

## ORIGINAL

### Diagnóstico de aneuploidias en células en interfase de líquido amniótico mediante hibridación in situ fluorescente. Concordancia con el cariotipo

Carmen Ortiz García\*, María Dolores Herranz Amo, Isabel Espejo Portero, Montserrat Barcos Martínez y Cristóbal Aguilera Gámiz

Laboratorio de Genética Molecular, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España

Recibido el 21 de febrero de 2012; aceptado el 18 de abril de 2012

Disponible en Internet el 7 de junio de 2012

#### PALABRAS CLAVE

Hibridación in situ  
fluorescente;  
Aneuploidias;  
Cariotipo

#### Resumen

**Introducción:** En los últimos años la aplicación de la hibridación in situ fluorescente (FISH) permite el diagnóstico precoz de aneuploidias. El objetivo de este estudio es el análisis descriptivo mediante FISH de los líquidos amnióticos procesados en el laboratorio y la concordancia con el cariotipo.

**Material y métodos:** Análisis de 821 muestras de líquidos amnióticos (enero 2009 a diciembre 2010) remitidas por Medicina Fetal desde la semana 13 a 36 de gestación para estudio prenatal de aneuploidias, (kit Aneuvysion) con sondas centroméricas para los cromosomas X, Y y 18, y locus específicas para los cromosomas 13 y 21. El estudio se completa con el cariotipo mediante método de bandeó G.

**Resultados:** De las 821 muestras, 776 (94,52%) fueron normales y 45 (5,48%) presentaron aneuploidias: en 22 casos (48,88%) el sexo cromosómico del feto fue masculino, en las 23 restantes (51,12%) femenino. La cromosopatía más frecuente fue la trisomía 21 (19 casos en fetos masculinos y 11 femeninos), la de menor presentación fue la trisomía 13 (2 casos) que representa el 0,24% del total de los líquidos amnióticos procesados. En todos los casos, la concordancia con el cariotipo fue del 100%.

**Conclusiones:** El estudio de aneuploidias mediante FISH en núcleos en interfase en líquido amniótico permite un diagnóstico prenatal rápido de las principales cromosomopatías, siendo la trisomía 21 la más frecuentemente detectada. Los resultados del FISH coincidieron en el 100% con el cariotipo, gold estándar en el diagnóstico prenatal de cromosomopatías.

© 2012 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [carmen.ortizgarcia@yahoo.es](mailto:carmen.ortizgarcia@yahoo.es) (C. Ortiz García).

**KEYWORDS**

Fluorescence in situ hybridization;  
Aneuploid;  
Karyotype

**Diagnosis of aneuploidy in interphase cells of amniotic fluid by fluorescence in situ hybridization. Concordance with the karyotype****Abstract**

**Background:** The application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques in the last few years has led to the prenatal diagnosis of aneuploidies. The objective of this investigation was a descriptive analysis of amniotic fluids processed in the laboratory using FISH and the agreement with the karyotype.

**Material and methods:** A total of 821 amniotic fluid samples (January 2009 to December 2010) at gestational ages 13 to 36 weeks, from Fetal Medicine Unit for prenatal testing for aneuploidies (Aneuvysion kit) with centromeric probes for chromosomes X,Y and 18, and locus specific for chromosomes 13 and 21. The study was complemented by the karyotype by G-banding method.

**Results:** Of the 821 samples, 776 (94.52%) were normal and 45 (5.48%) had aneuploidy: in 22 cases (48.88%) the chromosomal sex of the foetus was male, in the remaining 23 (51.12%) female. The most common chromosomal abnormality detected was trisomy 21 (19 cases in males and 11 cases in female fetuses), the lowest performance was the trisomy 13 (2 cases) representing 0.24% of total processed amniotic fluids. In all cases, the concordance with the karyotype was 100%.

**Conclusions:** The study of aneuploidy by FISH of interphase nuclei present in the amniotic fluid enables rapid prenatal diagnosis of major chromosomal abnormalities, trisomy 21 was more frequently detected. FISH results in 100% agreed with the karyotype, the gold standard in prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities

© 2012 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El diagnóstico prenatal de aneuploidias mediante el estudio de amniocitos no cultivados, obtenidos por amniocentesis durante el segundo trimestre del embarazo en aquellas mujeres con aumento de riesgo de cromosomopatías por hibridación in situ fluorescente (FISH), es una técnica que proporciona información sobre alteraciones cromosómicas de tipo numérico en núcleos en interfase<sup>1</sup>. Aunque son numerosos los trabajos publicados acerca de la técnica FISH sobre amniocitos no cultivados<sup>2-4</sup>, no encontramos muchas referencias bibliográficas que relacionen los resultados del FISH y la concordancia con el cariotipo<sup>5-8</sup>.

Nuestro estudio se basa en un análisis descriptivo de tipo retrospectivo de los resultados obtenidos por FISH realizado a los líquidos amnióticos procesados en el laboratorio y su concordancia con los obtenidos del cariotipo, técnica considerada como gold estándar en el diagnóstico prenatal de cromosomopatías<sup>9</sup>.

**Material y métodos**

Para el estudio se recogen 821 muestras de líquido amniótico, obtenidas por amniocentesis, durante el periodo comprendido de enero de 2009 a diciembre de 2010. Las muestras proceden de la consulta de Medicina Fetal del hospital Universitario Reina Sofía. Se recogen en tubos estériles de tapón de rosca y fondo cónico con volumen suficiente, entre 8-10 mL y acompañado de la tarjeta de petición donde nos remiten los datos clínicos de la paciente. La edad gestacional osciló de 13 a 36 semanas y la técnica se indicó cuando existía al menos una de las siguientes circunstancias: antecedentes familiares/personales de

cromosomopatía, screening bioquímico positivo o bien criterios ecográficos. Tras la obtención del consentimiento informado, firmado por la paciente y el ginecólogo que realiza la amniocentesis, la muestra obtenida se separa en 2 partes: una para el estudio FISH y otra para la realización del cariotipo. Todos los FISH y parte de los cariotipos fueron realizados en la sección de Citogenética Molecular del Laboratorio del hospital Reina Sofía. El resto de los cariotipos no realizados en el hospital se enviaron a un laboratorio externo de referencia (Reference Laboratorios, Barcelona) siendo analizados, en ambos casos, mediante el método de bandeado G. Para el FISH se utilizó el kit Aneuvysion con sondas centroméricas para los cromosomas X, Y y 18, y locus específicas para los cromosomas 13 y 21, preparando las muestras según las indicaciones del fabricante. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio fluorescente de epiiluminación Nikon Eclipse 50 equipado con una lámpara de mercurio de 100 vatios.

**Resultados**

De las 821 muestras analizadas, 776 (94,52%) fueron normales y 45 (5,48%) presentaron aneuploidias; de ellas en 22 casos (48,88%) el sexo cromosómico del feto fue masculino y en las 23 restantes (51,12%) femenino. La cromosomopatía más frecuentemente detectada entre los autosomas fue la trisomía 21 (19 casos en fetos masculinos y 11 casos en fetos femeninos), lo que supone el 66,66% de las alteraciones numéricas detectadas. El 11,11% (2 casos en fetos varones y 3 fetos de sexo femenino) fueron trisomías 18, mientras que la de menor frecuencia de presentación fue la trisomía 13, solo 2 casos, lo que representa el 4,44% de los líquidos amnióticos procesados con aneuploidias. Los 8 casos

**Tabla 1** Otras aneuploidias fetales diagnosticadas por FISH y cariotipo

Aneuploidia	Número de casos	Fórmula cromosómica (FISH)	Fórmula cromosómica (cariotipo)
Síndrome de Klinefelter	1	47,XXY	47,XXY
Triploidia	3	69,XXX	69,XXX
Síndrome triple X	1	47,XXX	47,XXX
Síndrome de Turner	1	45,X	45,X
Síndrome de Turner mosaico	2	45,X/46,XX,47,XXX 45,X/46,XX <sup>a</sup>	45,X/46,XX,47,XXX 45,X/46,X+mar

<sup>a</sup> Mediante FISH se diagnostica un síndrome de Turner en mosaico con 2 líneas celulares: el 22% de las células eran 45/X y el 78% 46/XX. El cariotipo puso de manifiesto que uno de los cromosomas X era un cromosoma marcador.

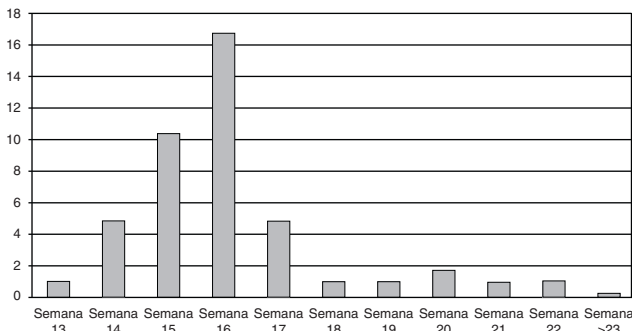
restantes, es decir, el 17,77% correspondieron a otras aneuploidias detalladas en la [tabla 1](#).

Las causas por las que se les practicó la amniocentesis a las gestantes participantes en el estudio fueron las siguientes: en el 71,37% de los casos por screening bioquímico positivo; en un 19,73% se realizó por criterios ecográficos; en el 6,69% por antecedentes personales (hijo anterior con cromosomopatía) o familiares (familiar afecto de alguna cromosomopatía); y en el 1,21% de los casos fueron criterios mixtos, ecográficos, bioquímicos y/o por antecedentes personales/familiares. No consta el motivo en el 1% de los casos. La amniocentesis fue realizada entre la semana 13 y 36 de gestación, siendo la semana 17 en la que con más frecuencia se ha practicado, en un 31,42%, seguida de la semana 16 en un 26,06%, la semana 15 en el 18,51% y la semana 18 en el 7,42%, disminuyendo la frecuencia en el resto de las semanas ([tabla 2](#)). La frecuencia de aneuploidias en relación con la semana de gestación se representa en la [figura 1](#).

Se realizaron un total de 799 cariotipos. No se pudo llevar a cabo en 22 casos porque los cultivos no crecieron, lo que representa el 2,67% del total de las amniocentesis que se practicaron. En estos casos, solo se realizó el FISH. De ellos, en 20 muestras no se detectaron aneuploidias para los cromosomas estudiados mientras que en 2 casos fue el FISH el que puso de manifiesto una trisomía 13 en la semana 13 y una trisomía 21 en la semana 16. En todos los casos en los que se realizó FISH y cariotipado la concordancia fue del 100%.

# Discusión

La capacidad para la detección de anomalías cromosómicas mediante FISH ha mejorado en los últimos años



En el eje vertical se representa el número de casos de aneuploidias en cada semana de gestación.

**Figura 1.** Frecuencia de aneuploidias en relación con la edad gestacional.

debido al perfeccionamiento de las sondas cromosómicas específicas<sup>10</sup>, lo que permite el diagnóstico de aneuploidias de forma más precoz que con las técnicas citogenéticas convencionales como es el cariotipo, permitiendo no solo el diagnóstico de anomalías cromosómicas, sino la posibilidad de anticipar el consejo genético<sup>11</sup>.

En nuestro trabajo los criterios que con más frecuencia han llevado al estudio citogenético han sido el screening bioquímico positivo seguido del cribado ecográfico. En ambos casos está indicado realizar el método más rápido de que se disponga, así como cuando las anomalías detectadas por ecografía requieran tomar decisiones obstétricas lo más precozmente posible. Hay una urgencia similar cuando la edad de la gestación está llegando al límite legal del aborto terapéutico. Esta situación es muy común tras el screening del suero materno en el segundo trimestre<sup>12</sup>, si bien el screening

**Tabla 2** Aneuploidias detectadas por FISH y cariotipo en relación con la semana de gestación

Semana	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	>23
46 cromosomas			139	196	254	59	8	29	25	31	26
Trisomía 21		1	8	14	3	1		1	1	1	
Trisomía 18		3	1		1						
Trisomía 13	1						1				
Triploidia			1	1				1			
Mosaicismo			1	1							
47,XXY					1						
45,X0		1									
47,XXX				1							

combinado de aneuploidias en el primer trimestre aplicado a todas las gestantes independientemente de la edad ha contribuido al descenso del número de pruebas invasivas que hay que realizar en gestantes mayores de 35 años con el consiguiente descenso del número de pérdidas reproductivas como consecuencia de la amniocentesis<sup>13</sup>.

En nuestra experiencia, la trisomía 21 fue la alteración cromosómica más frecuente. Este dato es concordante con los disponibles en la bibliografía<sup>14</sup> demostrando tanto el FISH como el cariotipo ser técnicas con una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de trisomía 21 así como de las otras aneuploidias estudiadas, no encontrándose ni falsos positivos ni falsos negativos.

En los casos de mosaicismo en nuestro estudio, el FISH realizado sobre los núcleos en interfase no cultivados ha permitido descartar que se traten de pseudomosaicismos, siendo esta técnica más fiable que el diagnóstico realizado por los métodos citogenéticos convencionales; por lo tanto, el FISH es capaz de poner de manifiesto la coexistencia de 2 poblaciones celulares con diferente dotación cromosómica<sup>12</sup>. Además, el FISH se ha mostrado muy útil en los casos en los que el cariotipo no se ha podido realizar debido a que en el cultivo de los amniocitos no se han obtenido metafases o el número de ellas no han sido suficientes para poder efectuarlo, diagnosticándose solo por FISH una trisomía 13 y otra 21. En todos los demás casos los resultados obtenidos mediante FISH y cariotipo coincidieron al 100%. Por tanto, ambos métodos poseen gran fiabilidad.

Actualmente se están utilizando otras técnicas moleculares como la QF-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente) que posee una sensibilidad y especificidad similar al FISH y cariotipo para la detección de aneuploidias fetales<sup>15,16</sup>. Esta técnica utiliza varios marcadores polimórficos por cromosoma, permitiendo una alta fiabilidad, rapidez puesto que los resultados se obtienen en menos de 24 h, automatización, lo que permite analizar un gran número de muestras<sup>17</sup> y bajo costo. La QF-PCR presenta limitaciones para la detección de mosaicismos de bajo grado<sup>18,19</sup>, limitación presente en otras técnicas de diagnóstico molecular, aunque sí los reconoce cuando una de las líneas celulares anómalas está presente en al menos un 20% de las células<sup>16,17</sup>. Otra limitación de esta técnica radica en la dificultad para distinguir sujetos homocigotos o monosómicos cuando se quieren descubrir anomalías en los cromosomas sexuales. En aquellas muestras de líquido amniótico correspondientes a fetos femeninos XX normales se pueden obtener perfiles homocigotos de QF-PCR, indiferenciables de aquellos producidos con un único cromosoma X, como es el síndrome de Turner, con lo cual existe la posibilidad de confusión en una homocigosis. En ocasiones, se obtienen perfiles alélicos normales y anormales para un mismo cromosoma; en estos casos habría que continuar haciendo otro tipo de estudios, FISH o cariotipo, para identificar las causas por las que esto ocurre<sup>20,21</sup>. Por tanto, ambos tests, FISH y QF-PCR, muestran una sensibilidad y especificidad elevada. La aplicación de una u otra técnica va a depender de las preferencias de los laboratorios así como del volumen de muestras y de los costes<sup>16</sup>.

En conclusión, en nuestra experiencia las principales ventajas del FISH son, por un lado, la gran concordancia con el cariotipo, puesto que se han detectado el 100% de las aneuploidias estudiadas. Es un método rápido, los

resultados se obtienen en 3 días. Permite detectar la contaminación de la muestra con sangre materna mediante morfología celular con coloración DAPI. Alta fiabilidad en la detección de mosaicismos, debido a la posibilidad de contar un alto número de núcleos celulares. Asimismo, detecta las principales causas de malformaciones fetales debidas a aneuploidias de los cromosomas estudiados.

Por otro lado, esta técnica presenta también limitaciones, puesto que necesita de personal técnico entrenado y facultativos con experiencia en microscopía de fluorescencia y morfología celular. En nuestro laboratorio esto no supone una limitación ya que disponemos de técnicos y facultativos entrenados y también empleamos la tecnología FISH para el estudio de microdelecciones y pintado cromosómico.

Finalmente, aunque el cariotipo sigue siendo el gold estándar en el diagnóstico prenatal de cromosopatías, consideramos que el FISH es un procedimiento útil en el laboratorio para el despistaje precoz de aneuploidias entre la población gestante de riesgo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Hogge WA, Surti U, Kochmar SJ, Mowery-Rushton P, Cumbie K. Molecular cytogenetics: an essential component of modern prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:352-7.
2. Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat Diagn.* 1997;17:333-41.
3. D'Alton ME, Malone FD, Chelmon D, Ward BE, Bianchi DW. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:769-74.
4. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 1998;18:901-6.
5. Chan J, Shu W, Yan MA, Yong L, Yan SI, Land YU, et al. Fluorescence in situ hybridization in uncultured amniocytes for detection of aneuploidy in 4210 prenatal cases. *Chin Med J.* 2011;124:1164-8.
6. Wyandt HE, Tonk VS, Huang XL, Evans AT, Milunsky JM, Milunsky A. Correlation of abnormal rapid FISH and chromosome results from amniocytes for prenatal diagnosis. *Fetal Diagn Ther.* 2006;21:235-40.
7. Liu H, Liao C, Huang YN, Pan M, Yi CX, Yuan S, et al. Application of fluorescence in situ hybridization to prenatal diagnosis of aneuploidy in 110 uncultured amniotic fluid samples. *China J Med Genet (Chin).* 2010;27:453-6.
8. Lim HJ, Kim YJ, Yang JH, Kim EJ, Choi JS, Jung SH, et al. Amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of aneuploidy: experience in 130 prenatal cases. *J Korean Med Sci.* 2002;17:589-92.
9. Wilson RD. Early amniocentesis. *Prenat Diagn.* 1995;15:1259-73.
10. Galán E. Aplicaciones del laboratorio de citogenética a la clínica. *Pediatr Integral.* 2002;6:820-30.

11. Galán E. Consejo genético. *Protoc Diagn Ter Pediatr*. 2010;1: 51-55 [consultado 10 Ene 2012]. Disponible en: [http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/consejo\\_genetico.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/consejo_genetico.pdf).
12. Tóth A, Tardy EP, Hajdu K, Bátorfi J, Duszpod J, Egyed J, et al. Fluorescence in situ hybridization of chorionic interphase cells for prenatal screening of Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94:46-50.
13. Márquez P, Barrero F, Robles JL, Veguilla M, Omari Y. Cribado combinado del primer trimestre para trisomía 21 Nuestra experiencia en los dos primeros años. *Rev Lab Clin*. 2011;4:98-101.
14. Hijona JJ, Zorrilla A, Frutos FJ, Contreras A, Pallarés C, Torres J. Amniocentesis genéticas durante los últimos 6 años en nuestro hospital. *Clin Invest Ginecol Obstet*. 2011;38:38-43.
15. Sparkers R, Johnson JA, Langlois S, Wilson RD, Allen V, Blight C. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can*. 2008;30:617-21.
16. Faas BH, Cirigliano V, Bui TH. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16:81-7.
17. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Cañadas MP, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn*. 2009;29:40-9.
18. Iguaz F, Fernández MA, Borque L. Valoración de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (QF-PCR) para el diagnóstico rápido de aneuploidias. *Rev Lab Clin*. 2009;2:169-77.
19. Badenas C, Rodríguez-Revenga L, Morales C, Mediano C, Plaja A, Pérez-Iribarne MM, et al. Assessment of QF-PCR as the first approach in prenatal diagnosis. *J Mol Diagn*. 2010;12: 828-34.
20. Association for Clinical Cytogenetics. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines (2007) [consultado 16 Ene 2012]. Disponible en: [http://www.cytogenetics.org.uk/prof\\_standards/professional\\_standards.htm](http://www.cytogenetics.org.uk/prof_standards/professional_standards.htm).
21. Hulthen M, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorder: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction*. 2003;126:279-97.