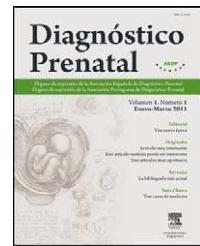


Diagnóstico Prenatal

www.elsevier.es/diagnprenat



Original

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y cultivo largo: ¿el mejor método para el estudio citogenético de muestras de vellosidad corial?

Laura Barranco^{a,*}, Vincenzo Cirigliano^b, Elisabet Lloveras^a, Elena Ordoñez^b, Marta Herrero^a, Daniel Fernández^a, Nuria Palau^a, Anna Canellas^a, Marta Costa^a, Susana Martín^a, Judit Mendoza^a, Elena Pérez^a y Alberto Plaja^a

^a Departament de Citogenètica, General lab-Laboratori d'anàlisis, Barcelona, España

^b Departament de Biologia Molecular, General lab-Laboratori d'anàlisis, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de enero de 2010

Aceptado el 14 de junio de 2011

On-line el 31 de julio de 2011

Palabras clave:

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente

Biopsia corial

Diagnóstico prenatal

RESUMEN

El diagnóstico prenatal citogenético durante el primer trimestre de gestación se realiza a partir de biopsias de vellosidad corial. Para la obtención de metafases se utilizan dos métodos: el cultivo corto o semidirecto (STC) y cultivo largo (LTC). La principal ventaja del STC es que no presenta contaminación materna y la del LTC es que no hay descritos en la literatura falsos negativos. Se considera que la combinación de las dos técnicas (STC y LTC) es la estrategia diagnóstica más eficaz para este tipo de estudios.

La técnica de PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) permite evaluar las aneuploidías más frecuentemente implicadas en el diagnóstico prenatal en 24-48 horas en muestras de vellosidad corial.

El objetivo de este trabajo es evaluar la combinación de QF-PCR y LTC como sustituto de las clásicas STC y LTC para el diagnóstico prenatal en muestras de vellosidad corial. Para ello presentamos nuestra experiencia en 900 muestras de vellosidad corial.

© 2010 Asociación Española de Diagnóstico Prenatal. Publicado por Elsevier España, S.L.

Todos los derechos reservados.

Quantitative Polymerase Chain Reaction and long term culture: the best method for cytogenetic study of chorionic villus sampling?

ABSTRACT

First trimester cytogenetic prenatal diagnosis is performed on chorionic villus biopsies. Two methods are used to obtain metaphases: the short-term or semi-direct culture (STC) and long term culture (LTC). The main advantage of STC is that there is no risk of maternal contamination, and of LTC that no false-negative findings are described in the literature. It is considered that the combination of the two techniques (STC and LTC) is the most effective diagnostic strategy for this type of study.

Keywords:

Quantitative Fluorescence

Polymerase Chain Reaction

Chorionic villus sampling

Prenatal diagnosis

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lbaranga7@hotmail.com (L. Barranco).

2173-4127/\$ - see front matter © 2010 Asociación Española de Diagnóstico Prenatal. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
doi:[10.1016/j.diapre.2011.06.003](https://doi.org/10.1016/j.diapre.2011.06.003)

The technique of quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) allows the evaluation of aneuploidy most frequently involved in prenatal diagnosis in 24-48 hours in chorionic villus samples.

The aim of this study is to evaluate the combination of QF-PCR and LTC as a substitute for classical STC and LTC for prenatal diagnosis in chorionic villus samples. We present our experience in 900 chorionic villus samples.

© 2010 Asociación Española de Diagnóstico Prenatal. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El diagnóstico prenatal citogenético en el 1.^{er} trimestre de gestación se realiza a partir de una muestra de vellosidad corial. Se utilizan de forma rutinaria dos tipos de cultivo: el cultivo corto (STC), en el cual se analizan células procedentes del cito-trofoblasto que se dividen espontáneamente, y el cultivo largo (LTC), en el cual se analizan células del mesénquima que solo se dividen tras un cultivo celular que puede durar dos o tres semanas.

El principal problema en el estudio citogenético de este tipo de muestras radica en la detección de mosaicos cromosómicos confinados a la placenta y no presentes en el feto¹⁻⁶. Este tipo de situaciones son más frecuentes cuando se obtiene el cariotipo a partir del STC que cuando se obtiene a partir del LTC. Esto se debe a que en el LTC las células (provenientes del mesodermo) son embriológicamente mucho más próximas al tejido fetal. Se ha observado un 0,15%⁷ de falsos positivos con la técnica de STC. Este problema es prácticamente inexistente en el LTC, por lo que diferentes estudios han demostrado que la combinación de ambas o, si no es posible, el realizar únicamente el LTC es la estrategia diagnóstica más indicada para el estudio citogenético en vellosidad corial^{5,8-10}. La técnica STC presenta la menor fiabilidad y puede conducir a la terminación innecesaria del embarazo en algunos casos^{11,12}.

Otro inconveniente derivado del estudio citogenético del STC es que los cromosomas suelen presentar menor resolución de bandas G que el LTC⁵. A pesar de los inconvenientes del STC es un método ampliamente usado en diferentes laboratorios para el estudio de la vellosidad corial debido a que no hay casos descritos de contaminación materna y puede darse un resultado en 3-4 días. Estas ventajas también las presenta el estudio mediante QF-PCR, una técnica molecular que permite evaluar las aneuploidías más frecuentemente implicadas en el diagnóstico prenatal (los autosomas 13, 18, 21 y los cromosomas sexuales X e Y), detectando un 92% de las anomalías cromosómicas clínicamente relevantes en 24 horas¹³. La QF-PCR presenta importantes ventajas frente al STC, principalmente que permite el diagnóstico a partir de muy poca cantidad de muestra (gracias a ello se puede destinar gran cantidad de muestra para el cultivo), no necesita tejido vivo y es capaz de determinar la presencia de contaminación materna en una muestra.

El objetivo que nos planteamos es valorar la efectividad de la sustitución del STC por la QF-PCR en la realización del diagnóstico prenatal citogenético en vellosidad corial, combinada con el LTC.

Pacientes y métodos

Entre los años 2001 y 2009 se ha realizado el estudio de 900 muestras de vellosidad corial. Las muestras se han obtenido a partir de punciones trans-cervicales o trans-abdominales, en la 10-12 semana de gestación.

De las 900 muestras, 81 fueron procesadas por los métodos STC y LTC; a 66 se les realizó QF-PCR, STC y LTC; y en 753 QF-PCR y LTC.

El STC se realizó según la técnica clásica de disagregación de la muestra en acético al 60%¹⁴. El LTC se realizó mediante la técnica de explantes¹⁵ y/o de digestión¹⁶. Al llegar la muestra al laboratorio se preparó descartando el material materno y los coágulos, se limpió mediante solución salina y se separaron 2 muestras de aproximadamente 0,1 mg de la vellosidad para realizar la QF-PCR. El resto de la muestra se procesó mediante la técnica de explantes con disagregación mecánica, o mediante la técnica de digestión con disagregación enzimática con colagenasa.

El estudio cromosómico se realizó a partir de extensiones cromosómicas teñidas con colorante Wright para la obtención de bandas G¹⁵. La fórmula cromosómica se describió de acuerdo al ISCN (International System Cytogenetics Nomenclature)¹⁷. En los cultivos de STC se analizaron 10 metafases y en el LTC 20 metafases pertenecientes a dos cultivos independientes.

La QF-PCR se realizó para detectar aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Aneufast). El ADN se extrajo a partir de fragmentos de 1-2 mm de vellosidad corial o unas gotas del producto de la digestión con colagenasa¹⁶ usando el producto Chelex (Instagene Matrix, Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.)²². En caso de que el resultado fuera patológico se repetía el estudio a partir de un nuevo fragmento de 1-2 mm diferente de la muestra de vellosidad corial procedente del cultivo citogenético o del material sobrante conservado a 4 °C.

Resultados

Se ha obtenido un resultado citogenético en el 94% de los casos. En 59 de los 147 casos analizados por STC (40%) no fue posible estudiar el cariotipo; en 7 de ellos debido a la escasa muestra recibida, en 42 al no obtener metafases y en 10 debido a la baja calidad en las metafases.

En 54 de los 900 casos analizados por LTC (6%) no fue posible estudiar el cariotipo; en 22 no se obtuvo crecimiento, en 4 debido al escaso material, en 17 el material era materno y en 11 casos hubo contaminaciones por cándidas, probablemente

Tabla 1 – Alteraciones citogenéticas detectadas en 109 casos de 900 vellosidades coriales

Alteración citogenética	Indicación ecográfica	STC	LTC	QF-PCR	N.º caso
Trisomías	Aborto	-	47,XY,+4	XY	576
		XY	46,XY[40]/47,XY,+2[10]	XY	19
	Edad > 35	-	48,XY,+2,+12	XY	399
	Legrado	-	47,XY,+8	XY	206
	Legrado	-	47,XX,+8	XX	207
	Aborto	-	47,XY,+10	XY	432
	CBRSD positivo	-	47,XY,+13	XY,+13	842/445/470
	Gestación no evolutiva	-	47,XX,+13	XX,+13	405/406/444
			47,XY,+15	XY	753
			47,XX,+15	XX	38/797
			47,XY,inv(12),+15	XY	565
	Higroma quístico	-	48,XX,+2+8/47,XX,+18	XX,+18	505
		-	47,XX,+18	XX,+18	641/787/804/890/534
			47,XY,+18	XY,+18	827/828/879/897/263/443/475/477
	TN aumentada	XX,+18	47,XX,+18	XX,+18	72/306/401/473
	Edad > 35	-	47,XX,+18	XX,+18	167/499
	Higroma	-	47,XX,+18	XX,+18	225/440
	TN aumentada	-	47,XY,+18,t(6;7)	XY,+18	231
	Hidrops. fetal	-	47,XX,+18	XX,+18	248
		-	47,XY,+21	XY,+21	630 /894/339/495/501/523/564/566/575
	TN aumentada	-	47,XY,+21	XY,+21	833/45/114/180/195/310/319/434
		-	47,XX,+21	XX,+21	649/674/693/710/529/552
	Edad	XY,+21	47,XY,+21	-	137/442
	TN aumentada	-	47,XX,+21	XX,+21	656/870/115/179/235/343/353
	Aborto diferido	-	47,XX,+21	XX,+21	900
	TN aumentada	-	48,XXY,+21	-	133
			XXY,+21	XXY,+21	570
	ILE	47,XY,+20	47,XY,+20	-	30
		-	47,XY,+22	XY	803
	Abortos repetición	47,XY,+21	47,XY,+21	-	51/360
Monosomías		45,X	45,X	X	25/67
		-	45,X	X	663/788
	Edad > 35	45,X	45,X	-	44
	Higroma quístico	45,X	45,X	X/XY	76/130
	CBRSD positivo	-	45,X[15]/46,XX[5]	X	467
Triploidías	Cardiopatía, oligoamnios, hidrocefalia	-	69,XXX	XXX	623/426
	Hidrocefalia	-	69,XXX	XXX	755/757
	TN aumentada, espina bífida	-	69,XXY	XXY	349
		-	69,XXX	XXX	817
	Aborto diferido	69,XXY	69,XXY	-	42
	Abortos de repetición	-	69,XXX	XXX	246
Translocaciones desequilibradas		-	46,XY,der(13;13)	XY,+13	723
Deleciones		XX	46,XX,del(4)	-	8
		-	46,XX,del(3p)	XX	728
		-	46,X,del(X)/46,XX	XX	848
	Malformación	XX	46,XX,del(7)	-	71
Anillos		XX,aad(18p)/XX, -18,+mar	46,XX,r(18)(p11.2q23)	XX	34
Adiciones	Higroma quístico	XX	46,XX,add(8p)	-	41
Translocaciones equilibradas	Padre portador	46,XY,der(13;14)	46,XY,der(13;14)(q10;q10)	XY	89
	TN aumentada	-	46,XY, t(1;20)(p13;p11.2)	-	245
	TN aumentada	-	47,XY,+18,t(6;7)(q21;p15)	XY	231
		-	46,XY,t(5;11)	XY	814
		-	46,XY,der(13;14)	XY	815

Tabla 1 – (Continuación)

Alteración citogenética	Indicación ecográfica	STC	LTC	QF-PCR	N.º caso
Inversiones	Onfalocele	XX -	46,XX,inv(2) 47,XY,inv(12),+15	XY	129 565

CBRSD: cribado, selección bioquímica de riesgo de síndrome de Down; ILE: interrupción legal embarazo; LTC: cultivo largo; QF-PCR: técnica de PCR cuantitativa fluorescente; STC: cultivo corto; TN: translucencia nucal.

asociadas al método de extracción de la muestra (extracción trans-cervical en todos los casos). La QF-PCR obtuvo resultados en todos los casos realizados (819 muestras).

En total, se han detectado 109 alteraciones citogenéticas (**tabla 1**): 79 trisomías, 8 monosomías X, 8 triploidías, 4 delecciones, 5 translocaciones equilibradas, 2 inversiones, una adición de material cromosómico, un anillo (**fig. 1**) y una translocación desequilibrada.

En el STC se observaron 3 falsos negativos asociados a baja resolución, 46,XX,del(4)(q31.2), 46,XX,add(8p), 46,XX,del(7)(q32) y un mosaico confinado a placenta, 46,XY/47,XY,+2.

En el LTC se han detectado 2 casos de mosaicismo confinado a placenta, un caso de trisomía 18 en mosaico y otro con cariotipo 48,XY,+2,+12. En ambos casos se observó un cariotipo normal en líquido amniótico. No se conoce ningún caso de falso negativo.

En 9 casos se detectó contaminación materna en el LTC (1%). En dos casos en que la contaminación fue masiva, la QF-PCR permitió detectar el problema y realizar un diagnóstico correcto. En un caso (n.º 428) se diagnosticó un cariotipo 46,XX mediante citogenética convencional. La discrepancia con el resultado obtenido por QF-PCR (XY) llevó a una reevaluación del cultivo que permitió hallar un reducido número de células fetales (4/400). En otro caso (n.º 443) se obtuvo un cariotipo 46,XX en todas las células analizadas procedentes de un cultivo de la digestión de la vellosoidad corial. Como la QF-PCR indicaba un sexo masculino y una trisomía 18, se procesaron cultivos adicionales procedentes de explantes, en los que se confirmó el resultado 47,XY,+18. (**tabla 2**).

La QF-PCR no pudo detectar 15 anomalías (1,8%) debido a las limitaciones propias de la técnica: 6 aneuploidías (2 casos

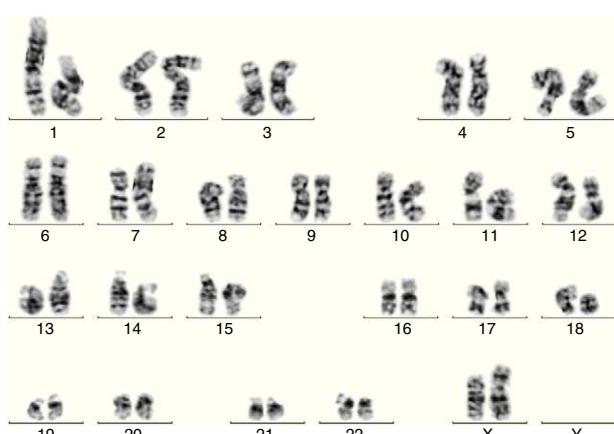


Figura 1 – Cariotipo obtenido mediante LTC;46,XX,r(18)(p11.2q23) (caso 34).

Tabla 2 – Casos de contaminación materna masiva

QF-PCR	LTC	Reevaluación LTC	N.º caso
XY	46,XX [20]	46,XX [396]/46,XY [4]	428
XY,+18	46,XX [20]	46,XX (Digestión)/ 47,XY,+18(Explante)	443

LTC: cultivo largo; QF-PCR: técnica de PCR cuantitativa fluorescente.

de trisomía 8, una trisomía 10, dos trisomías 15, una trisomía 22), un cromosoma marcador adicional de muy pequeño tamaño, una delección de 3p, una adición en el 8, un anillo del cromosoma 18 (**fig. 1**) y cinco translocaciones equilibradas (**tabla 3**). En 10 casos (1,2%) se trataba de alteraciones que tenían consecuencias para el feto.

En un caso (n.º 848) el resultado de la QF-PCR fue normal y de sexo femenino y el cariotipo en LTC indicó una delección intersticial del cromosoma X en mosaico, con fórmula cromosómica 46,X,del(X)(q26q28)[24]/46,XX[6]. Los marcadores del cromosoma X analizados mediante la QF-PCR ayudaron a determinar los puntos de rotura con más precisión. Esta alteración detectada en LTC puede tratarse de un mosaicismo confinado a placenta, o bien de una contaminación materna de la línea normal y con afectación fetal. Ambas posibilidades se podrían descartar mediante un análisis en líquido amniótico que no se realizó debido a la decisión de la pareja de continuar la gestación independientemente de la constitución cromosómica fetal.

Tabla 3 – Alteraciones citogenéticas detectadas en LTC y no detectadas en QF-PCR en 819 muestras

	QF-PCR	LTC	N.º caso
Translocaciones equilibradas	XY	46,XY,der(13;14)	89
	XY,+18	47,XY,+18,t(6;7)	231
	XY	46,XY,t(1;20)	245
	XY	46,XY,t(5;11)	814
	XY	46,XY,der(13;14)	815
Alteraciones desequilibradas	XX	46,XX,r(18)	34
	XX	46,XX,add(8)	41
	XY	47,XY,+8	206
	XX	47,XX,+8	207
	XY	47,XY,+10	432
	XX	46,XX/47,XX,+mar	669
	XX	46,XX,del(3p)	728
	XY	47,XY,+15	753
	XX	47,XX,+15	797
	XY	47,XY,+22	803

LTC: cultivo largo; QF-PCR: técnica de PCR cuantitativa fluorescente.

Discusión

El análisis citogenético a partir de muestras de vellosidad corial ha demostrado ser un método fiable para analizar la constitución cromosómica fetal en el primer trimestre, si bien con resultados algo inferiores a los obtenidos en segundo trimestre a partir de líquido amniótico¹⁻⁵. Existen diferencias entre el análisis a partir de células citotrofoblásticas y mesenquimáticas, que se traducen en una menor fiabilidad del STC. Por otra parte, el LTC presenta el problema de la contaminación materna y la demora del resultado en dos o tres semanas. En consecuencia, es conveniente el análisis en paralelo mediante STC y LTC^{5,8,18,19}. El principal problema en la aplicación en paralelo del STC y LTC es la necesidad de una gran cantidad de muestra, no siempre disponible. En estos casos se recomienda primar el LTC, retrasando el resultado hasta las dos o tres semanas de recepción de la muestra. Adicionalmente, la técnica de STC requiere una gran vitalidad en el tejido analizado, no siempre presente en muestras de difícil extracción o que han sufrido un transporte que a veces puede ser largo. La sustitución del STC por la QF-PCR, una técnica molecular que requiere muy poca muestra y no depende de la presencia de células vivas, nos ha permitido realizar diagnósticos rápidos en la práctica totalidad de las muestras manteniendo la máxima fiabilidad diagnóstica al facilitar el estudio paralelo mediante LTC. En nuestro estudio hemos obtenido un 94% de éxito en la técnica de LTC, algo superior al descrito en la literatura, de aproximadamente un 85%⁵.

La QF-PCR ha permitido obtener resultados en 22 casos (2,7%) en los que la falta de viabilidad de la muestra impedía cualquier tipo de resultado por técnicas de citogenética convencional. Adicionalmente, al no requerir cultivo celular, la QF-PCR nos ha proporcionado los resultados de 11 casos (1,3%) en los que la contaminación por levaduras de cándidas del cultivo impidió el resultado citogenético clásico.

En la literatura se ha descrito que la presencia de anomalías cromosómicas en mosaico en el estudio prenatal de vellosidades coriales es de un 1-2%, un 80% de las cuales están confinadas a placenta y no presentes en el feto^{3,20}. La presencia de mosaicos confinados a placenta es superior en STC que en LTC. En nuestra experiencia, sustituir el STC por la QF-PCR nos ha permitido reducir a un 0,22% los mosaicos confinados a placenta, reduciendo la angustia generada en las gestantes y el número de amniocentesis de confirmación. Este descenso se puede deber a dos factores. Primero, la QF-PCR es una técnica muy dirigida a un tipo concreto de anomalías y, por tanto, anomalías numéricas en los cromosomas no analizados y la mayoría de las anomalías estructurales pasarán desapercibidas. Segundo, la QF-PCR no analiza únicamente el citotrofoblasto (tejido en el cual la proporción de mosaicos confinados a placenta es mucho mayor) sino también células del mesénquima.

En nuestra casuística hemos hallado 15 casos (1,8%) en los que la QF-PCR no ha detectado anomalías cromosómicas, 10 de ellas (1,2%) de riesgo potencial para el feto.

Estos datos confirman la utilidad de utilizar ambos ensayos en gestaciones de alto riesgo, ya la QF-PCR ha sido diseñada únicamente para la detección de las aneuploidías

más frecuentes²¹⁻²³. Una posible limitación del LTC es la contaminación materna⁴. La sustitución del STC (un método sin este problema y que permite el análisis de todos los cromosomas), por la QF-PCR presentaría el riesgo potencial de falsos negativos en el caso de que se produjese una contaminación materna en el LTC en presencia de una aneuploidía no detectable por el ensayo molecular. Sin embargo, en el curso de nuestro estudio, hemos observado 9 casos de contaminación materna en el LTC (1%), una frecuencia más cercana al rango inferior de los valores descritos en la literatura (0,91-6,4%)^{1,24}. En 7 casos el número de células maternas en el cultivo celular fue minoritario y no existió un riesgo de error diagnóstico. En dos casos la contaminación fue masiva y la QF-PCR permitió detectar el problema evitando un diagnóstico erróneo.

De forma similar a lo descrito en los estudios a partir de STC y LTC, se han publicado varios casos de discordancia entre QF-PCR y LTC²⁵⁻²⁸. En nuestra experiencia no hemos detectado ningún caso. Este problema, debido a la presencia de mosaicos placentarios, se agudiza debido a la poca representatividad de los pequeños fragmentos de material tradicionalmente utilizados en la QF-PCR. Para minimizar este problema, es recomendable realizar la QF-PCR a partir de material vello-sarrio digerido y no de pequeños fragmentos.

En conclusión, los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que en el análisis cromosómico prenatal a partir de vellosidades coriales, la combinación de las técnicas de QF-PCR y LTC permite reducir el número de casos sin resultado y el número de falsos positivos observados mediante la combinación clásica de STC y LTC.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leddbetter DH, Zachary JM, Simpson MS, Golbus MS, Pergamen E, Jackson L, et al. Cytogenetic results from the collaborative study on CVS. *Prenat Diagn*. 1992;12:317-45.
2. Pittalis MC, Dalpra L, Torricelli F, Rizzo N, Nocera G, Cariati E, et al. The predictive value of cytogenetic diagnosis after CVS based on 4860 cases both direct and culture methods. *Prenat Diagn*. 1994;14:267-78.
3. Hahnemann JM, Vejerslev LO. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC) - fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet*. 1997;70:179-87.
4. Sikkelma-Raddatz B, Bouman K, Verschueren-Bemelmans CC, Stoepker M, Mantingh A, Beekhuis JR, et al. Four years' cytogenetic experience with the culture of chorionic villi. *Prenat Diagn*. 2000;20:950-5.
5. Van den Berg C, Van Opstal D, Brandenburg H, Wildschut IJ, Den Hollander NS, Pijpers L, et al. Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short - and long-term culture of chorionic villi. *Prenat Diagn*. 2000;20:956-69.
6. Plaja A. Interpretación y expresión clínica de mosaicos cromosómicos. *Progr Diag Trat Prenat*. 2006;18:122-7.
7. Hahnemann JM, Vejerslev LO. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS) - diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic

- discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn.* 1997;17:801-20.
8. Van den Berg C, Van Opstal D, Polak-Knook J, Jan Galjaard R. (Potential) false negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006;26:308-401.
 9. Aina-Mumuney A, Wood ED, Corson VL, Stetten G, Jari S, Boehm CD, et al. Clinical consequences of an increasing trend of preferential use of cultured villi for molecular diagnosis by CVS. *Prenat Diagn.* 2008;28:332-4.
 10. Kennerknecht I, Barbi G, Djalali M, Mehnert K, Schneider M, Terinde R, et al. False-negative findings in chorionic villus sampling. An experimental approach and review of the literature. *Prenat Diagn.* 1998;18:1276-82.
 11. Los FJ, Van den Berg C, Van Opstal D, Noomen P, Braat A, Gaijaard R, et al. Abnormal karyotypes in semi-direct chorionic villus preparations of women with different cytogenetic risks. *Prenat Diagn.* 1998;18:1023-40.
 12. Cuatrecasas E, Míguez L, Pérez Iribarne MM. Estudio de la morfología y del índice mitótico de vellosidades coriales en diagnóstico prenatal. *Progr Diag Trat Prenat.* 2008;20: 2-9.
 13. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Cañadas MP, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn.* 2009;29:40-9.
 14. Simoni G, Brambati B, Danesino C, Rossella F, Terzoli GL, Ferrari M, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet.* 1983;63:349-57.
 15. Verma RS, Babu A. Human chromosomes. Principles and techniques. Nueva York: McGraw-Hill Inc; 1995.
 16. Smidt-Jensen S, Christensen B, Lind AM. Chorionic villus culture for prenatal diagnosis of chromosome defects: reduction of the long-term cultivation time. *Prenat Diagn.* 1989;9:309-19.
 17. Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2009. En: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S Karger Publishers Inc; 2009.
 18. Eichenbaum SZ, Krumins SJ, Fortune DW, Duke J. False-negative findings on chorionic villus sampling. *The Lancet.* 1986;328:391-2.
 19. Linton G, Lilford RJ. False-negative finding on chorionic villus sampling. *The Lancet.* 1986;328:630.
 20. Stetten G, Escallon CS, South ST, McMichael JL, Saul DO, Blakemore J. Reevaluating confined placental mosaicism. *Am J Med Genet.* 2004;131A:232-9.
 21. Mansfeld ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 1993;2:43-50.
 22. Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:1001-6.
 23. Cirigliano V, Voglino G, Ordóñez E, Ejarque M, Plaja A, Fuster C, et al. Evaluación de la PCR cuantitativa fluorescente para el diagnóstico prenatal rápido de anomalías cromosómicas. *Progr Diag Trat Prenat.* 2006;18:131.
 24. Lippmann A, Tomkins DJ, Shime J, Hamerton JL. Canadian multicentre randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. Final report. *Prenat Diagn.* 1992;12:476.
 25. Waters JJ, Walsh S, Levett LJ, Liddle S, Akinfenwa Y. Complete discrepancy between abnormal fetal karyotypes predicted by QF-PCR rapid testing and karyotyped cultured cells in a first-trimester CVS. *Prenat Diagn.* 2006;26:892-7.
 26. Waters JJ, Mann K, Grimsley L, Ogilvie CM, Donaghue C, Staples L, et al. Complete discrepancy between QF-PCR analysis of uncultured villi and karyotyping of cultured cells in the prenatal diagnosis of trisomy 21 in three CVS. *Prenat Diagn.* 2007;27:332-9.
 27. Allen SK, Lujaria A, Gould CP, MacDonald F, Larkins S, Davison EV. Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS. *Prenat Diagn.* 2006;26:1160-7.
 28. Lau E, Tang L, Wong C, Hang LY, Ghosh A, Leung WC, et al. Assessing discrepant findings between QF-PCR on uncultured prenatal samples and karyotyping on long-term culture. *Prenat Diagn.* 2009;29:151-5.