

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

- Lindholt JS, Juul S, Henneberg EW et al. Is screening for abdominal aortic aneurysm acceptable for the population? *J Public Health Med* 1998;20:211-7.
- Lindholt JS, Henneberg EW, Fasting H et al. Mass or high-risk screening for abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 1997;84:40-2.
- Lindholt JS, Vammen S, Juul S et al. Optimal interval screening and surveillance of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:281-5.
- UK Small Aneurysm Trial Participants. Health service costs and quality of life for early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet* 1998;352:1656-60.
- UK Small Aneurysm Trial Participants. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet* 1998;352:1649-55.
- Rembold CM. Number needed to screen: development of a statistic for disease screening. *BMJ* 1998;317:317-2.
- Ashton HA, Buxton MJ, Day NE et al. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on the mortality in: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1531-9.
- Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM et al. Population based randomised controlled trial on impact of screening from abdominal aortic aneurysm. *BMJ* 2004;329:1259-62.

Den føtale erythroblast er ikke det optimale mål for ikkeinvasiv prænatal diagnose – sekundærpublikation

Professor John Philip, biolog Britta Christensen & professor Steen Kølvraa

H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Forskningsenheden for Prænatal Diagnostik, og Aarhus Universitet, Human-genetisk Institut

Resumé

Fosterceller i gravide kvinders blod vil kunne anvendes til fosterdiagnostik, som således vil kunne gennemføres uden invasiv prøvetagning (amniocentese og chorionvillusbopsi). Den mest oplagte fostercelletype til prænatal diagnostik er erythroblasten. Vi har bl.a. undersøgt fire metoder til berigelse/isolation af føtale erythroblaster. Vi fandt kun tre fosterceller i 573 ml maternelt blod. Det er meget mindre end de forventede 2-6 celler pr. ml maternelt blod. Nogle forfattere brugte en celletypeuafhængig markør til identifikation af fosterceller, Y-kromosom-signalet, på materielle blodprøver fra gravide med et hanligt foster. Med tilsvarende teknik fandt vi 28 fosterceller af ukendt celletype i 15 ml maternelt blod (1,9 pr. ml). Vi dokumenterede cellernes føtale oprindelse ved dobbelt hybridisering af Y- og X-kromosomet med to forskellige farver. Efter første hybridisering gennemsøgte præparaterne, og celler med positivt Y- og X-signal blev genopsøgt efter fornyet hybridisering med de samme prøber med en anden farve. Både X- og Y-signalerne skulle skifte farve. Vi har anvendt automatiseret skanningmikroskopi til celleopsøgning. Konklusion: Erythroblaster udgør kun en del af de fosterceller, der findes i maternelt blod.

Det har været kendt i næsten 40 år, at celler passerer fra foster til mor i graviditeten. Mange har undersøgt, om disse celler kunne anvendes til fosterdiagnostik, så man derved kunne undgå den (beskedne, men veldokumenterede) abortrisiko efter amniocentese og moderkagebiopsi [1, 2]. Lymfoblaster,

erythroblaster og trofoblaster har været genstand for undersøgelse. Erythroblasten har været den foretrukne, bl.a. fordi lymfocytter antages at kunne overleve i mange år efter en afsluttet graviditet [3], og fordi talrige forsøg med trofoblaster ikke har ført til overbevisende resultater [4]. Som erythroblastmarkører har føtale og embryonale hæmoglobinantistoffer været anvendt.

For at kompensere for fostercellernes sjældne forekomst i maternelt blod har forskellige former for opkoncentrering (kaldet berigelse) været anvendt, afhængig af hvilken celletype, der har været fokuseret på. *Hamada et al* [5] og *Krabchi et al* [6] har satset på en metode, der var uafhængig af celletype. Ved at behandle maternelt fuldblod med hypotonisk væske efterfulgt af Carnoy-fiksering fjernes de fleste erythrocytter. Kernerne bevares, og det er efterfølgende muligt at foretage kromosomanalyse med fluorescens in situ-hybridisering (FISH). Da fiksativet imidlertid fjerner cytoplasmaet, kan celletypen efterfølgende ikke identificeres. *Hamada et al* og *Krabchi et al* brugte X- og Y-kromosom-FISH som markør for føtale celler og fandt en hyppighed på 1-6 fosterceller pr. ml maternelt blod.

Vi har undersøgt en række berigelsesmetoder med henblik på at selekttere erythroblaster. Vi sluttede med den mest skånsomme og begrænsede: differentieringskompleks (CD)71-positiv selektion på fuldblod. Vi brugte en kombination af zeta-hæmoglobin og X-Y-kromosom som markører [7, 8]. Vi fandt meget få fosterceller, selv om vi analyserede over 560 ml blod. Vi har samtidig undersøgt en serie blodprøver a.m. *Krabchi et al* [6] for at verificere de hyppigheder, disse forfattere har fundet. Da denne metode som nævnt kun fjerner erythrocytterne, skal der stadigvæk analyseres et stort antal kerner. Vi har hertil som noget nyt anvendt halvautomatisk (ha) skanning for Y-kromosom-signaler. Dette vurderer vi som en mere pålidelig

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

og mindre tidsrøvende metode end manuel gennemsøgning af præparater. Vi har i et begrænset antal prøver fundet et tilsvarende antal fosterceller (Y-kromosom-positive) som [8]. Vi konkluderer, at erytroblaste kun kan udgøre en mindre del af de fosterceller *Hamada et al, Krabchi et al* og vi har fundet.

Materiale og metoder

Forsøgspersoner

Treogfyrre gravide kvinder gav en blodprøve i ethylen-diamin-tetra-acetat (EDTA)-holdige *vacutainers*. Alle blodprøver blev taget før invasiv prøvetagning (amnionvæske eller chorionbiopsi). Alle kvinderne var gravide med et hanligt foster. Fosterkønnet blev bestemt enten ved ultralydskanning før blodprøven blev taget eller ved X-Y-kromosom-interfase-FISH på villusmateriale fra en chorionvillusbiopsi (CVS) udført efter blodprøvetagning. Alle kvinderne gav informeret samtykke. Projektet er godkendt af De Videnskabetiske Komiteer for Københavns og Frederiksbergs Kommuner (journalnr. KF 01-039/95).

Berigelse og analyse af blodprøver

En detaljeret beskrivelse af analysen af disse prøver findes i [7, 8]. Tolv prøver (1-12) blev beriget for kerneholdige celler ved *bulk*-separering (a.m. *Applied Imaging*) og seks prøver (13-18) ved densitetsgradientcentrifugering (Tabel 1). Med disse metoder fjerner man størstedelen af erythrocyterne og beriger prøven for fraktioner af kerneholdige celler i overensstemmelse med cellernes massefylde. Udstrygningspræparaterne fra disse 18 prøver blev farvet med et monoklonalt antistof mod epsilon-globin-kæden i embryonalt hæmoglobin. Epsilonpositive erytroblaste blev identificeret ved ha-skanning. At epsilonpositive celler var af føtal oprindelse blev bekræftet ved hjælp af FISH med X-Y-kromosom-specifikke prober.

Tyve prøver (19-38) blev beriget ved densitetsgradientcentrifugering efterfulgt af magnetisk aktiveret celleseparation (dobbelMACS, Miltenyi) i form af CD45-depletion, efterfulgt af CD71-positiv selektion af de CD45-negative celler. Fem prøver (39-43) blev beriget udelukkende ved CD71-positiv selektion af fuldblod ved immunicon teknik (Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA, USA). Begge procedurer er beregnet til at bevirke opkoncentrering af erytroblaste. Præ-

parater fra disse prøver blev analyseret manuelt for hanlige (føtale) celler ved to X-Y-hybridiseringer. Efter første hybridisering, gennemsøgning og identificering af X-Y-positive celler (kandidatceller) blev der foretaget rehybridisering med X-Y-prober med modsatte farver. Efter genopsøgning af kandidatcellerne sikrede man sig, at både X- og Y-signalerne havde skiftet farve. Udstrygningspræparater fra prøverne 39-43 blev også analyseret ved farvning med et monoklonalt antistof mod zeta-hæmoglobinkæden i embryonalt hæmoglobin. Zeta-positive erytroblaste blev identificeret ved ha-skanning.

Fem prøver (44-48) blev beriget ved hypotonisk behandling og fiksering med Carnoy-vædske og analyseret med dobbelthybridisering [8] med enkelte modifikationer. Vi anvendte ha-skanning; en tredjedel af præparaterne blev også manuelt skannet.

Præparatanalyse

Føtale celler fra eksperimenterne blev hovedsagelig fundet ved mikroskopbaseret ha-analyse. De 20 prøver (19-38), der var beriget ved dobbelMACS, blev dog alene skannet manuelt. En del præparater blev analyseret ved både manuel og ha-analyse. Der blev anvendt mindst to markører: antistoffer mod embryonale hæmoglobiner og/eller X-Y-kromosom-specifikke prober. RCDetect-skanneren (MetaSystems) blev brugt ved skanning for cytoplasmatisk farvning, mens FISH-signaler blev op-søgt med MDS-skanneren (*Applied Imaging*).

Resultater

Efter at protokollerne var dels udviklet, dels modificeret, fik vi intense, letafæselige signaler. Ved sammenligning af resultater opnået ved manuel skanning og ved ha-skanning af samme præparater fandt vi ved undersøgelse af antistof-farvede præparater, at metoderne gav identiske resultater. Ved X-Y-hybridiserede præparater gav manuel skanning og ha-skanning ikke altid identiske resultater. Ved begge metoder kunne man en sjælden gang miste en føtal celle. Endvidere fandt man ved ha-skanning mange falsk-positive signaler: Efter den første X-Y-kromosom-FISH blev der ved begge metoder fundet cellekerner med et rødt og et grønt signal (kandidatceller). Efter gentagen hybridisering med X-Y-kromosomprober med modsatte farver blev disse kandidatceller igen op-søgt. Ved falsk-positive celler blev det grønne X-signal godt nok rødt,

Tabel 1. Antal og hyppighed af fosterceller fundet i periferet blod hos gravide kvinder.

Berigelsesmetode	Antal prøver analyseret	Total mængde blod analyseret	Antal føtale celler identificeret	Hyppighed af føtale celler pr. ml blod
Carnoy-fiksering	5	15	28	1,9
DobbelMACS	20	371	0	(0)
Densitetsgradient-centrifugering	6	36	1	0,03
<i>Bulk</i> -separering	12	130	0	(0)
Differentieringskompleks (CD)71-selektion på fuldblod	5	26	1+ (1)	0,4

VIDENSKAB OG PRAKSIS | KASUISTIK

men det røde Y forblev rødt. Ved sandt-positive celler skiftede både X- og Y-signalerne farve. Alle kandidatceller blev derfor undersøgt i mikroskopet efter begge hybridiseringer. De falsk-positive røde signalers natur kendes ikke. De kan måske skyldes uspecifik binding af probe eller være små partikler fra de anvendte opløsninger.

I Tabel 1 resumeres resultaterne. Antallet af føtale celler i hver af de Carnoy-fikserede prøver (44-48) ligger på 3-12.

Det fremgår af Tabel 1, at der kun fandtes tre føtale celler i 573 ml maternelt blod efter berigelse med henblik på at søge efter erythroblaster. Til gengæld fandtes der 28 føtale celler i 15 ml blod efter hypotonering og Carnoy-fiksering.

Diskussion

Gennem de seneste få år har vi arbejdet på at identificere og isolere fosterceller fra maternelt blod. Vi har gjort mange forsøg på at udvikle både nye markører og berigelsesmetoder.

Vi har i forskellige samarbejdsrelationer forsøgt at udvikle peptidnukleinsyre (PNA)-prober mod embryonalt hæmoglobin-ribonukleinsyre (RNA) og undersøgt en række forskellige berigelsesmetoder for erythroblaster og trofoblaster. Den bedste erythroblastberigelsesmetode var CD71-positiv selektion på fuldblod. Dette blev vist på prøver taget efter (invasiv) CVS (post-CVS), hvor der altså har været tale om føtomaternel blødning inden blodprøvetagningen [8].

Andre har fundet større antal erythroblaster end vi på præ-CVS-prøver. Der har været publiceret tal fra en fostercelle pr. 10^4 til en pr. 10^9 maternelle celler. Vi antager nu, at der ved fund af relativt høje antal føtale celler har været tale om falsk-positive celler, som har været identificeret ved føtale hæmoglobinantistoffer eller ved en enkelt X-Y-hybridisering. Føtal hæmoglobinantistof er ikke en specifik markør.

Vi har fundet, at det er nødvendigt at anvende to uafhæn-

gige markører for føtal oprindelse af celler, f.eks. to sekventielle hybridiseringer med X- og Y-kromosom-specifikke prober med omvendte farver eller fosterspecifikke embryonale hæmoglobinmarkører som epsilon- og zeta-hæmoglobinantistoffer kombineret med X-Y-kromosom-FISH.

Korrespondance: *John Phillip*, Berlingsbakke 11, DK-2920 Charlottenlund. E-mail: joph@gentofte.dk

Antaget: 8. november 2004

Interessekonflikter: Ingen angivet

Arbejdet er støttet delvist af følgende fonde: Alfred Benzons Fond, Brdr. Hartmanns Fond, Kromosomforskningsfonden, Steenbecks Fond, Det Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, Ivan Nielsens Fond, Novo Nordisk Fond, Lundbecks Fond, Carl og Ellen Hertzs Fond, Erhvervsfremme Styrelsen og Frode Nyegaards Fond.

Vi takker MetaSystems og Applied Imaging for at stille de automatiske skanning-instrumenter til vores rådighed.

This publication was first reported in the *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005;53:331-6.

Litteratur

1. Tabor A, Philip J, Madsen M et al. Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986;1:1287-93.
2. Smidt-Jensen S, Permin M, Philip J et al. Randomised comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling. *Lancet* 1992;340:1237-44.
3. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705-8.
4. Oudejans CBM, Tjoa ML, Westerman BA et al. Circulating trophoblast in maternal blood. *Prenatal Diagnosis* 2003;23:111-6.
5. Hamada H, Arinami T, Kubo T et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: Frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993;91:427-32.
6. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001;60:145-50.
7. Christensen B, Kølvrå S, Lykke-Hansen L et al. Studies on the isolation and identification of fetal nucleated red blood cells in the circulation of pregnant women before and after chorion villus sampling. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:376-84.
8. Christensen B, Philip J, Kølvrå S et al. Fetal cells in maternal blood: a comparison of methods for cell isolation and identification. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:106-12.

Påvisning af kokoppevirus (cowpoxvirus) i Danmark

Seniorforsker Laurids Siig Christensen, speciallæge Eivind B. Nielsen, laborant Jane Nowicki, professor Johan Andersen & virolog Karin de Stricker

Danmarks Fødevareforskning, Afdeling for Virologi, Lindholm, Speciallægerne i hudsygdomme, Esbjerg, og Syddansk Universitetshospital, Esbjerg, Patologisk Afdeling

Kokoppevirus (*cowpoxvirus*) er et med variolavirus tæt beslægtet virus, hvis egentlige værtsdyr er gnavere såsom mus og rot-

ter. Infektionen kan overføres til en lang række dyrearter inklusive mennesket, og symptomerne er oftest lokaliseret til indgangsporte igennem huden med et mildt forløb og ringe mortalitet [1]. Der er rapporteret om kokoppevirus i Sverige [2] og Norge [3], men den er ikke tidligere blevet påvist i Danmark. For en oversigt se [4].

Sygehistorie

En 13-årig dreng blev henvist pga. mistanke om et perianalt herpesvirusulcus. Patienten havde i 2-3 uger haft et knoppet udslæt og forudgående en længere periode med kløe peri-