen 2 Signale auf und 2 Kerne (22%) 3 Signale.

Chromosom	Anzahl der ausgewerteten Kerne	2 Signale		1 Signal		3 Signale	
		n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne	n Kerne	% Kerne
Fall 88	5	3	60	0	0	2	40
Fall 86	9	7	78	0	0	2	22

Tab.43 2 Fälle mit weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden und mindestens 10% aneuploiden Kernen für Chromosom 21: Anzahl der auswertbaren Kerne und Signalverteilung

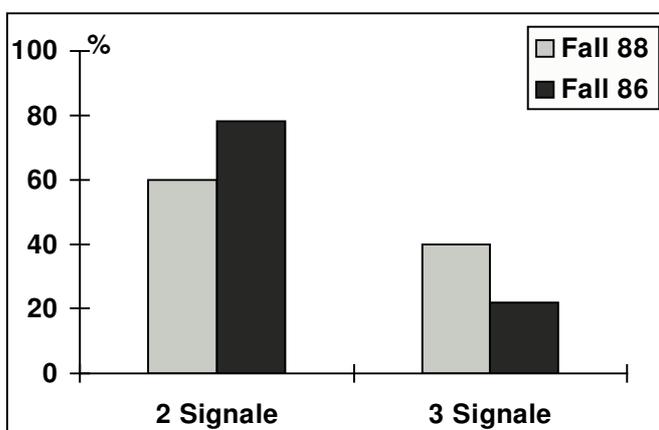


Abb.72 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 21 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Prozentsatz der Kerne mit 2 und 3 Signalen für Chromosom 21

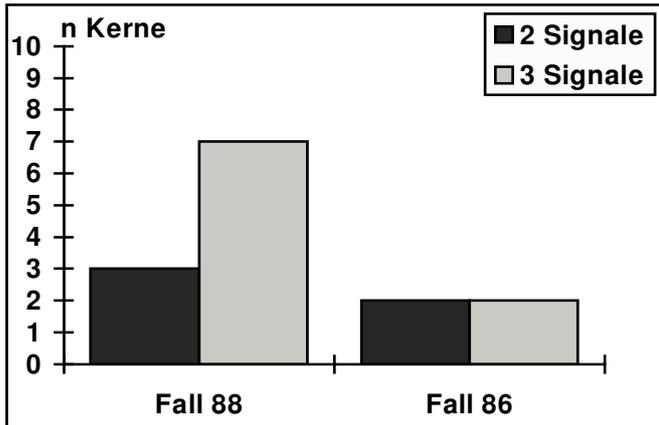


Abb.73 2 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für Chromosom 21 und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der Kerne mit 2 und 3 Signalen für Chromosom 21

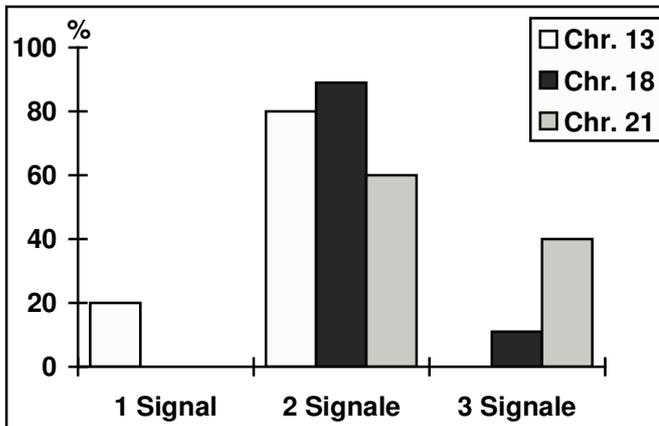


Abb.74 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen in Fall 88

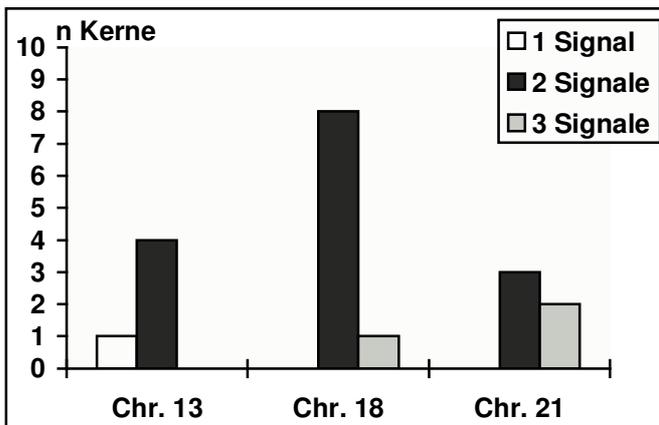


Abb.75 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen in Fall 88

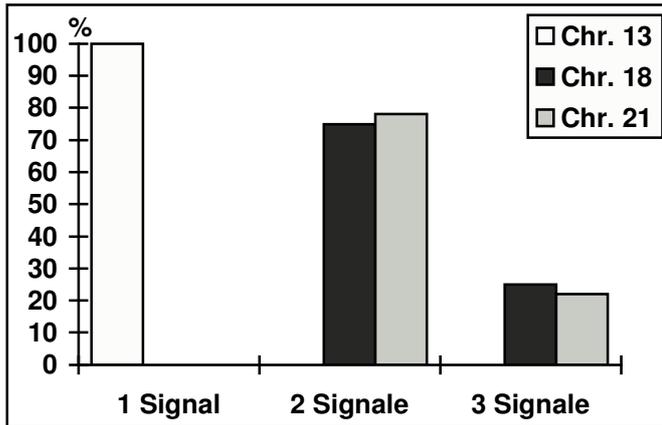


Abb.76 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen in Fall 86

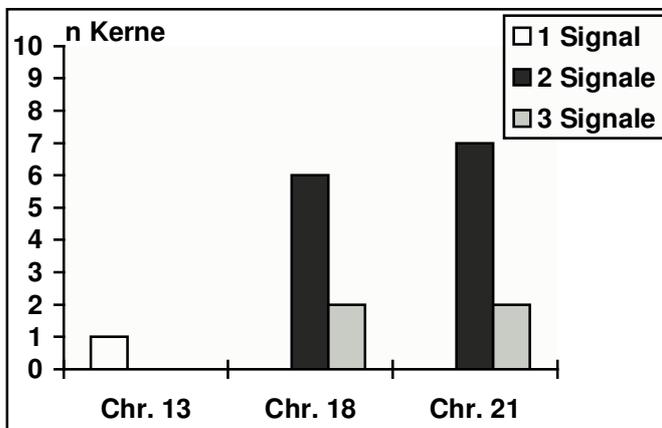


Abb.77 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Autosomen in Fall 86

Für die Gonosomen (siehe Tab.44, Abb. 78 und 79) waren in den Fällen 4 und 101 mehr als 10% aneuploide Kerne, d.h. nicht XX- oder XY-Konstellation aufweisende Kerne vorhanden. In Fall 86 konnten, bei 8 für die Gonosomen auswertbaren Kernen, 5 Kerne (63%) mit weiblichem Chromosomensatz gesehen werden. Daneben zeigten 2 Kerne (25%) die Konstellation XY und 1 Kern (12%) 3 X-Signale. Die Interpretation zu diesem Fall ist im vorangehenden Absatz beschrieben. In Fall 101 waren für die Gonosomen 7 Kerne beurteilt werden. 5 Kerne (72%) zeigten 2 X-Signale und jeweils 1 Kern (jeweils 14%) 1 bzw. 3 X-Signale. Dabei fiel auf, daß sich manchmal neben den beiden Signalen noch ein weiteres Leuchten zu sehen war. Für die Autosomen lagen keine 3signaligen Zellkerne vor. Insgesamt war für diesen Fall aufgrund der geringen Kernzahl keine definitive Beurteilung möglich. In Fall 4 waren für die Geschlechtschromosomen 9 Kerne analysierbar, von denen 8 Kerne (89%) das Signalmuster XY zeigten und 1 Kern (11%)

lediglich 2 Y-Signale. Für die Autosomen waren keine 3-signaligen Kerne zu sehen. Zur Interpretation dieses FISH-Befundes ist nichts bekannt.

Kerne:	Fall 86		Fall 101		Fall 4	
	n	%	n	%	n	%
XY	2	25	0	0	8	89
YY	0	0	0	0	1	11
XX	5	63	5	72	0	0
XXX	1	12	1	14	0	0
X0	0	0	1	14	0	0

Tab.44 3 Fälle mit weniger als 10 auswertbaren Kernen pro Sonde und mindestens 10% Kernen mit abweichendem Signalmuster für die Gonosomen

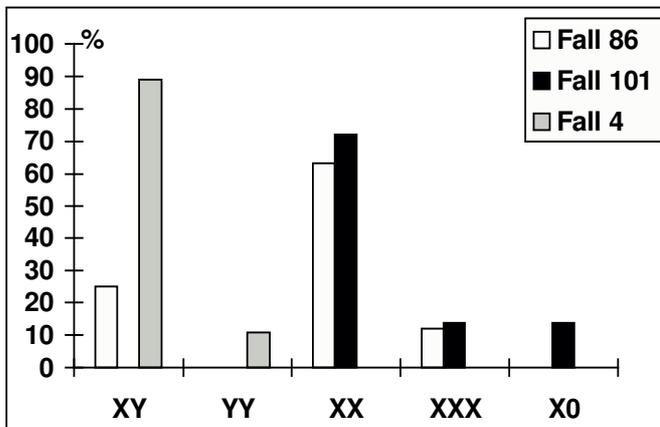


Abb.78 3 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Prozentsatz der Kerne mit XY/ XX – bzw. abweichendem Signalmuster

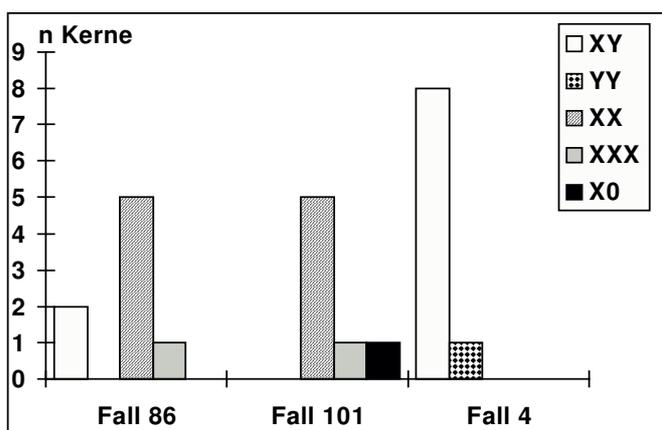


Abb.79 3 Fälle mit  $\geq 10\%$  aneuploiden Kernen für die Gonosomen und weniger als 10 auswertbaren Kernen für eine oder mehrere Sonden: Anzahl der Kerne mit XY/ XX – bzw. abweichendem Signalmuster

### **3.4.2. Problematische FISH-Befunde unter den Fällen mit pathologischem Karyotyp**

In 9 Fällen (Nr. 40,56,67,69,72,109,115,117,118) konnte eine Chromosomenaberration, die mit der konventionellen Chromosomenanalyse diagnostiziert wurde, im FISH-Befund nicht erkannt werden. Das entspricht 37% der Fälle mit auffälligem Karyotyp und 7% aller Fälle. In Fall 67 zeigten die auswertbaren Kerne für Chromosom 18 ein Signalmuster, das für einen unauffälligen Karyotyp sprach, obwohl eine Trisomie 18 vorlag. In 3 Fällen (Nr. 40,109,115) konnte der pathologische Befund aufgrund einer fehlgeschlagenen Hybridisierung für die entsprechenden Sonden nicht erkannt werden. In 5 Fällen (Nr. 56,69,72,117,118) handelte es sich um strukturelle Aberrationen, die mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht nachweisbar sind.

#### **3.4.2.1. Ein falsch negativer FISH-Befund in Fall 67**

In Fall 67 (Abb.80 und 81) wurde die Amniozentese nach 12+3 Schwangerschaftswochen aufgrund einer sonographisch erkennbaren Nackenfalte des Feten von 4,2 mm durchgeführt. Menge und Farbe des entnommenen Fruchtwassers sind unbekannt. Dieser Fall entspricht 4% der Fälle mit auffälligem Karyotyp und 1% aller Fälle. Die für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY durchgeführte FISH-Untersuchung ergab für die Sonden 13 und 21 keine Signale. Für Chromosom 18 waren 20 Kerne auswertbar. Davon zeigten 18 Kerne (90%) 2 Signale, 1 Kern (5%) 3 Signale und 1 Kern (5%) 4 Signale. Für die Geschlechtschromosomen konnten ebenfalls 20 Zellkerne beurteilt werden. Dabei waren in 18 Kernen (90%) 2 Signale für Chromosom X zu sehen und in jeweils 1 Kern (jeweils 5%) 1 Signal bzw. 4 Signale für das X-Chromosom. Dementsprechend wurde im FISH-Befund, bei insgesamt sehr wenig auswertbaren Kernen und fehlenden Signalen für die Chromosomen 13 und 21 kein konsistenter Hinweis auf eine Trisomie 18 oder eine Aberration der Gonosomen gesehen. Der erste Kulturansatz für die konventionelle Karyotypisierung wurde wegen eines sehr geringen Zellwachstums erst 4 Wochen nach der Amniozentese analysiert. In allen 16 untersuchten Metaphasen wurde ein weiblicher Chromosomensatz mit einem zusätzlichen Chromosom 18 gefunden. Dieses Ergebnis entsprach also einer freien Trisomie 18. Da in der Zellkultur nur wenige verschiedene Zellklone gefunden wurden, konnte eine In-vitro-Entstehung eines pathologischen

Zellklons nicht ausgeschlossen werden. Bei weiterbestehender sonographischer Auffälligkeit des Feten wurde jedoch die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Trisomie 18 für größer gehalten. Als Erklärung für die Diskrepanz zum unauffälligen FISH-Befund wurde eine Kontamination der Fruchtwasserprobe mit maternalen Zellen in Betracht gezogen.

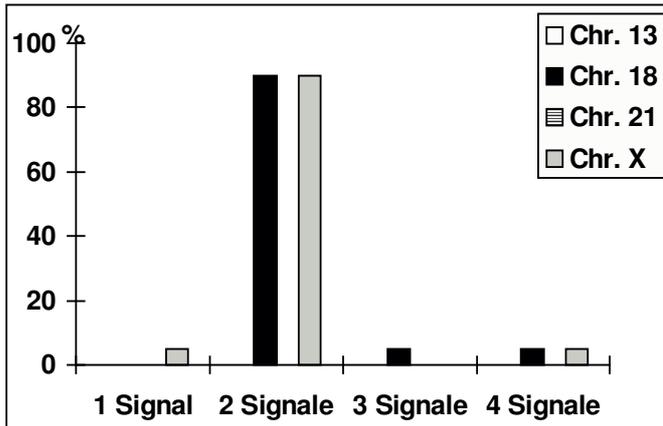


Abb.80 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2, 3 und 4 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und X in Fall 67

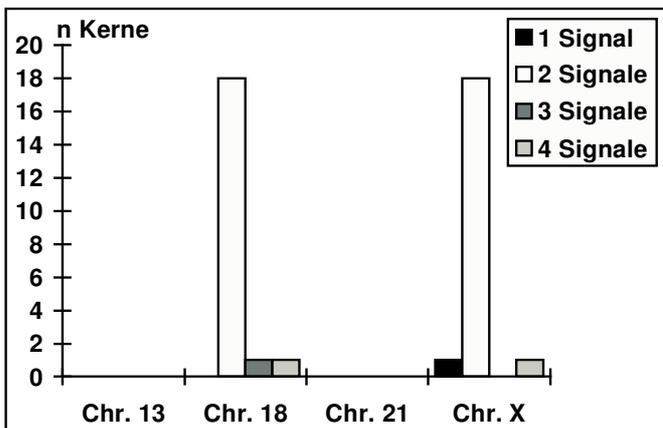


Abb.81 Anzahl der Kerne mit 1, 2, 3 und 4 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 in Fall 67

### **3.4.2.2. Numerische Chromosomenaberrationen, die aufgrund einer fehlgeschlagenen Hybridisierung für die entsprechenden Sonden nicht erkannt wurden**

In den Fällen 40 und 109 schlug die Hybridisierung für alle verwendeten Sonden fehl. Diese beiden Fälle entsprechen 12% der Fälle mit auffälligem Karyotyp und 2% aller Fälle. Die untersuchte Fruchtwasserprobe in Fall 40 entstammte einer Repunktion der gleichen Patientin, nachdem in der ersten Chromosomenanalyse, die auf konventionellem Wege erfolgt war, ein Trisomie 13-Mosaik gefunden worden war. Die aktuelle Punktion wurde in der 16. Schwangerschaftswoche vorgenommen. Menge und Aspekt des Fruchtwassers sind nicht bekannt. Die Hybridisierung wurde lediglich für die Chromosomen 13 und 21 durchgeführt und ergab keinerlei sichtbare Signale. Somit konnte die in der folgenden Karyotypisierung bestätigte Trisomie 13 nicht erkannt werden.

In Fall 109 fand die Punktion von 30 ml leicht blutig tingiertem Fruchtwasser nach 36+0 Schwangerschaftswochen statt. Die Indikation war durch einen sonographisch festgestellten AV-Kanal beim Feten und Polyhydramnion gegeben. In der FISH-Untersuchung des zellreichen Fruchtwasserpräparates konnten bei ungewöhnlich aufgequollener Kernstruktur keine Hybridisierungssignale gesehen werden. Dadurch wurde die nachfolgend in der konventionellen Chromosomenanalyse diagnostizierte freie Trisomie 21 nicht erkannt. In Fall 115 (Abb.82 und 83) wurden nach 20+4 Schwangerschaftswochen wegen eines sonographisch entdeckten Hygroma colli und einer massiven Pyelektasie des Feten 20 ml klaren Fruchtwassers entnommen. Die Hybridisierung wurde für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY durchgeführt. Für die Sonden 13 und 21 waren bei der Auswertung keine Signale sichtbar. Für Chromosom 18 zeigten 42 Kerne (93%) von insgesamt 45 analysierbaren Kernen 2 Signale und 3 Kerne (7%) 1 Signal. Für die Geschlechtschromosomen waren 51 Kerne beurteilbar. Davon zeigten 46 Kerne (90%) ein X- und ein Y-Signal und 5 Kerne (10%) jeweils nur 1 X-Signal. Da für Chromosom 21 keine Signale vorhanden waren, wurde die nachträglich in der Metaphasenanalyse diagnostizierte freie Trisomie 21 mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht erkannt.

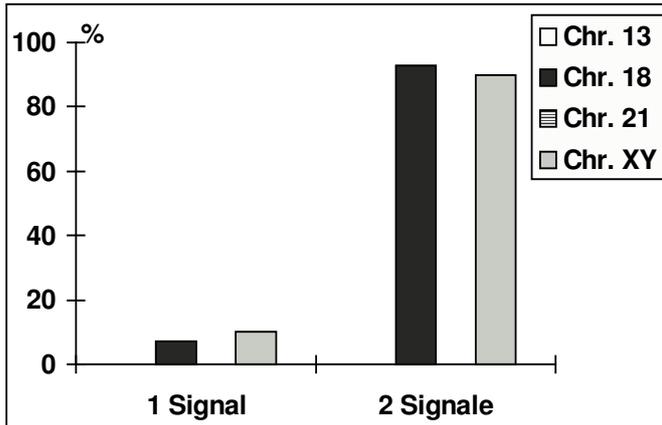


Abb.82 Prozentsatz der Kerne mit 1 und 2 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY in Fall 115

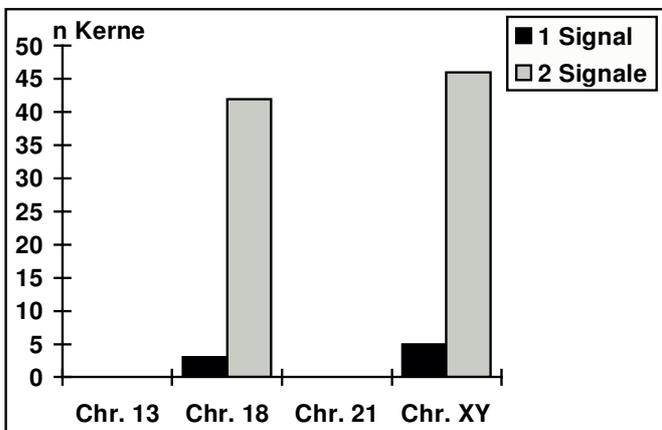


Abb.83 Anzahl der Kerne mit 1 und 2 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY in Fall 115

### 3.4.2.3. Strukturelle Chromosomenaberrationen, die mit der FISH nicht erkennbar waren

In 5 Fällen (Nr. 56,69,71,117,118; siehe Tab.45) wurde mit der konventionellen Chromosomenanalyse eine strukturelle Chromosomenaberration diagnostiziert. Diese konnten mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Detektion numerischer Aberrationen der Chromosomen 13, 18, 21 und XY nicht erkannt werden. Diese 5 Fälle entsprechen 21% der Fälle mit letztendlich pathologischem Karyotyp und 4% aller Fälle.

	SSW	FW-Menge	FW-Aspekt	Indikation
Fall 118	20+2	?	?	Polyhydramnion
Fall 69	13+3	12,5 ml	klar	Hydrops placentae, reduzierte FW-Menge
Fall 56	28+3	20 ml	klar	Dysproportionierte Retardierung d. Feten
Fall 72	19+2	19 ml	klar	Nackenödem in der Frühschwangerschaft
Fall 117	29+0	20 ml	leicht blutig	V.a.Aortenisthmusstenose Geminus II

	FISH-Befund	Metaphasenanalyse
Fall 118	46, XX	46, XX, rca 8p
Fall 69	XX, 18 unauffällig	46, XX, 46, t (10;17)
Fall 56	46, XX	46, XX, del (4p)
Fall 72	46, XX	46, XX, inv(3) (p25;q12)
Fall 117	46, XY	46, XY, var Yp

Tab.45 5 Fälle mit strukturellen Chromosomenaberrationen, die mit der FISH-Untersuchung nicht erkennbar waren

In Fall 118 wurde die Amniozentese nach 20+2 Schwangerschaftswochen aufgrund eines sonographisch entdeckten Polyhydramnions durchgeführt. Menge und Aspekt des entnommenen Fruchtwassers sind nicht bekannt. Der FISH-Befund ergab einen weiblichen Chromosomensatz mit disomen Vorliegen der getesteten Chromosomen 13, 18 und 21. Genaue Daten über die Signalverteilung und die Anzahl der ausgewerteten Kerne liegen nicht vor. Die Metaphasenanalyse auf numerische und strukturelle Aberrationen zeigte die Aberration 46, XX, rca 8p.

In Fall 69 (Abb.84 und 85) wurden im Gestationsalter von 13+3 Wochen aufgrund eines Hydrops placentae und reduzierter Fruchtwassermenge 12,5 ml klaren Fruchtwassers entnommen. Für Chromosom 18 und die Gonosomen konnten jeweils 50 Zellkerne beurteilt werden. In 44 Kernen (88%) zeigten sich 2 Signale für Chromosom 18 und 6 Kerne (12%) 1 Signal. 47 Kerne (94%) wiesen 2 X-Signale auf und 3 Kerne (6%) 1 X-Signal. Für die Chromosomen 13 und 21 waren keine Hybridisierungssignale zu sehen. Somit konnte mit der FISH-Untersuchung nur die Aussage eines disomen Vorliegens des Chromosom 18 und eines weiblichen Gonosomensatzes getroffen werden. In der konventionellen Karyotypisierung wurde in 19 von 35 ausgewerteten Metaphasen ein weiblicher Chromosomensatz ohne erkennbare pathologische Veränderung gesehen. In 16 Metaphasen fiel jedoch eine zytogenetisch balanzierte Tranlokation zwischen einem Chromosom 10 und einem Chromosom 17 auf. Die In-vitro-Genese der Tranlokationspopulation (46, XX, 46, t(10;17)) wurde für wahrscheinlich gehalten. Im Falle einer Kontamination mit maternalen Zellen (46,XX) sei jedoch das konstitutionelle

Vorliegen der Translokation möglich. Zur weiteren Klärung wurde deshalb eine Chromosomenanalyse der Eltern empfohlen.

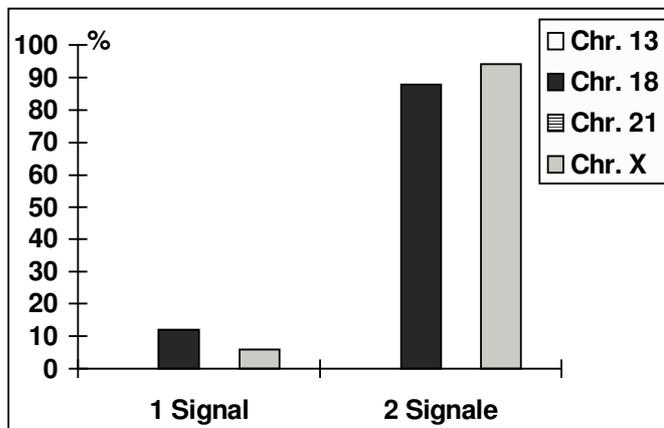


Abb.84 Prozentsatz der Kerne mit 1 und 2 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und X in Fall 69

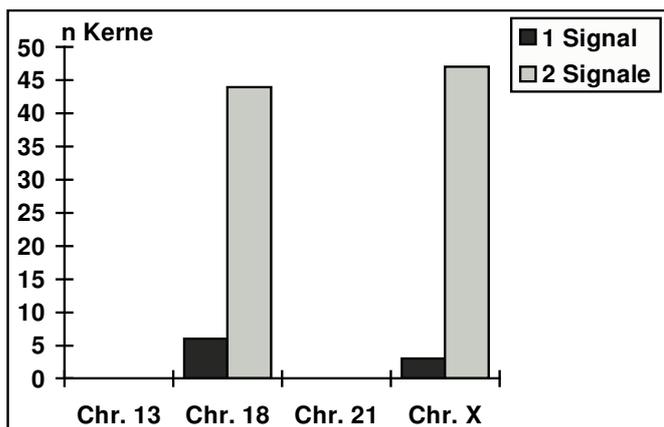


Abb.85 Anzahl der Kerne mit 1 und 2 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und X in Fall 69

In Fall 56 (Abb.86 und 87) wurden nach 28+3 Schwangerschaftswochen wegen einer dysproportionierten Retardierung des Feten 20 ml klaren Fruchtwassers entnommen. Es waren für alle hybridisierten Sonden mindestens 50 Kerne analysierbar, die in 98 bis 100% 2 Signale für die Autosomen bzw. für das X-Chromosom aufwiesen. Somit wurde im FISH-Befund auf einen weiblichen Chromosomensatz ohne Hinweis auf Aneuploidie der untersuchten Chromosomen geschlossen. In der nachfolgenden Metaphasenanalyse wurde an Chromosom 4 eine Deletion im distalen Bereich des kurzen Armes (del 4p15.2 - 4p16.1) unter Einschluß des WHSC1-Gens gesehen. Damit konnte die wahrscheinliche Entwicklung eines Wolf-Hirschhorn-Syndroms prognostiziert werden.

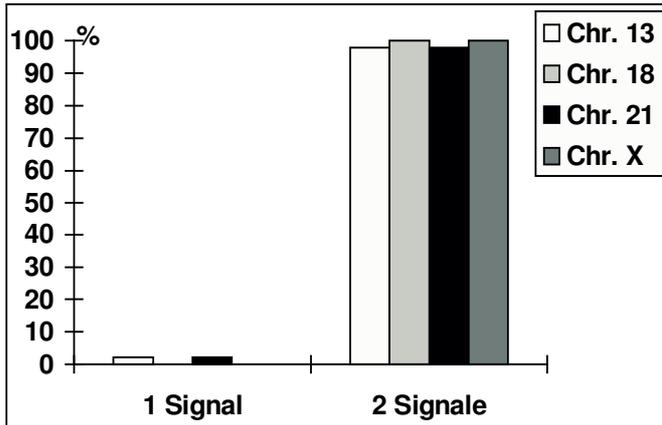


Abb.86 Prozentsatz der 1- und 2signaligen Kerne für die Chromosomen 13, 18, 21, X in Fall 56

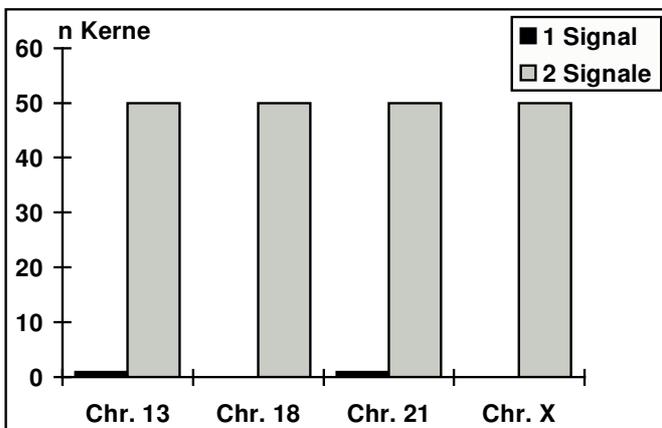


Abb.87 Anzahl der 1- und 2signaligen Kerne für die Chromosomen 13, 18, 21, X in Fall 56

In Fall 72 (Abb.88 und 89) fand die Amniozentese nach 19+2 Schwangerschaftswochen statt, nachdem in der Frühschwangerschaft sonographisch ein Nackenödem aufgefallen war. Die 19 ml des Aspirates hatten einen klaren Aspekt. Für die Chromosomen 13 und 21 konnten jeweils 18 Kerne beurteilt werden, die alle jeweils 2 Signale zeigten. Für Chromosom 18 waren in 45 (90%) von 50 auswertbaren Zellkernen 2 Signale zu sehen, in 4 Kernen (8%) 3 Signale und in 1 Kern (2%) 1 Signal. Für die Gonosomen waren in 49 (98%) von 50 Kernen 2 X-Signale sichtbar und in 1 Kern (2%) 3 X-Signale. Aufgrund der 3-signaligen Kerne für die Chromosomen 18 und X konnte im FISH-Befund eine geringfügige triploide Zellpopulation nicht ausgeschlossen werden. In der Metaphasenanalyse wurde in einem Chromosom 3 eine perizentromere Inversion (46,XX, inv(3)(p25;q12)) mit einem zentromernahen (q12) und einem telomernahen (p25) Bruchpunkt diagnostiziert. Die Inversion erschien zytogenetisch balanziert, d.h. lichtmikroskopisch war keine Duplikation oder Defizienz von genetischem Material

nachweisbar. Es wurde deshalb eine klinisch bedeutungslose strukturelle Variante des Chromosomensatzes vermutet. Zur weiteren Abklärung wurde eine Untersuchung der Eltern sowie eine genetische Beratung empfohlen.

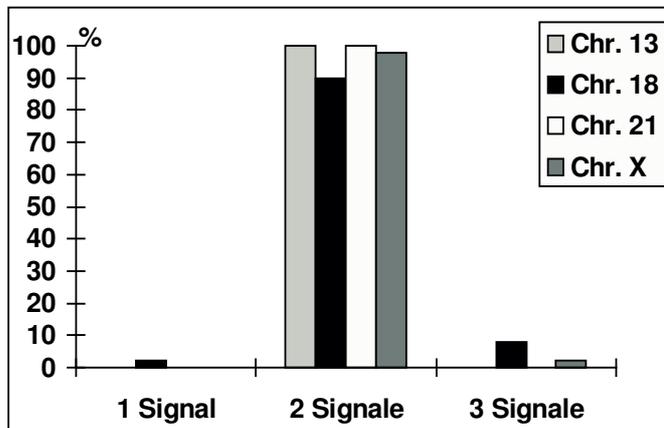


Abb.88 Prozentsatz an 1-, 2- und 3signaligen Kernen für Chromosom 13, 18, 21 und X in Fall 72

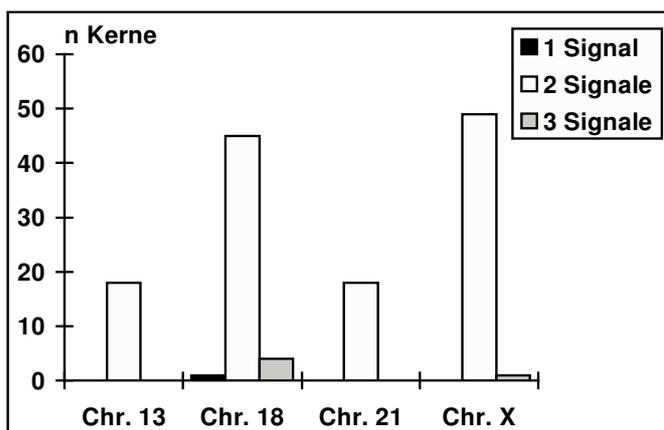


Abb.89 Anzahl der 1-, 2- und 3signaligen Kernen für Chromosom 13, 18, 21 und X in Fall 72

In Fall 117 (Abb.90 und 91) wurden in der 29. Schwangerschaftswoche 20 ml leicht blutigen Fruchtwassers gewonnen. Indikation war die sonographisch festgestellte Aortenisthmusstenose des zweiten Zwillings. Für Chromosom 13 wurden 12 Kerne ausgezählt, davon waren in 8 Kernen (67%) 2 Signale sichtbar, in 3 Kernen (25%) 1 Signal und in 1 Kern (8%) 3 Signale. Für die anderen hybridisierten Sonden konnten 50 bis 54 Kerne ausgewertet werden. Für die Autosomen zeigten 93 bzw. 90% der Kerne 2 Signale und je 4 % 3 Signale. Die restlichen Kerne wiesen 1 Signal auf. Für die Gonosomen war in 50 Kernen (94%) die Konstellation XY zu sehen, in 2 Kernen (4%) die

Konstellation XXY und in 1 Kern (2%) das Muster XYY. Im FISH-Befund wurde somit ein männlicher Chromosomensatz ohne Hinweis auf eine konsistente Aneuploidie der untersuchten Chromosomen gefunden. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die 3-signaligen Kerne einen möglichen Hinweis auf eine geringfügige triploide Zellpopulation darstellten. In der Metaphasenanalyse fiel an Chromosom Y im p-Bereich eine Strukturveränderung (46,XY,varYp) auf. Diese Veränderung wurde zunächst als klinisch bedeutungslose strukturelle Variante eingestuft, zur definitiven Klärung wurde eine baldestmögliche Untersuchung des Vaters angeraten.

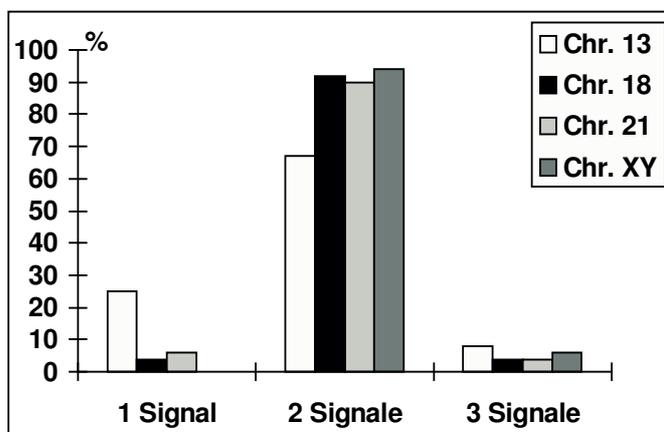


Abb.90 Prozentsatz der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY in Fall 117

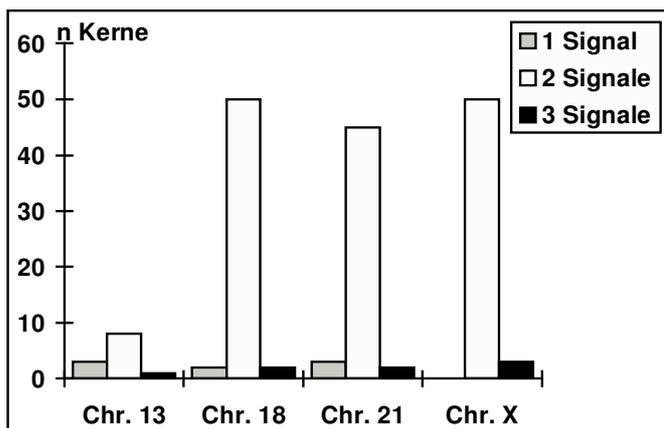


Abb.91 Anzahl der Kerne mit 1, 2 und 3 Signalen für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY in Fall 117

### **3.5. Die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Sonden**

#### **3.5.1. Chromosom 13**

Für Chromosom 13 wurden 130 Hybridisierungen durchgeführt. In 31 Fällen (23,6%) der Hybridisierungen war keine Auswertung möglich. In 5 Fällen war dies durch eine unzureichende Menge an Material begründet, in einem Fall durch eine zu geringe Inkubationszeit von 2 Stunden. In den übrigen Fällen war die Hybridisierung ohne erkennbare Ursache fehlgeschlagen. Die Anzahl der für Chromosom 13 auswertbaren Kerne war in den verbleibenden Fällen unterschiedlich. In 16 Fällen (12,3% der Hybridisierungen für Chromosom 13) waren weniger als 10 Kerne analysierbar, in 49 Fällen (37,7% der Hybridisierungen) 10 bis 49 Kerne und in 30 Fällen (23,1% der Hybridisierungen) mindestens 50 Kerne. In 4 Fällen liegen keine Angaben zur Anzahl der auswertbaren Kerne vor. In 24 Fällen war die Signalintensität auffallend schwach. In 3 Fällen trat Kreuzhybridisierung auf und in 1 Fall war das Signal häufig gesplittet.

#### **3.5.2. Chromosom 18**

Für Chromosom 18 wurden insgesamt 128 Hybridisierungen durchgeführt. Ohne Ergebnis blieben 19 Hybridisierungen (14,8%), davon 5 aufgrund von zu wenig Material. In einem Fall erfolgte die Inkubation mit der Sonde nur für 2 Stunden und war deshalb ineffektiv. In den restlichen Fällen versagte die Hybridisierung ohne feststellbaren Grund. In 9 Fällen (7% der Hybridisierungen) waren weniger als 10 Interphasenuklei und in 46 Fällen (35,9%) 10 bis 49 Kerne analysierbar. In 50 Fällen (39,1%) konnten mindestens 50 Zellkerne zur Auszählung der Signale herangezogen werden. Für 4 Fälle ist die Anzahl der auswertbaren Kerne unbekannt. In 4 Fällen war die Intensität der Signale gering, in ebenfalls 4 Fällen waren die Signale diffus.

#### **3.5.3. Chromosom 21**

Für Chromosom 21 wurden 130 Hybridisierungen durchgeführt, von denen 30 (23,1%) kein Ergebnis brachten. In 5 Fällen war dies auf eine zu geringe Menge an Zellmaterial zurückzuführen, in einem Fall auf eine erniedrigte Inkubationszeit von 2 Stunden. In den

übrigen Fällen war die Ursache für das Versagen der Hybridisierung nicht eruierbar. Bei den auswertbaren Fällen standen in 11 Fällen (8,5% der Hybridisierungen) weniger als 10 Interphasenuklei zur Analyse zur Verfügung, in 53 Fällen (40,8%) waren es 10 bis 49 Zellkerne und in 32 Fällen (24,6%) mindestens 50 Kerne. In 4 Fällen ist die Anzahl der auszählbaren Zellkerne nicht bekannt. Die Hybridisierungssignale für Chromosom 21 waren in 18 Fällen nur gering ausgeprägt. In 2 Fällen waren die Signale oft gesplittet, in ebenfalls 2 Fällen fiel Kreuzhybridisierung auf. In einem Fall war neben 2 distinkten Signalen ein weiteres schwaches Leuchten zu sehen, welches nicht als drittes Signal interpretiert wurde.

#### **3.5.4. Chromosom X**

Mit der Sonde für Chromosom X wurden insgesamt 128 Hybridisierungen durchgeführt. In 17 Fällen (13,3% der Hybridisierungen) konnte keine Auswertung stattfinden. Dies war in 5 Fällen durch zu wenig Material und in einem Fall durch eine verkürzte Inkubationszeit von 2 Stunden begründet. In den restlichen Fällen war die Hybridisierung ohne erkennbare Ursache fehlgeschlagen. In 9 Fällen (7% der Hybridisierungen) konnten weniger als 10 Kerne ausgezählt werden. In 45 Fällen (35,2%) konnten 10 bis 49 Kerne zur Analyse herangezogen werden und in 54 Fällen (42,2%) mindestens 50 Zellkerne. In 4 Fällen sind keine Angaben zur Anzahl der analysierbaren Kerne vorhanden. Die Signale fielen in einem Fall als diffus, in einem Fall als schwach ausgeprägt und in 2 Fällen als gesplittet auf. In 3 Fällen war ein weiteres Leuchten zu sehen und in 2 Fällen trat Kreuzhybridisierung auf.

#### **3.5.5. Chromosom Y**

Für Chromosom Y wurden 128 Hybridisierungen durchgeführt, dabei war der Karyotyp in 63 Fällen männlich. In diesen 63 Fällen war also mit einem Signal für das Y-Chromosom zurechnen. In 11 Fällen (17,5% der 63 männlichen Karyotypen) war die FISH-Untersuchung jedoch nicht auswertbar. In 3 Fällen war zu wenig Material vorhanden, in den restlichen Fällen ist die Ursache für das Fehlschlagen der Hybridisierung letztlich unklar. In 3 Fällen (4,8% Hybridisierungen mit männlichem Karyotyp) waren weniger als 10 Kerne auswertbar, in 28 Fällen (44,4%) lagen 10 bis 49 analysierbare Interphasenuklei

vor. In 21 Fällen (33,3%) standen mindestens 50 Zellkerne zur Auswertung zur Verfügung. In 4 Fällen ist die Anzahl der analysierbaren Kerne unbekannt. Eine schwache Signalintensität war für die Y-Sonde in 4 Fällen zu beobachten. In einem Fall lag Kreuzhybridisierung vor, in einem Fall waren die Hybridisierungssignale diffus und in 2 Fällen gesplittet.

Zusammenfassend ist in Abbildung 92 der Prozentsatz an fehlgeschlagenen Hybridisierungen (mit Ausnahme der Fälle, bei denen zu wenig Material oder eine zu kurze Inkubationszeit die Auswertung unmöglich machten) für die verschiedenen Sonden zu sehen. Daneben ist die Anzahl der Kerne, die in den übrigen Fällen zur Auswertung zur Verfügung standen dargestellt. In Abbildung 93 ist daneben für die einzelnen Sonden das Auftreten von Auffälligkeiten bei den analysierbaren Fällen zu sehen.

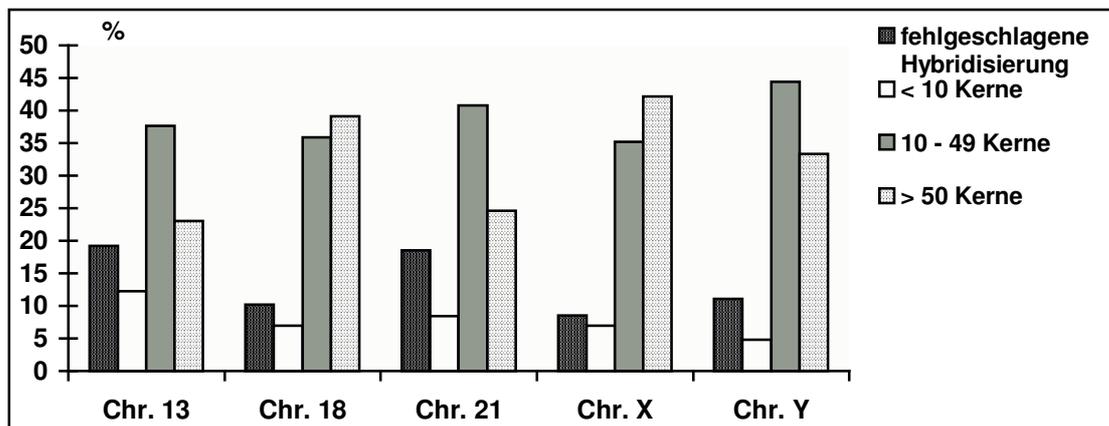


Abb.92 Anzahl der fehlgeschlagenen Hybridisierungen und Anzahl der auswertbaren Kerne für die einzelnen Sonden

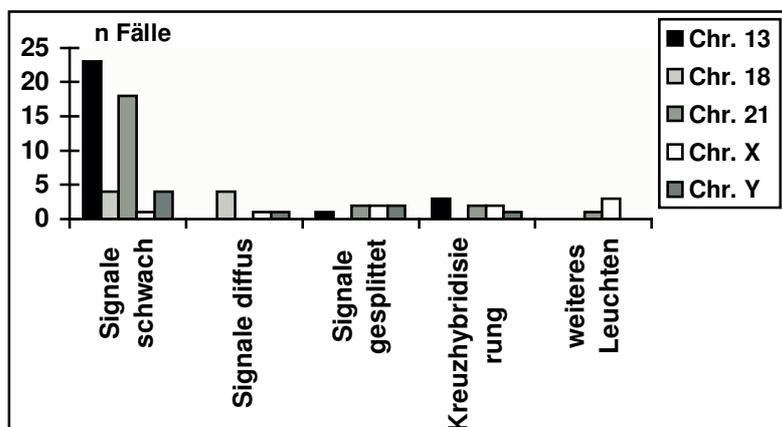


Abb.93 Anzahl der Fälle mit Auftreten von Problemen bei der Auswertung der einzelnen Sonden

## **4. Diskussion**

### **4.1. Methodische Besonderheiten**

#### **4.1.1. Sondenqualität**

In der vorliegenden Arbeit ist für die einzelnen Sonden ein unterschiedlich häufiges Auftreten von fehlgeschlagenen Hybridisierungen, von Problemen bei der Auswertung durch schwach ausgeprägte, gesplittete, diffuse oder kreuzhybridisierte Signale und ein unterschiedlich häufiges Erreichen von mindestens 50 auswertbaren Kernen feststellbar. Dabei schneiden die lokusspezifischen Sonden für die Chromosomen 13 und 21 schlechter ab, als die repetitiven Sonden für die Chromosomen 18, X und Y.

Qualität und Charakteristika der Chromosomensonden sind Schlüsselfaktoren für eine erfolgreiche FISH-Analyse. Repetitive  $\alpha$ -Satelliten-Sonden, die zentromernahe Chromosomenregionen markieren, bilden im Interphasekern intensive, kompakte, scharf abgegrenzte und gut auswertbare Hybridisierungssignale (Cremer et al. 1986; Christensen et al. 1992). Sie sind jedoch anfällig gegenüber wenig stringenten Hybridisierungsbedingungen (Cremer et al. 1986). Wenn die Sonden auch mit anderen als den Zielchromosomen kreuzhybridisieren, können falsch-positive Ergebnisse auftreten (Strovel et al. 1992; Verlinsky et al. 1995; Windsor et al. 1999). Die copy number der Repeatsequenzen kann durch Polymorphismen in der Perizentromerregion stark variieren und die Signalgröße beeinflussen. So können die Signale fehlen und falsch negative oder positive FISH-Ergebnisse entstehen (Mizunoe and Young 1992; Verma and Luke 1992; Seres-Santamaria et al. 1993; Verlinsky et al. 1995; Weremowicz et al. 2001). Weniger lebensfähige unkultivierte Amniozyten können eine verringerte Anzahl intakter Zielsequenzen aufweisen (Lapidot-Lifson et al. 1996). Bei sehr großem  $\alpha$ -Satelliten-Signal kann die Unterscheidung von einzelnen, überlappenden oder sich berührenden Signalen erschwert sein (D'Alton 1997). Die gemeinsame Organisation des Nukleolus durch die akrozentrischen Chromosomen kann die räumliche Auflösung von Zentromerproben im Interphasekern beeinträchtigen (Klinger et al. 1992). Translokationstrisomien sind durch zentromerische Sonden zum Teil nicht diagnostizierbar (Fritz et al. 1996; Steinborn et al. 1996). Von Bink et al. (2000) und Bryndorf et al. (1997) wurde für die Y-Sonde das Problem einer schwachen Signalintensität beschrieben. Inzwischen finden repetitive Proben für die Chromosomen

18, X und Y jedoch erfolgreich eine breite Anwendung. Die repetitive Sonde für die Chromosomen 13 und 21 ist zur FISH-Diagnostik wenig geeignet: Starke Homologien zwischen den jeweiligen  $\alpha$ -Satelliten-Regionen verursachen eine Kreuzhybridisierung, sodaß nicht zwischen den beiden Chromosomen unterschieden werden kann (Guyot et al. 1988; Christensen et al. 1992; Lebo et al. 1992; Cacheux et al. 1994; Mercier and Bresson 1995). Heute werden daher meist lokusspezifische Sonden verwendet, die sich an einen einzelnen, bestimmten Genlocus des Chromosoms 13 bzw. 21 heften. Mit ihnen sind auch Robertsonsche Translokationen erkennbar (Jalal et al. 1998).

Weremowicz et al. (2001) hatte jedoch bei der, auch in der vorliegenden Arbeit benutzten Sonde für die Down Syndrome Critical Region von Chromosom 21 (LSI 21, Vysis) bemerkt, daß die Signale oft undeutlich, granulär und schwer auszuwerten waren. Die 440 kb lange Zielsequenz der lokus-spezifischen Sonde für Chromosom 13 (LSI 13, Vysis) beinhaltet das 180 kb große RB1-Gen, das bei Patienten mit Retinoblastom zerstört sein kann. Tepperberg et al. (2001) führte auf eine ähnliche Deletion das Versagen der LSI 13-Sonde im Falle einer Trisomie 13 zurück. Bink et al. (2000) stellte eine geringfügig schlechtere Erfolgsrate für Hybridisierungen mit der Chromosom 13-Sonde fest. Bei Ulmer et al. (2000) war die Rate an nicht informativen und weniger abgesicherten Fällen für die Proben 13 und 21 mit 13,4% ebenfalls höher als für die Proben 18, X und Y mit 7,8%. Diese Erfahrungen mit der Hybridisierungseffizienz der Vysis-Sonden ähneln den in der vorliegenden Arbeit gemachten. Mögliche Gründe können in den oben beschriebenen Limitationen der jeweiligen Sondenart liegen.

#### **4.1.2. Zellzahl**

Das auszuwertende Signalbild nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an unkultivierten Fruchtwasserzellen kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst und eventuell verfälscht werden. Dazu zählen z.B. die Dreidimensionalität der Interphasechromosomen, Überlagerung oder Splittung von Signalen, Fehlhybridisierungen, überlappende, zerrissene, ungleichmäßig gefärbte Kerne, Kontamination mit Zellen mütterlicher Herkunft, Hintergrundfluoreszenz durch Cytoplasmareste und Zelldetritus und das Vorhandensein vieler degenerierter Kerne im unkultivierten Fruchtwasser (Christensen et al. 1992; Zheng et al. 1992; Philip et al. 1994; Mercier and Bresson 1995; Ulmer et al. 2000; American College of Medical Genetics 2000). Um eine verlässliche Aussage zu erhalten, muß eine Vielzahl

von Kernen untersucht werden. Offizielle Richtlinien fordern eine Analyse von mindestens 50 Zellkernen pro hybridisierter Chromosomenprobe (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. 1998). Die meisten Forschungsgruppen hatten sich in der Vergangenheit an diese Vorgaben gehalten. Soweit darüber Angaben gemacht werden, konnten in 81-88% der Fälle 50 Kerne pro Sonde ausgezählt werden (Bryndorf et al. 1997; Eiben et al. 1998b; Bink et al. 2000; Bryndorf et al. 2000; Ulmer et al. 2000). In den vorgelegten Ergebnissen gelang dies dagegen nur in 20% der Fälle. In neuerer Zeit versuchten verschiedene Gruppen, mit einer geringeren Zellzahl auszukommen. Eiben et al. (1999b) analysierten in 3280 Fällen je 30 Kerne pro Sonde und erhielt damit in 96% der Fälle ein informatives Ergebnis. Vier Trisomien 21 mit nur 18 bis 29 auswertbaren Kernen für Chromosom 21 wurden ebenfalls korrekt identifiziert. Weremowicz et al. (2001) erhielt mit 30 ausgezählten Kernen je Sonde in 97% von 911 Fällen ein informatives Resultat. Auch Pergament et al. (2000) analysierte nur 30 Kerne pro Chromosom und fand keinen Unterschied zur Auszählung von 50 Interphasekernen. Bei Bink et al. (2000) hätte die Analyse von nur 30 Interphasekernen je Sonde zu einer um 9% höheren Erfolgsrate (84% vs. 93%) geführt, ohne zusätzliche falsch positive oder falsch negative Befunde zu verursachen. In Zukunft wird noch zu ermitteln sein, ob eine Herabsetzung der zu analysierenden Zellzahl, die zu einer geringeren Rate an uninformativen Ergebnissen führen würde, tatsächlich ohne eine Beeinträchtigung der Ergebnisse möglich ist.

#### **4.1.3. Stadium der Schwangerschaft**

Das Stadium der Schwangerschaft hat in verschiedener Hinsicht Einfluß auf die FISH-Untersuchung. Die Häufigkeit von Chromosomenanomalien verändert sich im Laufe der Schwangerschaft ebenso wie die vorherrschenden Indikationen zu Amniozentese. In der 11.-13. SSW, wo bei Eiben et al. (1999b) eine Rate an Chromosomenaberrationen von 28,6% auftrat, stellen Auffälligkeiten in der fetalen Ultraschalluntersuchung die häufigste Indikation dar. Zwischen der 16. und 20. SSW mit den Hauptindikationen pathologischer Triple-Test und erhöhtes mütterliches Alter war die Häufigkeit von Aneuploidien deutlich niedriger. Lebo et al. (1992) bemerkte aber, daß mit zunehmendem Gestationsalter unter den bis dahin lebensfähigen Feten mit Chromosomenanomalien der Anteil an Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21 und XY zunimmt. Bezüglich sogenannter früher Amniozentesen ab der 11. SSW hatte Wilson (1995) in seinem Artikel zusammengefasst,

daß trotz der geringeren entnehmbaren Probenmenge genügend Material zur Chromosomenuntersuchung zur Verfügung steht, weil der Anteil lebensfähiger und somit analysierbarer bzw. kultivierbarer Zellen an der Gesamtzellzahl höher ist. Eiben et al. (1998b) entdeckte alle mit FISH diagnostizierbaren Chromosomenaberrationen auch in frühen Schwangerschaftswochen und war deshalb der Meinung, daß FISH hier trotz der geringeren absoluten Zellzahl schnelle und verlässliche Diagnosen liefern kann. Bei Bink et al. (2000) wiesen die vor der 15. SSW durchgeführten FISH-Untersuchungen, gemessen an der Zahl auswertbarer Kerne, jedoch eine geringere Erfolgsrate auf (50 Interphasekerne in der 14. SSW in 53,1% der Fälle vgl. mit 92,8% ab der 20. SSW). Carelli et al. (1992), Cheong Leung et al. (2001) und D`Alton et al. (1997) stellten fest, daß FISH an unkultivierten Amnionzellen im dritten Trimenon der Schwangerschaft ein signifikant höheres Risiko an uninformativen Resultaten birgt (45% uninformative Resultate im 3. Trimenon vgl. mit 16% im 2. Trimenon). Auch Klinger et al. (1992) beobachtete eine geringere Hybridisierungseffizienz bei höherem Gestationsalter. Als eine mögliche Ursache wurde eine mit dem Gestationsalter steigende Wahrscheinlichkeit maternaler Zellkontamination vorgeschlagen. Weremowicz et al. (2001) und Spathas et al. (1994) beobachteten bei Proben aus dem letzten Trimenon einen hohen Anteil an degenerierten Zellen mit schlecht definierten Signalen, reduzierter Hybridisierungseffizienz und verstärkter unspezifischer Hintergrundfluoreszenz. Auch Lapidot-Lifson et al. (1996) fand, daß Amniozyten späten Gestationsalters aufgrund des geringeren Anteils lebensfähiger Zellen weniger geeignet für FISH waren. In der vorliegenden Arbeit machten die Fruchtwasserproben vor der 15.SSW 18% und diejenigen aus dem 3. Trimenon 23% aller Proben aus. Von den Fällen, die durch fehlgeschlagene oder kontrollbedürftige Hybridisierungen, sowie durch weniger als 50 auswertbare Kerne je Sonde auffielen, waren jedoch 21% aus frühen Schwangerschaftswochen und 24% aus dem 3. Trimenon.

#### **4.1.4. Kontamination mit mütterlichem Blut**

Fruchtwasserproben sind nach der Erfahrung verschiedener Forschungsgruppen (Rebello et al. 1994; Winsor et al. 1996; Bryndorf et al. 1997; D`Alton et al. 1997; Ulmer et al. 2000) in 14 bis 21% der Fälle mit mütterlichen Zellen verunreinigt. Bei Ward et al. (1993) und Bink et al. (2000) lag der Anteil mit 3,8% bzw. 6% niedriger. In der vorliegenden Arbeit entstand der Verdacht auf maternale Zellkontamination durch blutiges oder leicht

blutiges Fruchtwasser, braunes Zellpellet und/oder Auftreten von XX-Kernen bei männlichem Karyotyp in insgesamt 35 Fällen, d.h. 27% der untersuchten Fruchtwasserproben. Unter den problematischen FISH-Befunden und solchen mit weniger als 50 auswertbaren Kernen lag der Anteil der maternal kontaminierten Proben höher, nämlich bei 32%. Einige mütterliche Zellen befinden sich immer im Fruchtwasser (Nuß et al. 1994). In größeren Mengen gelangen sie durch Einblutung in die Fruchthöhle oder als Gewebsstanze bei der Amniozentese dorthin. (Christensen et al. 1993; Bink et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit der Kontamination mit nichtfetalen Zellen besteht in sehr seltenen Fällen bei einem sogenannten lost twin oder Chimärenbildung (Winsor et al. 1996). Als begünstigende Faktoren wurden transplazentärer Punktionsmodus (Bink et al. 2000), anteriore Plazentalage (Nuß et al. 1994) und Oligohydramnion (Estabrooks et al. 1999b) erkannt. Maternale Leukozyten führen nicht zur Verunreinigung von Zellkulturen, da sie nur in Suspensionskulturen wachsen. Makrophagen, die zwar auf soliden Kulturböden anwachsen, replizieren nur unter sehr speziellen Umständen (Christensen et al. 1993). Dementsprechend findet sich maternale Zellkontamination bei kultivierten Fruchtwasserproben nur in 0,2% der Fälle (Winsor et al. 1996; D`Alton et al. 1997). Blutige Proben waren bei Bink et al. (2000) signifikant häufiger kontaminiert, nämlich in 23% der Fälle gegenüber 2% bei klarem Fruchtwasser. Bei Winsor et al. (1996) waren auch klare Fruchtwasserproben in 13,6% mit maternalen Zellen kontaminiert und es traten blutige Proben ohne Kontamination mit mütterlichen Zellen, erklärbar durch Beimengung von Blut fetalen Ursprungs, auf. Der Anteil blutiger Proben unter den eingesandten Fruchtwasserproben lag bei Mercier and Bresson (1995) sowie bei Christensen et al. (1993) bei 11-12%, bei Ward et al. (1993) hingegen bei 2,3% und bei Morris et al. (1999) betrug der Anteil schwer blutkontaminierter Proben 2,9%. Bei Bryndorf et al. (2000) war der Anteil an sichtbar kontaminierten Proben mit 8% gegenüber einer vorhergehenden Untersuchung (Bryndorf et al. 1997) mit 14% rückläufig, was durch eine bessere Amniozentesetechnik erklärt wurde. In der vorliegenden Arbeit waren die Fruchtwasserproben in 26 von 129 Fällen, d.h. ähnlich wie bei Winsor et al. (1996) in 20%, sichtbar blutig. Winsor et al. (1996) konstatierten eine Korrelation zwischen der Blutmenge im Fruchtwasser, erkennbar an der Intensität der Färbung, und dem Grad der Kontamination. Leicht blutige Proben enthielten in 16% der Fälle 20 oder mehr Prozent mütterliche Zellen, mäßig blutige Proben in 55%. Bei Weremowicz et al. (2001) war die Anzahl der mütterlichen Zellen dagegen nicht immer proportional zum Aspekt. Bei starker Kontamination kann die

Aussagekraft von FISH durch die Möglichkeit falsch negativer Befunde erheblich eingeschränkt sein (Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. 1998). So stellte Bryndorf et al. (1997) fest, daß bei blutigen Proben die Signalverteilung bei pathologischen und unauffälligen Befunden häufig überlappend war. Bei Ward et al. (1993) ergab FISH in 4 Fällen bei männlichen Feten fälschlicherweise den Chromosomensatz 46,XX. Christensen et al. (1993) untersuchten 18 blutige Fruchtwasserproben und kamen bei zwei stark verunreinigten Proben zu dem Ergebnis, daß eine Trisomie 21 in beiden Fällen, eine Trisomie 18 in einem Fall übersehen worden wäre. Bei Ulmer et al. (2000) verursachte maternale Zellkontamination einen unklaren FISH-Befund bei Trisomie 21. Weremowicz et al. (2001) sahen die Verunreinigung mit mütterlichen Zellen als Ursache für 3 falsch negative Befunde. Jalal et al. (1998) beobachteten dagegen trotz Auftretens von XX-Zellen in daraufhin untersuchten XY-Proben, in 339 unkultivierten Fruchtwasserproben keine Fehldiagnosen mit FISH. Während bei männlichen Feten eine Beimischung mütterlichen Blutes durch die neben den XY-Kernen vorhandenen XX-Kerne aufgedeckt werden kann, ist dies bei weiblichen Feten kaum möglich. Von einigen Gruppen wurde eine Unterscheidung der Zellen aufgrund morphologischer Kriterien – z.B. multilobuläre mütterliche Zellen, runde fetale Zellen – durchgeführt (Divane et al. 1994; Nuß et al. 1994; Spathas et al. 1994; Mercier and Bresson 1995). Ulmer et al. (2000) konnten die morphologische Differenzierung nicht nachvollziehen. Ward et al. (1993) versuchten erfolglos die mütterlichen Zellen durch Vorbehandlung der sichtbar kontaminierten Proben mit Ammoniumchlorid zu entfernen. Bryndorf et al. (2000) erzielte durch Verwerfen der ersten Milliliter der Probe eine um den Faktor 0,4 geringere Kontamination. Nuß et al. (1994) schlugen die Verwendung dünnerer Punktionsnadeln, ultraschallgesteuerte Punktion, das Verwerfen der ersten aspirierten Milliliter und die ausschließliche Verwendung der mittleren 5 ml Fruchtwasser vor. Als Grenzwert für die Verwendbarkeit kontaminierter Proben gaben Winsor et al. (1996), Bink et al. (2000) und D`Alton et al. (1997) einen Anteil an mütterlichen Zellen von 20% an. Bryndorf et al. (2000) schätzten blutkontaminierte Proben nur bis zu höchstens 2% zusätzlichen XX-Kernen bei XY-Konstellation mit höchstens als informativ ein. Letztlich entschieden sich aber viele Autoren für den Ausschluß aller sichtbar blutkontaminierten Fruchtwasserproben von der FISH-Untersuchung (z.B. Eiben et al. 1999b Bink et al. 2000 Ward et al. 1993 Ulmer et al. 2000).

## 4.2. Pathologische FISH-Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der konventionellen Chromosomenanalyse 24 Chromosomenaberrationen (18,6% aller 129 Untersuchungen) gefunden. Je nach Studie variiert in der Literatur der Anteil der Aneuploidien an den untersuchten Fällen: Bei den Arbeitsgruppen von Klinger et al. (1992) und Ward et al. (1993) traten in je 4% (21/526 bzw. 178/4500) der Proben Chromosomenanomalien auf. Lewin et al. (2000) beobachteten bei 27407 Fruchtwasserproben 4,04% (n=1139) zytogenetische Anomalien. Evans et al. (1999) stellten bei 146.128 Karyotypen 2,85% (n=4163) Anomalien fest. Morris et al. (1999) untersuchten für Chromosom 21 in 2 Serien 650 bzw. 1504 Fruchtwasserproben und für Chromosom 18 181 Proben, von denen 2,0% (n=13) bzw. 2,3% (n=35) bzw. 5,5% (n=10) aberrant waren. Bei Bink et al. (2000) war dies bei 36 (3,2%) von 1126 Fruchtwasserproben der Fall. Die Arbeitsgruppe von Eiben et al. (1998) hatte bei 904 Fruchtwasserproben eine Rate an zytogenetischen Auffälligkeiten von 8% (n=71) und später (Eiben et al. 1999b) bei 3150 erfolgreich durchgeführten FISH-Untersuchungen eine Rate von 5% (n=153). Weremowicz et al. (2001) untersuchten 911 Fälle, darunter 107 (11,8%) zytogenetisch auffällige. In 12,5% (n=650) der 5197 von Tepperberg et al. (2001) retrospektiv untersuchten Fälle waren aberrante Chromosomenkonstellationen vorhanden. Die Inzidenzen der einzelnen Aneuploidien betragen 2,8% für Trisomie 13, 3,8% für Aneuploidie 18, 3,5% für Trisomie 21, 1,2% für Monosomie X und 1,06% für andere gonosomale Aberrationen. Bei Ulmer et al. (2000) waren von 230 Fruchtwasserproben 40 (17,4%) auffällig. Cheong Leung et al. (2001) analysierten retrospektiv 309 FISH-Untersuchungen mit 63 (20,4%) klinisch relevanten Aberrationen. Bei Jalal et al. (1998) traten bei 41,5% (211/508) der, zum Teil kultivierten Fruchtwasserproben Chromosomenanomalien auf. Bei Bryndorf et al. (1997) waren von 2000 Fruchtwasserproben 40 (2%) und in einer späteren Studie (Bryndorf et al. 2000) von 276 Fruchtwasserproben 42 (15%) abnormal. Bei D`Alton et al. (1997) wiesen 28 von 315 Fruchtwasserproben (8,9%) eine zytogenetische Aberration auf. Einen Zusammenhang zwischen der Rate an Chromosomenanomalien und der Indikation zur Fruchtwasseruntersuchung beschrieben Eiben et al. (1998), Pergament et al. (2000) und Lewin et al. (2000). Bei erhöhtem mütterlichen Alter betrug das Risiko für eine Aberration 2% bzw. 3,5% bzw. 3,2%, bei pathologischem Serumscreening 1,7% bzw. 4% bzw. 2,68% und bei

auffälligem Ultraschallbefund >20% bzw. 16,7% bzw. 8,49% und 7,99% (Lewin et al. 2000) bei familiärer Belastung.

In der vorliegenden Arbeit wurden von 19 prinzipiell mit FISH für die Sonden 13, 18, 21 und XY erkennbaren numerischen Chromosomenaberrationen 15 (79%) tatsächlich mit dem pränatalen Schnelltest diagnostiziert. Im einzelnen waren dies: 5 Trisomie 21-Fälle, darunter eine Robertson-Translokation, 3 Trisomie 18-Fälle, 4 Fälle mit Triploidie, 2 Fälle mit Monosomie X und eine Fall mit dem Chromosomensatz 48, XXY, +21. Nicht diagnostiziert wurden aufgrund von fehlgeschlagener Hybridisierung 2 Fälle mit Trisomie 21 und ein Fall mit Trisomie 13 und aufgrund eines unauffälligen Signalmusters eine Trisomie 18.

Die Detektionsraten für die grundsätzlich mit dem Schnelltest erkennbaren Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21 und XY waren in der Literatur je nach Arbeitsgruppe unterschiedlich: Klinger et al. (1992) identifizierten bei 526 untersuchten Fruchtwasserproben alle 21 Aneuploidien korrekt. Ward et al. (1993) diagnostizierten 73,3% (107/146) der Anomalien. In den übrigen Fällen war der Befund falsch negativ (n=7) oder uninformativ (n=32). Tepperberg et al. (2001) detektierten 99,7% (570/572) der Aberrationen. Allerdings waren in 3 Fällen weniger als 60% aneuploide Kerne sichtbar. Cheong Leung et al. (2001) erhielten bei 92,6% (50/54) der Aneuploidien einen auffälligen Befund im Schnelltest, in 4 Fällen (6,3%) war das Ergebnis nicht informativ. Bink et al. (2000) deckten 89,7% (26/29) der aberranten Chromosomensätze auf. Ulmer et al. (2000) erkannten 97,1% (33/34) der Anomalien. Eiben et al. (1998) diagnostizierten 76,2% (48/63) der Aneuploidien im Schnelltest, 15 Befunde (23,8%) waren kontrollbedürftig. Später konnte diese Gruppe (Eiben et al. 1999b) den Anteil auf 83% (104/125) verbessern. In 21 Fällen (darunter 15 Mosaik) bestand zwar der Verdacht auf eine Aberration für die untersuchten Chromosomen, konnte aber mit einem kontrollbedürftigen Befund von 10-60% aneuploiden Kernen nicht zweifelsfrei belegt werden. Jalal et al. (1998) identifizierten 97,7% (43/44) der mit FISH erkennbaren pathologischen Chromosomensätze bei 310 unkultivierten Fruchtwasserproben. Ein Befund war nicht informativ. Evans et al. (1999) stellten für 146.128 Karyotypen nachträglich fest, daß 2889 (69,4%) der 4163 zytogenetischen Anomalien bei angenommener 100%iger Detektionseffizienz mit FISH aufgedeckt worden wären. Weremowicz et al. (2001) fand 84% (75/89) der Aneuploidien heraus. Bei 9 aberranten Fällen war der FISH-Befund unvollständig oder uneindeutig, in 5 Fällen war das Ergebnis falsch negativ. Bryndorf et al. (1997) erkannte nur 52% (13/25)

der Aberrationen. 8 Untersuchungen waren technisch erfolglos, 2 Fälle falsch negativ und in 2 Fällen waren nur 10-60% aneuploide Kerne vorhanden. Später konnte diese Forschungsgruppe (Bryndorf et al. 2000) 83% (29/35) mit Anomalien detektieren. Zwei Befunde waren falsch negativ und 4 uninformativ. Bei D`Alton et al. 1997 wurden 84% (21/25) der Aneuploidien mit FISH diagnostiziert, in den übrigen 4 Fällen war das Resultat nicht informativ.

Bei D`Alton et al. (1997) stammten 92% (23/25) mit FISH prinzipiell diagnostizierbaren Anomalien aus der Indikationsgruppe der auffälligen sonographischen Befunde. In der vorliegenden Arbeit waren dies 84% (16/19) der mit FISH erkennbaren Anomalien.

Den empfohlenen Grenzwerten (American College of Medical Genetics 1993; Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. 1998) gemäß galt das Ergebnis der FISH-Untersuchung als auffällig, wenn mehr als 60% der Kerne das gleiche aberrante Signalmuster zeigten. Für Chromosom 21 waren dies hier durchschnittlich 79% (57-93%), für Chromosom 18 80% (61-91%), für Chromosom 13 81% (64-100%), für Chromosom X 87% (71-100%) und für Chromosom Y 96% (88-100%) der jeweils auswertbaren Kerne. Die Arbeitsgruppe von Klinger et al. (1992) beobachtete bei den disomen Fällen durchschnittlich knapp 90% 2signalige Kerne und bei den aneuploiden Fällen 42-88% 3signalige Kerne. Philip et al. (1994) untersuchten 638 Fruchtwasserproben und 757 Chorionzottenbiopsien. In den disomen Fällen zeigten 68-100% der Kernen 2 Signale, während in trisomen Fällen 66-94% der Kernen 3 Signale aufweisen. Bei Ward et al. (1993) zeigten bei den gonosomalen Aberrationen durchschnittlich 96% (45,X), 90% (47,XXX) bzw. 76% (47,XXY oder 69,XXY) das entsprechende Signalmuster. Bei den autosomalen Trisomien waren in mehr als 50% der Kerne 3 Signale vorhanden. Bei Spathas et al. (1994) waren in 6 Fällen von Trisomie 21 durchschnittlich 81,7% (72,1-82,6%) aberrante Kerne zu sehen. Morris et al. (1999) fanden bei Euploidie für Chromosom 21 in 91 bzw. 92% der Kerne 2 Signale, bei Aneuploidie in 79 bzw. 80% der Kerne 3 Signale. Für Chromosom 18 waren bei unauffälligem Chromosomensatz in 94% der Kerne 2 Signale, bei aberrantem 78% der Kerne 3 Signale zu sehen. Pierluigi et al. (1996) untersuchten 50 Fälle mit einer Cosmid-Sonde für Chromosom 21. In 2 Fällen mit Trisomie 21 wiesen 72 bzw. 80% der Kerne 3 Signale auf. Ulmer et al. (2000) zeigten durchschnittlich 89% der Kerne bei Aneuploidien aberrante Signale. In der Arbeitsgruppe von Eiben et al. (1998) waren bei den trisomen Fällen für Chromosom 21 84% der Kerne 3signalig und für Chromosom 18 82% der Kerne. 11 bzw. 13% zeigten 2 Signale. Jalal et

al. (1998) beobachteten bei den Trisomien einen durchschnittlichen Anteil 3signaliger Kerne von 97% für Chromosom 13, 91% für Chromosom 18 und 93,5% für Chromosom 21. Pergament et al. (2000) konnte 84% der Chromosomenanomalien detektieren mit durchschnittlich 96% aneuploiden Kernen im Schnelltest. Bei Bryndorf et al. (1997) waren in klaren aneuploiden Fruchtwasserproben für die Autosomen durchschnittlich 74% der Kerne aberrant.

### **4.3. Problematische FISH-Befunde**

#### **4.3.1. Zu wenig auswertbare Kerne**

Lediglich in 20% der in dieser Arbeit dargestellten Fälle waren für alle hybridisierten Sonden 50 Kerne auswertbar. In 38% der Fälle waren für eine, mehrere oder alle Sonden 10-49 Kerne analysierbar und in 13% der Fälle weniger als 10 Kerne. Ursache dafür waren zum Teil zellarmes Fruchtwasser, v.a. aus frühen Schwangerschaftswochen, oder eine niedrige Signalintensität. Oft blieb unklar, warum bei ausreichend vorhandenem Zellmaterial in zu wenigen Kernen Signale sichtbar waren. Die geringere Kernzahl beeinflusste die Qualität der Ergebnisse: In über der Hälfte (58%) der Hybridisierungen bei pathologischem FISH-Befund waren weniger als 50 Kerne auswertbar, in diesen Fällen zeigten durchschnittlich 81% der Kerne das aberrante Signalbild, in den Fällen mit mindestens 50 auswertbaren Kernen dagegen 86%. Kontrollbedürftige FISH-Befunde traten nur in Fällen mit weniger als 50 auswertbaren Kernen für mindestens eine Sonde auf. Eiben et al. (1998) werteten bei 798 (88%) von 904 FISH-Untersuchungen mindestens 50 Kerne und bei 71 (8%) der Untersuchungen mindestens 10-49 Kerne je Sonde aus. In der letztgenannten Gruppe waren auch 2 Fälle mit Monosomie X und ein Fall 47,+21. Morris et al. (1999) konnten in 99,9% von 1504 Hybridisierungen für Chromosom 21 50 Kerne analysieren. Bei D`Alton et al. (1997) war die zweithäufigste Ursache für ein nichtinformatives Ergebnis eine zu geringe Kernzahl (n=11; 3,6% von 304 Fällen). Jalal et al. (1998) hatten in 2 (0,6%) von 310 Fällen ein uninformatives Ergebnis. In einem dieser Fälle waren zu wenig analysierbare Kerne vorhanden, dabei zeigten alle 5 Kerne für Chromosom 21 3 Signale. Eine Trisomie 21 wurde bei der Karyotypisierung bestätigt. Weremowicz et al. (2001) konnten wegen ungenügender Kernzahl eine von 89

mit dem Schnelltest detektierbaren Aneuploidien nicht erkennen. Bryndorf et al. konnten 1997 in 19% aller technisch erfolgreichen Hybridisierungen von 2000 Fruchtwasserproben und in 25% der Hybridisierungen bei Aneuploidie nur weniger als 50 Kerne auswerten. In einer späteren Veröffentlichung (Bryndorf et al. 2000) war dies bei 13% der Hybridisierungen von 279 Fruchtwasserproben der Fall. Dadurch wurden zwei Befunde bei aneuploidem Karyotyp als uninformativ eingestuft. Bei Cheong Leung et al. (2001) waren 5% der Untersuchungen (15/309), darunter 4 Aneuploidien, uneindeutig mit zu wenig auswertbaren Kernen oder zu schwachen Signalen. Ward et al. (1993) standen in 2,3% von 4500 FISH-Untersuchungen nicht genügend auswertbare Kerne zur Verfügung, davon waren 6 Fälle mit Aneuploidie (4,1% der mit FISH erkennbaren Aberrationen) betroffen.

#### **4.3.2. Fehlende Hybridisierung**

In 26% (33/129) der hier aufgearbeiteten Fälle blieb die FISH-Untersuchung ganz oder teilweise ohne Ergebnis. In 20 Fällen waren eine oder mehrere der hybridisierten Sonden betroffen, in 13 Fällen alle. In einem Fall betrug die Hybridisierungsdauer nur 2 Stunden, einem Fall war das Material Hygromflüssigkeit, von der nur wenige mononukleäre Zellen die Denaturierung überstanden. In einigen Fällen war zu wenig Material zur Auswertung vorhanden. Oft war die Hybridisierung ohne erkennbare Ursache fehlgeschlagen, sodaß in den zwar vorhandenen, manchmal auffällig gequollenen Zellen keine Signale erkennbar waren. Wenn für einige der Sonden Signale zu sehen waren, waren diese oft schwach ausgeprägt. Aufgrund von fehlgeschlagener Hybridisierung konnten 2 Trisomien 21 und eine Trisomie 13 nicht mit FISH diagnostiziert werden.

Bei Ward et al. (1993) waren 2,8% von 4500 FISH-Analysen aufgrund von technischen Problemen erfolglos. Darunter befanden sich 2 Fälle mit Aneuploidie, die wegen fehlender Hybridisierung von nichtbetroffenen Sonden als uninformativ eingestuft wurden. Bei Morris et al. (1999) blieben von 2154 Hybridisierungen für Chromosom 21 9 (0,42%) ohne Ergebnis, für diese Fälle wurde die Untersuchung wiederholt. Bink et al. (2000) konnten wegen fehlenden Signalen eine Trisomie 18 nicht diagnostizieren. Bei Eiben et al. (1998) traten 4% (35/904) fehlgeschlagene Hybridisierungen auf, davon war eine Trisomie 21 betroffen. Auch 1999 lag bei Eiben et al. (1999b) die Rate an Fällen mit fehlgeschlagener Hybridisierung oder zu wenig auswertbaren Kernen (die beiden Gruppen wurden nicht getrennt dargestellt) bei 4% (130/3280), allerdings bei einem Grenzwert von

nur noch mindestens 30 auswertbaren Kernen. D'Alton et al. (1997) hatten bei 2 von 304 (0,7%) Hybridisierungen technische Schwierigkeiten. Bei Weremowicz et al. (2001) erbrachte der Schnelltest bei 18 (2%) von 804 unauffälligen Karyotypen nur einen inkompletten Befund. Bei Bryndorf et al. führten 1997 33% der Hybridisierungen bei aneuploidem und 7% der Hybridisierungen bei euploidem Chromosomensatz zu keinem Ergebnis. In einer weiteren Studie waren bei den gleichen Autoren (Bryndorf et al. 2000) noch 2% der Hybridisierungen von 276 unkultivierten Furchtwasserproben erfolglos. Aufgrund von technischem Versagen wurde ein gonosomales Mosaik nicht identifiziert. Lebo et al. (1992) bekamen mit der kombinierten 13/21-Repeat-Sonde bei 22 von 100 unkultivierten Fruchtwasserproben kein verwertbares Ergebnis, während für die Chromosomen 18, X und Y alle Hybridisierungen erfolgreich waren. Ulmer et al. (2000) hatten 12 nichtinformativ Fälle (5,2%) bei 230 untersuchten Proben. Ursachen waren zu wenig signalgebende Kerne oder technisches Versagen. Davon war eine Mosaiktrisomie 21 betroffen. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, daß bei zunehmender Erfahrung die Versagerquote reduziert werden konnte: Während bei den ersten 100 Untersuchungen der Anteil nicht informativer und wenig abgesicherter Ergebnisse 13% für die Chromosomen 18, X und Y und 22% für die Chromosomen 13 und 21 betrug, reduzierte er sich bei den folgenden 130 In-situ-Hybridisierungen auf 3 bzw. 5,4%. Auch Bryndorf et al. (2000) stellten fest, daß die Verbesserung seiner Ergebnisse mit dem pränatalen Schnelltest gegenüber den früheren Daten auf der gestiegenen Laborerfahrung beruhe. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die ersten 129 FISH-Untersuchungen, die in diesem Institut durchgeführt wurden. Die beschriebene Lernkurve könnte eine Ursache für die bei den vorliegenden Daten beobachtete hohe Rate an Befunden mit zu wenig auswertbaren Kernen, uneindeutiger Signalverteilung oder fehlgeschlagener Hybridisierung sein.

#### **4.3.3. Kontrollbedürftige FISH-Befunde mit 10-60% aneuploiden Kernen**

In 22% (28/129) der hier dargestellten FISH-Untersuchungen war das Ergebnis für mindestens ein Chromosom mit einem Prozentsatz an aneuploiden Kernen von 10-60% uneindeutig und kontrollbedürftig. Häufig traten zusätzliche Probleme auf, wie schwache, diffuse, gespaltene oder kreuzhybridisierte Signale, geringe Zellzahl oder Verdacht auf maternale Zellkontamination. Die Karyotypisierung ergab letztlich immer einen unauffälligen Befund. Zudem waren in einem Fall mit Triploidie für Chromosom 21 die Kerne

nur in 57% 3-signalig, für die anderen Chromosomen aber in 64-86%, sodaß trotzdem die richtige Diagnose gestellt wurde. Philip et al. (1994) stellte in seinem Review fest, daß in bis zu 20% der Fälle die Auszählungsergebnisse uneindeutig waren. Bei Bink et al. (2000) waren im Falle einer Trisomie 21 bei fraglicher maternaler Zellkontamination nur 24% 3signalige Kerne vorhanden. Außerdem waren 28 Hybridisierungen mit unauffälligem zytogenetischen Befund kontrollbedürftig, dabei bestand in 22 Fällen der letztendlich nicht bestätigte Verdacht auf ein Turner-Syndrom. In 17 Fällen lag dem ein Versagen der Sonde für das Y-Chromosom zugrunde. Insgesamt waren 2,6% (29/1126) der FISH-Untersuchungen dieser Forschungsgruppe kontrollbedürftig. Ulmer et al. (2000) beobachteten bei einer numerischen Chromosomenaberration nur 26% aneuploide Kerne wegen maternaler Zellekontamination und bei den unauffälligen Karyotypen für Chromosom 18 in 2 Fällen und für Chromosom 21 in 5 Fällen 10-20% aneuploidsignalige Kerne. Bei Eiben et al. (1998) gab es 29 Fälle (3,2% von 904 erfolgreichen Hybridisierungen) mit kontrollbedürftigem FISH-Befund. Davon hatten 15 Fälle in der konventionellen Chromosomenanalyse ein pathologisches und 14 Fälle ein unauffälliges Ergebnis. Später waren (Eiben et al. 1999b) 56 von 3150 erfolgreichen Hybridisierungen (1,8%) kontrollbedürftig, bei 21 dieser Fälle war der zytogenetische Befund aberrant, bei 35 unauffällig. Bei D`Alton et al. (1997) hatten 3 von 304 (1%) Hybridisierungen ein uneindeutiges Resultat, davon waren auch eine Triploidie und eine Trisomie 13 betroffen. Weremowicz et al. (2001) bekam bei 8 (9%) von 89 mit FISH detektierbaren Aneuploidien ein uneindeutiges Ergebnis mit weniger als 70% (entsprechend dem Grenzwert dieser Studie) aberrantsignaligen Kernen. In der Karyotypisierung ergaben sich in einem Fall eine Mosaiktrisomie und für die übrigen Fälle komplette Trisomien. Bei Klinger et al. (1992) traten bei 6 disomen Proben 23-42% aberrante Zellen auf. Pierluigi et al. (1996) konnten in einem Fall mit Trisomie 21 nur 17% 3signalige Kerne finden. Bei Ward et al. (1993) war das Ergebnis in 0,9% von 4500 FISH-Analysen uneindeutig, davon waren auch 20 letztendlich aneuploide Proben betroffen (13,7% der mit FISH erkennbaren Anomalien).

Bei D`Alton et al. (1997) waren 16,5% (50/304) der durchgeführten FISH-Untersuchungen nicht informativ. Die Rate war für die unterschiedlichen Indikationsgruppen ähnlich (15,2-17,0%). Philip et al. (1994) analysierte in seinem Review über 10.000 Fälle und kam auf einen durchschnittlichen Anteil uninformativer Untersuchungen von 10%. Er war bei den letztendlich auffälligen Proben größer als bei den unauffälligen.

Auch Klinger et al. (1992) beobachtete eine etwas geringere Hybridisierungseffizienz bei trisomen Fällen und stellte fest, daß jede Verminderung der Hybridisierungseffizienz einen dramatischen Effekt auf den Anteil 3- vs. 2signaliger Kerne in diesen Fällen hat. Ebenso machten bei Ward et al. (1993) die uninformativen Proben bei den Aberrationen 21,8% aus, bei allen Befunden aber nur 9,8%.

#### **4.3.4. FISH bei Chromosomenmosaikern**

Zur Möglichkeit, chromosomale Mosaikern mit FISH zu erkennen gibt es in der Literatur unterschiedliche Erfahrungen. Von 10 Mosaikfällen wiesen bei Eiben et al. (1998) im Schnelltest 8 die gleiche Mosaikverteilung wie in der Karyotypisierung auf. Bryndorf et al. (2000) erhielten in 2 Fällen mit Mosaikbefund in der konventionellen Karyotypisierung einen falsch negativen Befund. Bei 2 informativen und als mit FISH als auffällig eingestuft Mosaikern bestand keine direkte Korrelation zwischen dem Anteil aberranter Zellen im Schnelltest und in der Karyotypisierung. Dagegen glich sich bei Mercier and Bresson (1995) die Verteilung der Zelllinien bei Mosaikbefunden in der FISH-Analyse und der Metaphasenanalyse. Nach der Meinung von Schwartz and Leana-Cox (1993) ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur primären Mosaikdiagnose nicht geeignet, kann aber bei Kontrolluntersuchungen von Interphase- oder Metaphasechromosomen wertvolle Informationen zur Differenzierung von echten (0,25% der Fruchtwasserproben) oder Pseudomosaikern (bis zu 7% der Proben) beisteuern. Van Opstal et al. (2001) führte bei 79 unklaren Ergebnissen in einer ersten konventionellen Analyse eine Nachuntersuchung von unkultivierten Amniozyten mit FISH durch. Er kam zu dem Schluß, daß dies eine zuverlässige Methode zur Unterscheidung von echten Mosaikern und Pseudomosaikern bzw. auf die Plazenta beschränkten Mosaikern sei, da hier kein kulturinduzierten Selektionsmechanismen zur Wirkung kämen. Allerdings könnten gewebebeschränkte Mosaikern der Untersuchung unkultivierter Zellen entgehen, wenn der Anteil an Zellen der relevanten Organsysteme an der Gesamtzellzahl im Fruchtwasser gering sei. Feldman et al. (2000) untersuchte 7 Fälle mit ursprünglichem Mosaikverdacht mit FISH an unkultivierten Amniozyten und konventioneller Fruchtwasseranalyse nach. Der Schnelltest war in allen Fällen informativ und übereinstimmend mit der Zytogenetik. In 6 Fällen wurde der Mosaikbefund widerlegt, in einem Fall bestätigt. Bei hohen cutoff-Werten von 85-95%

hielt der Autor deshalb die In-situ-Hybridisierung für ein geeignetes Kontrollinstrument bei Mosaikverdacht.

#### **4.4. Diskrepante FISH-Befunde**

##### **4.4.1. Falsch negative FISH-Befunde**

Bei einer hier dargestellten zytogenetischen Trisomie 18 zeigte die In-situ-Hybridisierung bei 20 auswertbaren Kernen ein falsch negatives Ergebnis mit 90% diploiden Kernen und 5% 3signaligen Kernen. Als Erklärung dafür wurde maternale Zellkontamination in Betracht gezogen, ohne dies bei unbekannter Fruchtwasserfarbe und weiblichem Chromosomensatz endgültig belegen zu können. Andererseits waren in der, wegen langsamen Zellwachstums 4wöchigen Zellkultur auffällig wenige verschiedene Zellklone vorhanden. Ein In-vitro-Entstehung des pathologischen Zellklons konnte deshalb nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da die zur Fruchtwasseruntersuchung führende sonographische Auffälligkeit (verdickte Nackenfalte) weiterbestand, wurde das Vorliegen einer Trisomie 18 aber für wahrscheinlicher gehalten. Bei Bink et al. (2000) trat ebenfalls bei einer Trisomie 18 ein falsch negativer Befund mit 2 Signalen in allen untersuchten Zellkernen auf. Ein Hybridisierungsartefakt wurde ausgeschlossen. Bei klarem Fruchtwasser und weiblichen Chromosomensatz konnte eine maternale Zellkontamination nicht belegt werden, so daß die Ursache für das diskrepante Ergebnis unklar bleibt. Nach über 3200 korrekten FISH-Ergebnissen trat auch bei Eiben et al. (1999a) ein falsch negativer Befund auf: Bei einer 32jährigen Schwangeren waren nach 13+5 Schwangerschaftswochen wegen Auffälligkeiten bei der fetalen Ultraschalluntersuchung 8 ml klaren Fruchtwassers entnommen worden. 100 ausgewertete Kerne zeigten zu 90% 2 Signale und 8% der Kerne 1 Signal für das X-Chromosom. Bei der konventionellen Chromosomenanalyse lag dagegen in 100 untersuchten Metaphasen der Chromosomensatz 45, X vor. Eine FISH-Untersuchung der Metaphasen ergab in 85% von 100 Zellen 1 Signal und in 10% 2 Signale für das weibliche Geschlechtschromosom. Erklärt wurde dieser Befund durch einen hohen Anteil extra-embryonischer Zellen im unkultivierten Fruchtwasser, die in der Kultur einen Wachstumsvorteil hatten. Weremowicz et al. (2001) bekam bei 5 von 89 (6%) mit FISH erkennbaren Chromosomenaberrationen einen falsch negativen Befund. Bei einer Trisomie 18

mit Verdacht auf maternale Zellkontamination zeigten von 42 Kernen 83,3% 2 Signale. Bei einer weiteren Trisomie 18 wiesen 87,4% von 32 Kernen 2 Signale auf. In wenigen Kernen gab es ein sehr kleines zusätzliches Signal, das als Hintergrundsignal interpretiert wurde. Die FISH-Untersuchung der kultivierten Interphase- und Metaphasechromosomen zeigte eines der Signale durchgehend sehr schwach und eine wesentliche Kernzahl mit nur 2 Signalen, was für eine niedrige copy number der Repeatsequenz sprach. Im Falle einer Trisomie 21 waren in 65% der 94 analysierten Kernen 2 Signale zu sehen. Es bestand der Verdacht auf reduzierte Hybridisierungseffizienz der Sonde und technische Probleme durch viel Zytoplasma und starke Hintergrundfluoreszenz. Bei einer Trisomie 21 waren in 88% von 33 untersuchten Kernen 2 Signale sichtbar. Als Erklärung wurde vermutet, daß entweder eine schlechte Zellmorphologie die ungenügende Aufdeckung des 3. Signals verursacht hatte oder daß eine maternale Zellkontamination vorlag. Bei einer weiteren Trisomie 21 waren in 86,7% von 30 Kernen 2 Signale vorhanden. Wie im vorhergehenden Fall wurden eine schlechte Zellmorphologie mit granulärem Signal oder eine maternale Zellkontamination als Erklärung herangezogen. Cacheux et al. (1994) hatte mit der 13/21-repeat-Sonde, die nicht zwischen den Chromosomen 13 und 21 differenziert, je 2 falsch negative Trisomie 13- und 21-Befunde. Ursache waren technische Schwierigkeiten mit Variationen von Signalintensität und Anzahl der Hybridisierungsdomänen. Spathas et al. (1994) übersah wegen schlechter Hybridisierungs-Detektionseffizienz eine unbalanzierte Translokationstrisomie 21. Bei Bryndorf et al. (1997) war eine Trisomie 21 mit nur 2% trisomen Kernen bei V.a. mütterliche Zellkontamination im Schnelltest falsch negativ. Bei einer zytogenetischen Konstellation 47,XXY waren keine aberranten Zellen zu sehen, entweder aufgrund von maternaler Zellkontamination oder wegen Versagens der Y-Sonde. Verlinsky et al. (1995) beobachtete 3 falsch negative Trisomie 21-Befunde wegen möglicher Polymorphismen der Zielregion oder unzureichender Hybridisierung. Windsor et al. (1999) hatte einen falsch negativen gonosomalen Befund ebenfalls wegen eines perizentromerischen Heteromorphismus. Tepperberg et al. (2001) hatte unter 5197 von ihm retrospektiv ausgewerteten FISH-Analysen aus 25 zytogenetischen Labors eine falsch negative Trisomie 18 mit diploiden Signalen in über 90% der Interphasekerne. In der FISH-Analyse der Metaphasen war das dritte Signal sehr schwach ausgeprägt, was für einen Polymorphismus der Zentromerregion von Chromosom 18 spricht. Bei einer im FISH als unauffällig beurteilten Trisomie 13 waren ebenfalls in über 90% der Kerne 2 kräftige Signale zu sehen gewesen. Bei einer FISH-Untersuchung an kultivierten

Interphase- und Metaphasechromosomen war ein deutlich kleineres drittes Signal sichtbar. Es handelt sich hiermit um den ersten Bericht eines Signalverlustes bei lokusspezifischen Sonden. Als Ursache wurde eine Deletion des in der Zielsequenz der Sonde liegenden Retinoblastomgens und angrenzender Sequenzen, ein Rekombinationsereignis oder aber ein niedriggradiges Mosaik in Erwägung gezogen. Eine maternale Zellkontamination konnte bei dem männlichen Feten ausgeschlossen werden. Estabrooks et al. (1999b) analysierten 10.000 Fälle, die mit den Sonden der Firma Vysis hybridisiert wurden. Es waren je ein falsch negativer Befund einer Trisomie 18 bzw. 21 wegen maternaler Zellkontamination aufgetreten und ein falsch negatives Ergebnis bei einer Trisomie 13 aufgrund von schlechter Hybridisierung und maternaler Zellkontamination. Seres-Santamaria et al. (1993) diagnostizierte bei 4 Fällen von Trisomie 21 wegen perizentromerischer Deletion der Zielsequenz im Schnelltest fälschlicherweise einen euploiden Chromosomensatz. Bei Ward et al. (1993) verursachten starke Hintergrundfluoreszenz sowie Autofluoreszenz der Mikroskoplinse falsch negative Befunde bei einer Trisomie 18 und 2 Trisomien 21. In 3 Fällen wurde eine Trisomie 21 bei weiblichem Feten wegen unentdeckter Kontamination mit maternalen Zellen nicht diagnostiziert. Ein falsch negatives Ergebnis bei Trisomie 13 beruhte eventuell auf schlechter Hybridisierungseffizienz der Sonde.

#### **4.4.2. Falsch positive FISH-Befunde**

Bei den hier dargestellten FISH-Untersuchungen traten keine falsch positiven FISH-Befunde auf. Bei Weremowicz et al. (2001) ergab FISH bei einem (0,1%) von 804 unauffälligen Karyotypen mit 81% 3signaligen Kernen den falsch positiven Befund einer Trisomie 21. Nach Reamniozentese bei erfolgloser erster Zellkultur wurde in der Karyotypisierung ein unauffälliger weiblicher Chromosomensatz gefunden. Eine FISH-Untersuchung der kultivierten Zellen ergab in 93% der Kerne 2 Signale. Da ein Laborfehler oder eine schlechte Probenperformance ausgeschlossen werden konnten, wurde als Erklärung ein sich auflösender fetal sac, z.B. eines vanishing twin, favorisiert. Ein geringgradiges fetales Mosaik oder ein Plazentamosaik konnten aber nicht endgültig ausgeschlossen werden. Von Bryndorf et al. (1996) wurde der falsch positive Befund einer Monosomie X gestellt. Ursache war eine vom Vater ererbte, für die Detektion zu kleine, Zielsequenz auf dem X-Chromosom. Mercier and Bresson (1995) hatte ebenfalls einen

falsch positiven Befund einer Monosomie X durch eine strukturelle Abweichung des Y-Chromosoms (46,X,derYp). Strovel et al. (1992) und Verlinsky et al. (1995) erhielten wegen Kreuzhybridisierung der 13/21-Repeat-Sonde auf ein Chromosom 22 jeweils einen falsch positiven Trisomie 21-Befund. Bei der Untersuchung der Mutter eines Feten trat ebenfalls ein weiteres Signal an Chromosom 22 auf, was für das Vorliegen eines ererbten Polymorphismus sprach. Lapidot-Lifson et al. (1996) beobachtete eine Kreuzhybridisierung der 13/21-Repeat-Sonde auf ein Chromosom 14. Es waren 6 Signale für diese Sonde zu sehen. Dadurch entstand der Verdacht auf ein jeweils dreifaches Vorliegen von Chromosom 13 und 21. Die Karyotypisierung ergab den Chromosomensatz 47,+21. Windsor et al. (1999) diagnostizierte fälschlicherweise aufgrund einer Kreuzhybridisierung der X-Sonde (Vysis) auf Chromosom 19 die Konstellation 47,XXY. Ward et al. (1993) hatte ein falsch positives Ergebnis mit der Konstellation 45,X, da die Y-Sonde unzureichend hybridisierte. Tepperberg et al. (2001) bekam bei 5197 von ihm retrospektiv ausgewerteten FISH-Analysen ebenfalls ein falsch positives Ergebnis für Monosomie X. Da das Signal für das Y-Chromosom bei einer nachfolgenden FISH-Untersuchung der kultivierten Fruchtwasserzellen sehr klein war, wird als Ursache eine niedrige Kopienzahl der Y- $\alpha$ -Satelliten-DNA vermutet.

#### **4.4.3. Mit FISH nicht detektierbare Aberrationen**

Claussen et al. (1993) beschreiben, daß bei der Abklärung von Fehlbildungen oder Wachstumsretardierung des Feten in 15-20% mit einer Chromosomenaberration gerechnet werden muß, wovon ca. 12-17% nicht mittels FISH diagnostiziert werden können. Vom American College of Medical Genetics (2000) werden 30-33% der zytogenetischen Anomalien für nicht mit FISH detektierbar gehalten. In der Literatur waren z.B. bei Tepperberg et al. (2001) 12% (78/650), bei Cheong Leung et al. (2001) 14% (9/63), bei Eiben et al. (1998) 11% (8/71), bei Eiben et al. 1999b 18% (28/153), bei Lewin et al. (2000) 28,27% (322/1139), bei Evans et al. (1999) 30,6% (1274/4163), bei Weremowicz et al. (2001) 17% (18/107), Bryndorf et al. (1997) 30% (12/40), bei Bryndorf et al. (2000) 17% (7/42) und bei D`Alton et al. (1997) 10,7% (3/28) der in der Metaphasenanalyse gefundenen Chromosomenaberrationen nicht mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY erkennbar.. In der vorliegenden Arbeit lagen in 5 Fällen (21% der Fälle mit pathologischem Karyotyp) strukturelle Chromoso-

menaberrationen vor. In der Untersuchung von Bink et al. (2000) hatten 7 von 36 zytogenetischen Anomalien (19,4%) eine strukturelle Aberration, wovon 5 familiär und ohne klinische Bedeutung waren. Bei zweien war mit möglichen klinischen Auffälligkeiten beim Feten zu rechnen. Ward et al. (1993) stufte 32 (18%) von 178 Aberrationen als nicht mit FISH erkennbar ein. Dies waren im einzelnen 16 hereditäre und 8 de novo entstandene strukturelle Aberrationen, 2 autosomalen Mosaik von mit FISH nicht untersuchten Chromosomen, 2 niedriggradige gonosomale Mosaik, die mit FISH als unauffällig klassifiziert wurden und 4 Mosaik, für die das Ergebnis des Schnelltests uneindeutig war. Ulmer et al. (2000) hatte unter insgesamt 40 zytogenetischen Chromosomenanomalien 6 (15%) Mosaiktrisomien und strukturelle Aberrationen, die nicht mittels FISH zu diagnostizieren waren. Pergament et al. (2000) hatte unter 2335 Fruchtwasserproben und Chorionzottenbiopsien 16 (0,7%) mit FISH nicht erkennbare Chromosomenanomalien, nämlich 13 strukturelle Aberrationen, 2 numerische Aberrationen für andere als die im Schnelltest untersuchten Chromosomen und ein Plazentamosaik.

Lewin et al. (2000) stellten unterschiedliche Häufigkeiten nichterkennbarer Aberrationen (insgesamt 28,09%) in den verschiedenen Indikationsgruppen fest. Der Anteil lag in der Gruppe der sonographischen Auffälligkeiten bei 21,32%, bei positivem Serumscreening bei 29,63%, bei erhöhtem Altersrisiko (>38 Jahre) bei 23,80% und bei familiärer Belastung bei 74,60%. Nach Bink et al. (2000) und Pergament et al. (2000) bestand bei erfolgreichem und unauffälligem FISH folgendes Restrisiko für eine relevante Anomalie des Feten: 1:549 bzw. 1:265 bei erhöhtem Alter der Mutter, 1:56 bzw. 1:43 bei sonographischen Auffälligkeiten und 1:80 bei auffälligem Triple-Test.

#### **4.4.4. Die Sensitivität von FISH**

Läßt man die problematischen FISH-Befunde mit 10-60% aneuploiden Kernen und die Fälle mit fehlgeschlagener Hybridisierung außer acht und berücksichtigt alle als auffällig bzw. unauffällig gewerteten Ergebnisse, auch solche mit weniger als 50 auswertbaren Kernen, ergibt sich für die dargestellten FISH-Ergebnisse eine Sensitivität von 71% für alle aufgetretenen Anomalien und von 94% für die mit FISH erkennbaren Anomalien. Die Arbeitsgruppe von Bryndorf et al. (2000) führte 463 FISH-Untersuchungen an unkultivierten Fruchtwasserproben, Chorionzottenbiopsien, fetalen und postnatalen Blutproben

durch. Die Sensitivität bei 392 informativen Untersuchungen betrug für die mit FISH untersuchten Anomalien 94% und für alle vorkommenden Anomalien 76%. In den Fruchtwasserproben allein wurden 82% der gestesteten Aberrationen detektiert. Nach Tepperberg et al. (2001) lag bei 1379 Fällen der multizentrischen klinischen Studie, die zur FDA-Zulassung der Sonden der Firma Vysis führten, die Sensitivität bei 99,9% und eine retrospektive Studie über 5197 Fälle bei 99,6%. Für diese und 22.463 weitere mit den Vysis-Sonden durchgeführten FISH-Analysen aus der Literatur betrug die falsch negativ Rate 0,024% (7/29039). Außerdem stellten diese Autoren 18.275 mit anderen als den Vysis-Sonden durchgeführte FISH-Analysen dar. Für diese Fälle ergab sich eine falsch negativ Rate von 0,088% (16/18275) und eine Sensitivität von 96,9%. Eine Sensitivität von 100% erreichten Morris et al. (1999) für 1502 informative Fälle, die für Chromosom 21 hybridisiert wurden, D'Alton et al. (1997) für 254 informative Proben und Jalal et al. (1998) für 508 informative Proben. Ebenso hatte die Arbeitsgruppe von Eiben (Eiben et al. 1999b; Eiben et al. 1998) für über 3200 unkultivierten Fruchtwasserproben vor Auftreten des ersten falsch negativen Befundes (Eiben et al. 1999a) eine Sensitivität von 100%. Ward et al. (1993) erlangten für die Autosomen 92,6%, für die Gonosomen 100% und für alle informativen aneuploiden Proben 93,9% Sensitivität. Bei Weremowicz et al. (2001) betrug die Sensitivität bei 844 informativen Fällen für alle detektierbaren Aneuploidien 94% und für die autosomalen Aneuploidien 93,1%. Cacheux et al. (1994) erreichte mit der 13/21-Repeat-Sonde bei 111 informativen Fällen eine Sensitivität von 60% für die mit FISH getesteten Anomalien. Das American College of Medical Genetics (2000) stellte fest, daß FISH für die älteren Individuen der gescreenten Population die größte klinische Sensitivität und den größten Nutzen hat, während bei jüngeren Individuen der Anteil an zytogenetisch normalen und nichtaneuploiden Resultaten steigt. Die Sensitivität für die Detektion von Anomalien, die wahrscheinlich oder sicher mit Auffälligkeiten beim Lebendgeborenen assoziiert sind, betrug demnach bei der Indikationsgruppe Altersrisiko 80% und war geringer bei den Indikationen auffälliger Ultraschallbefund bzw. Serumscreening. Lewin et al. (2000) erreichte insgesamt eine Sensitivität von 71,1% und nach Indikationsgruppen aufgeteilt eine Sensitivität von 76,3% bei erhöhtem Altersrisiko, von 78,7% bei sonographischen Auffälligkeiten und von 70,4% bei positivem Serumscreening.

#### **4.4.5. Die Spezifität von FISH**

Ohne Berücksichtigung der uninformativen Fälle mit uneindeutigen Hybridisierungsergebnissen oder fehlgeschlagener Hybridisierung ergibt sich für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Spezifität von 100%. Ebenfalls 100% Spezifität bei der Untersuchung unkultivierter Fruchtwasserproben erreichten Morris et al. (1999) in 1502 informativen Fällen für Chromosom 21, Eiben et al. (1998, 1999b) in über 3200 analysierten Fällen, D'Alton et al. (1997) für 254 informative Proben, Jalal et al. (1998) für 508 informative Proben sowie Cacheux et al. (1994) für 116 Proben. Bryndorf et al. (2000) führten 463 FISH-Untersuchungen an unterschiedlichen Materialien (darunter 276 unkultivierte Fruchtwasserproben) mit 100%iger Spezifität durch. Weremowicz et al. (2001) kam mit einem falsch positiven und 785 richtig negativen Befunden auf eine Spezifität von 99,9%. Die Studie von Ward et al. (1993) erbrachte für die Autosomen 100%, für die Gonosomen 99,9% Spezifität. Nach Tepperberg et al. (2001) betrug die Spezifität für 1379 Fälle aus der klinischen Studie für die Vysis-Sonden und für 5197 informative retrospektiv ausgewertete Fälle insgesamt 99,98% (99,98% für Monosomie X, 100% für Trisomie 13, 18, 21 und die übrigen gonosomalen Aberrationen). Für 18.275 nicht mit Vysis-Sonden durchgeführte FISH-Untersuchungen aus der Literatur ergab sich eine Spezifität von 99,96%.

## 5. Zusammenfassung

Die In-situ-Hybridisierung von Metaphase- und Interphasechromosomen hat in viele Gebiete der modernen Medizin und Biologie, z.B. Grundlagenforschung oder Tumorbilogie, Einzug gehalten. Ein wichtiges Anwendungsfeld hat diese Technik in der pränatalen Diagnostik gefunden. An kultivierten Interphasekernen sowie Metaphasechromosomen eingesetzt kann sie wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Chromosomensonden können auf native Fruchtwasserzellen, Chorionzottenzellen und fetale Blutzellen hybridisiert werden. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von unkultivierten Amniozyten wird seit einigen Jahren bei bestimmten Indikationen ergänzend zur herkömmlichen Chromosomenanalyse durchgeführt. Nach der Hybridisierung werden die Anteile der Zellkerne mit disomen (2 Signale für ein Autosom bzw. ein X- und ein Y-Signal für die Gonosomen) und aberranten (z.B. 3 Signale bei Trisomie) Signalen festgestellt. Dafür sind mindestens 50 Kernen nötig. Bei weniger als 10% aneuploiden Kernen wird das Ergebnis als unauffällig gewertet, bei mehr als 60% aneuploiden Kernen als auffällig und dazwischen als uneindeutig bzw. kontrollbedürftig. Die konventionelle Chromosomenanalyse erfordert eine in der Regel 2-3wöchige Zellkultur, um genügend Metaphasechromosomen zur Verfügung zu haben. Das Ergebnis der FISH-Analyse ist dagegen nach 1-3 Tagen erhältlich, verkürzt so die für die werdende Mutter oft quälende Wartezeit beträchtlich und ist damit besonders bei Hochrisikogruppen geeignet. Die Hybridisierung wird meist für die Chromosomen 13, 18, 21 und XY durchgeführt, womit bis zu 90% der im zweiten Trimenon auftretenden Chromosomenanomalien diagnostiziert werden können. 10-15% der vorkommenden Aberrationen, z.B. struktureller Art, können mit dieser Methode jedoch grundsätzlich nicht erfasst werden. Technische Probleme, wie z.B. Versagen der Hybridisierung oder eine zu geringe Anzahl auswertbarer Kerne, oder eine Kontamination der nativen Fruchtwasserprobe mit mütterlichen Zellen können die Aussagekraft des Tests zum Teil beträchtlich herabsetzen.

In der vorliegenden Arbeit werden die ersten 129 FISH-Untersuchungen an unkultivierten Fruchtwasserproben, die am Institut für Humangenetik in Würzburg in der klinischen Diagnostik durchgeführt wurden, retrospektiv aufbereitet. Die einzelnen Fälle werden nach offiziellen diagnostischen Kriterien in Gruppen mit unauffälligen, auffälligen und problematischen FISH-Befunden aufgeteilt. Der Anteil der letztgenannten Gruppe ist recht

groß: In lediglich 20% (n=26) der Fälle konnten die erforderlichen 50 Zellkerne ausgewertet werden, in 22% (n=28) der Fälle war das Ergebnis mit 10-60% aberranten Kernen uneindeutig und in 26% (n=33) der Fälle schlug die Hybridisierung für mindestens eine Sonde fehl. Dennoch konnten 79% (15/19) der erkennbaren Anomalien mit dieser Methode korrekt identifiziert werden. Im einzelnen waren dies: 5 Trisomie 21-Fälle, darunter eine Robertson-Translokation, 3 Trisomie 18-Fälle, 4 Fälle mit Triploidie, 2 Fälle mit Monosomie X und eine Fall mit dem Chromosomensatz 48, XXY, +21. Nicht diagnostiziert wurden aufgrund von fehlgeschlagener Hybridisierung 2 Fälle mit Trisomie 21 und ein Fall mit Trisomie 13 und aufgrund eines unauffälligen Signalmusters eine Trisomie 18. Es traten keine falsch positiven Befunde auf. Fünf Fälle mit strukturellen Aberrationen entgingen der FISH-Analyse. Die Anzahl auswertbarer Kerne, die Signalverteilung in den verschiedenen Gruppen, gegebenenfalls aufgetretene Probleme bei Hybridisierung oder Auswertung und möglicherweise beeinflussende Faktoren wie Indikation, Gestationsalter, Farbe und Menge des Fruchtwassers werden dargestellt und erläutert.

In der Diskussion wird auf einige grundsätzliche technische Besonderheiten bei der FISH-Analyse eingegangen, wie z.B. den Einfluß von Sondenqualität, Gestationsalter und Zellzahl auf die Untersuchungsergebnisse. Das Problem der Kontamination der Fruchtwasserproben mit mütterlichen Zellen wird erläutert. Anschließend wird nochmals auf die pathologischen, problematischen und diskrepanten FISH-Befunde eingegangen. Daten und Erfahrungen verschiedener Arbeitsgruppen aus der Literatur werden jeweils berücksichtigt und mit den eigenen Daten in Beziehung gesetzt. Sensitivität und Spezifität der Methode werden diskutiert.

Bei Berücksichtigung der Limitationen der FISH-Diagnostik kann dieses Verfahren eine wertvolle Ergänzung zum Goldstandard der pränatalen Diagnostik, der Metaphasenanalyse, sein und insbesondere der psychischen Entlastung der Patientin dienen. Einen vollständigen Ersatz der zeitaufwendigeren konventionellen Methode kann sie wegen der oben erwähnten Nachteile nicht bieten. Die Entscheidung über die Anwendung der FISH-Diagnostik, wie auch der Pränataldiagnostik überhaupt, sollte stets der betroffenen Frau überlassen werden und erst nach ausführlicher Information über Vor- und Nachteile sowie mögliche Konsequenzen, im Idealfall im Rahmen einer Genetischen Beratung, erfolgen.

## 6. Literatur

American College of Medical Genetics (1993) *Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) Policy statement* Am J Hum Genet 53: 526-527

American College of Medical Genetics (2000) *Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: An ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations* Genetics IN Medicine 2: 356-361

Bink K, Pauer HU, Bartels I (2000) *Interphase-FISH-Test als Schnelltest für Trisomien im Fruchtwasser - Ergebnisse einer prospektiven Untersuchung* Z Geburtsh Neonatol 204: 8-13

Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J (1997) *Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: Experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial* Prenat Diagn 17: 333-341

Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Carelli MP, Ward BE, Klinger KW (1996) *Prenatal detection of chromosome aneuploidies in uncultured chorionic villous samples* Am J Hum Genet 59: 918-926

Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, Christensen B, Philip J (2000) *Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples* Acta Obstet Gynecol Scand 79: 8-14

Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, Oury JF, Serero S, Blott P, Nessman C (1994) *Evaluation of X, Y, and 13/21 alpha satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization* Prenat Diagn 14: 79-86

Carelli MP, Gersen SL, McGuire N, Ward BE (1992) *Interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by FISH: Assay success rates by gestational age (GA)* Am J Hum Genet 51: A254

Cheong Leung W, Chitayat D, Seaward G, Windrim R, Ryan G, Barrett J, Winsor EJT (2001) *Role of amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in patient management* Prenat Diagn 21: 327-332

Christensen B, Bryndorf T, Philip J, Lundsteen C, Hansen W (1992) *Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization* Prenat Diagn 12: 241-250

Christensen B, Bryndorf T, Philip J, Xiang Y, Hansen W (1993) *Prenatal diagnosis by in situ hybridization on uncultured amniocytes: reduced sensitivity and potential risk of misdiagnosis in bloodstained samples* Prenat Diagn 13: 581-587

Claussen U, Ulmer R, Beinder E, Voigt HJ (1993) *Rapid karyotyping in prenatal diagnosis: a comparative study of the pipette method and the 'in situ' technique for chromosome harvesting* Prenat Diagn 13: 1085-1093

Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devil E, Pearson P, van der Ploeg M (1986) *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 74: 346-352

D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D, Ward BE, Bianchi DW (1997) *Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies* Am J Obstet Gynecol 176: 769-776

Divane A, Carter P, Spathas DH, Ferguson-Smith MA (1994) *Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using five-colour fluorescence in situ hybridization* Prenat Diagn 14: 1061-1069

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. (1998) *Leitlinien zum "pränatalen Schnelltest" (FISH)* medgen 10: 319

Eiben B, Goebel R, Hansen S, Hammans W (1994) *Early amniocentesis - a cytogenetic evaluation of over 1500 cases* Prenat Diagn 14: 497-501

Eiben B, Hammans W, Goebel R, Epplen JT (1998a) *Ein neuer Schnelltest (FISH) zur pränatalen Diagnostik der häufigsten Chromosomenaberrationen - welche Bedeutung hat er für die Praxis?* Dtsch Med Wschr 123: 55-57

Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Epplen JT (1999a) *False-negative finding in rapid interphase FISH analysis of uncultured amniotic cells* Prenat Diagn 19: 891-895

Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT (1998b) *A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis* Prenat Diagn 18: 901-906

Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT (1999b) *Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of >3,000 cases* Fetal Diagn Ther 14: 193-197

Estabrooks LL, Sapeta M, Lytle C (1999a) *Prenatal interphase FISH using the Aneuvysion probe set in over 10,000 samples* Am J Hum Genet 65: A162

Estabrooks LL, Hanna JS, Lamb AN (1999b) *Overwhelming maternal cell contamination in amniotic fluid samples from patients with oligohydramnions can lead to false prenatal interphase FISH results* Prenat Diagn 19: 179-181

Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui TH, Snijders RJ, Wapner RJ, Miny P, Johnson MP, Peakman D, Johnson A, Nicolaides K, Holzgreve W, Ebrahim SAD, Babu R, Jackson L (1999) *International, collaborative assessment of 146 000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used* Hum Reprod 14: 1213-1216

Feldman B, Ebrahim SAD, Gyi K, Flore LA, Evans MI (2000) *Rapid confirmation of previously detected prenatal mosaicism by fluorescence in situ hybridization in interphase uncultured amniocytes* Genetic Testing 4: 61-63

Fritz B, van Oorschot B, Latta E, Rehder H (1996) *Möglichkeit falsch-negativer Befunde beim Trisomie 21-Screening mittels FISH* Z Geburtsh Neonatol 200: 191-198

Guyot B, Bazin A, Sole Y, Julien C, Daffos F, Forestier F (1988) *Prenatal diagnosis with biotinylated chromosome specific probes* Prenat Diagn 8: 485-493

Jalal SM, Law ME, Carlson RO, Dewald GW (1998) *Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence in situ hybridization* Mayo Clin Proc 73: 132-137

Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T (1992) *Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridisation (FISH)* Am J Hum Genet 5: 55-65

Lapidot-Lifson Y, Lebo RV, Flandermeyer RR, Chung JH, Golbus MS (1996) *Rapid aneuploid diagnosis of high-risk fetuses by fluorescence in situ hybridization* Am J Obstet Gynecol 174: 886-890

Lebo RV, Flandermeyer RR, Diukman R, Lynch ED, Lepercq JA, Golbus MS (1992) *Prenatal diagnosis with repetitive in situ hybridization probes* Am J Med Genet 43: 848-854

Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, Mossafa H, Szpiro-Tapia S (2000) *Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27 407 prenatal diagnosis* Prenat Diagn 20: 1-6

Mercier S, Bresson JL (1995) *Prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization on uncultured amniotic cells: experience with 630 samples* Ann Genet 38: 151-157

Mizunoe T, Young SR (1992) *Low fluorescence alpha satellite region yields negative result* Prenat Diagn 12: 549-550

Morris A, Boyd E, Dhanjal S, Lowther GW, Aitken DA, Young J, Menzies AL, Imrie SJ, Connor JM (1999) *Two years' prospective experience using fluorescence in situ hybridization on uncultured amniotic fluid cells for rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies* Prenat Diagn 19: 546-551

Nuß S, Brebaum D, Grond-Ginsbach C (1994) *Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique* Hum Genet 93: 121-124

Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, Fiddler M (2000) *The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis* Prenat Diagn 20: 215-220

Philip J, Bryndorf T, Christensen B (1994) *Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH)* Prenat Diagn 14: 1203-1215

Pierluigi M, Perfumo C, Cavani S, Lehrach H, Nizetic D, Dagna Bricarelli F (1996) *An improved method for the detection of Down's syndrome aneuploidy in uncultured amniocytes* Clin Genet 49: 32-36

Rebello MT, Abas A, Nicolaides K, Coleman DV (1994) *Maternal contamination of amniotic fluid demonstrated by DNA analysis* Prenat Diagn 14: 109-112

Schwartz ST, Leana-Cox J (1993) *Fluorescent in situ hybridization (FISH): A new application in the delineation of true vs. pseudomosaicism in prenatal diagnosis* Prenat Diagn 13: 661-670

Seres-Santamaria A, Catala V, Cuatrecasas E, Villanueva R (1993) *Fluorescent in situ hybridisation and Down's syndrome* Lancet 341: 1544

Spathas DH, Divane A, Maniatis GM, Ferguson-Smith ME, Ferguson-Smith MA (1994) *Prenatal detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization: A prospective study* Prenat Diagn 14: 1049-1054

Steinborn A, Röddiger S, Born HJ, Baier P, Halberstadt E (1996) *Die pränatale Chromosomenanalyse mit Hilfe der FISH-Technik ermöglicht das Auffinden fetaler Aneuploidien innerhalb weniger Stunden* Z Geburtsh Neonatol 200: 186-190

Strovel JW, Lee KD, Punzalan C, Schwartz ST (1992) *Prenatal diagnosis of uncultured amniotic fluid and chorionic villus cells using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH)* Am J Hum Genet 51: A12

Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, Gersen S, White B, Schoonmaker MM (2001) *Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature* Prenat Diagn 21: 293-301

Ulmer R, Pfeiffer RA, Kollert A, Beinder E (2000) *Aneuploidiediagnostik mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH); Stellenwert bei Schwangerschaften mit erhöhtem Risiko für Chromosomenaberrationen* Z Geburtsh Neonatol 204: 1-7

Van Opstal D, van den Berg C, Galjaard RJ, Los FJ (2001) *Follow-up investigations in uncultured amniotic fluid cells after uncertain cytogenetic results* Prenat Diagn 21: 75-80

Verlinsky Y, Ginsberg N, Chmura M, Freidline M, White M, Strom C, Kuliev A (1995) *Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA probe to chromosome 22 in the prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH* Prenat Diagn 15: 831-834

Verma RS, Luke S (1992) *Variations in aliphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique.* Genomics 14: 113-116

Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW (1993) *Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens* Am J Hum Genet 52: 854-865

Weremowicz SS, Sandstrom DJ, Morton CC, Niedzwiecki CA, Sandstrom MM, Bieber FR (2001) *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases* Prenat Diagn 21: 262-269

Whiteman DAH, Klinger KW (1991) *Efficiency of rapid in situ hybridization methods for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities causing birth defects* Am J Hum Genet 49: A1279

Wilson RD (1995) *Early amniocentesis: A clinical review* Prenat Diagn 15: 1259-1273

Windsor EJT, Syack S, Wood-Burgess EM, Ryan G (1999) *Risk of false-positive prenatal diagnosis using interphase FISH testing: hybridization of alpha-satellite X probe to chromosome 19* Prenat Diagn 19: 832-836

Windsor EJT, Silver MP, Theve R, Wright M, Ward BE (1996) *Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid* Prenat Diagn 16: 49-54

Zheng YL, Ferguson-Smith MA, Warner JP, Sargent CA, Carter NP (1992) *Analysis of chromosome 21 copy number in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization using a cosmid contig* Prenat Diagn 12: 931-934

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Höhn für die Überlassung des Themas, die freundliche, zuverlässige Betreuung und die prompte Hilfe bei allen Fragen bedanken.

Frau Neumann danke ich für die überaus nette Unterstützung in allen Belangen.

Zu besonderem Dank bin ich den Mitarbeiterinnen des Amniozenteselabors verpflichtet, die mir mit bewundernswerter Geduld und unter Aufopferung ihrer eigenen Arbeitszeit die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nahebrachten.

Und natürlich gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinen Lebensweg und nicht zuletzt bei der Anfertigung dieser Arbeit stets mit großer Unterstützung begleitet haben.

## **Lebenslauf**

Name	Macht, Anna
Geburtsdatum	14.10.1975
Geburtsort	Weiden in der Oberpfalz
Vater	Ernst Macht
Mutter	Maria Macht
Geschwister	zwei Schwestern, drei Brüder

## **Schulbildung**

09/1981 - 08/1985	Grundschule Pirk und Weiden
09/1985 - 07/1994	Augustinus-Gymnasium, Weiden
07/1994	Abitur

## **Studium der Humanmedizin**

11/1994 - 09/1996	Vorklinisches Studium, Universität Regensburg
09/1996	Ärztliche Vorprüfung
10/1996 – 05/2001	Klinisches Studium, Universität Würzburg
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **Krankenpflegepraktika**

08/1994	Unfallchirurgie, Klinikum Weiden
08/1995	Innere Medizin, Ostalb Klinikum Aalen

## **Famulaturen**

03/1997	Allgemeinchirurgie, Klinikum Erfurt GmbH
09/1997	Allgemeinarztpraxis, Weiden
09/1998	Pädiatrie, Klinikum Weiden
10/1998	Innere Medizin, St. Gertrauden Krankenhaus Berlin

## **Praktisches Jahr**

04/2000-04/2001	Chirurgie, Università degli studi di Palermo
	Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg
	Pädiatrie, Universitätsklinik Würzburg
	Innere Medizin, Med. Poliklinik der Universität Würzburg

Anna Hacht