

Original

Hibridación *in situ* con fluorescencia de células coriónicas en interfase para el *screening* prenatal del síndrome de Down

András Tóth, Erika P. Tardy, Krisztina Hajdu, József Bátorfi, József Duszpod, Jenő Egyed, István Gáti

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Semmelweis, Facultad de Ciencias de la Salud, Szabolcs u.35, H-1135 Budapest, Hungría

Aceptado: 21 febrero 2000

Resumen

Objetivo: Nuestro objetivo fue determinar la utilidad de la hibridación *in situ* con fluorescencia de células de las vellosidades coriónicas en interfase para el diagnóstico prenatal del síndrome de Down. **Métodos:** Se analizaron 336 muestras de vellosidades coriónicas mediante preparación directa de los cromosomas y FISH con una sonda de ADN específica del cromosoma 21. Las muestras se obtuvieron como parte de la investigación y del control obstétrico sistemático. **Resultados:** El muestreo y el cariotipo directo fue satisfactorio en todos los casos. Al menos 50 células se valoraron por FISH en 331 de 336 muestras. Ambos métodos demostraron el síndrome de Down en 12 casos. Las investigaciones de control demostraron que no había ningún resultado falso negativo ni falso positivo con estos procedimientos. **Conclusión:** En función de estos resultados y de que es posible analizar por FISH de la interfase al menos diez veces más células que por los métodos citogenéticos convencionales, y que estas células se originan de diferentes tejidos de las vellosidades coriónicas, se concluye que FISH aumenta la fiabilidad del diagnóstico. Sin embargo, son necesarios más datos para realizar un análisis estadístico correcto. Puesto que este método es más barato y consigue el diagnóstico antes que el cultivo celular, se sugiere realizar una combinación de la preparación directa de los cromosomas y FISH en las vellosidades coriónicas para el *screening* del síndrome de Down prenatal. © 2001 Elsevier Science Ireland LTD. Reservados todos los derechos.

Palabras clave: Hibridación *in situ* con fluorescencia; Síndrome de Down; Vellosidades coriónicas; *Screening* prenatal.

Introducción

El diagnóstico citogenético prenatal se ha convertido en una técnica que se realiza sistemáticamente en mujeres que tienen un riesgo mayor de alteraciones cromosómicas. El primer método sistemático fue la amniocentesis en el segundo trimestre con análisis citogenético de las células del líquido amniótico cultivadas. Actualmente, existen varias técnicas de muestreo y métodos de laboratorio, de forma que es posible elegir el más apropiado, dependiendo de algunas condiciones (por ejemplo, situación anatómica, razones para la investigación, edad gestacional).

El análisis citogenético convencional de los tejidos cultivados necesita largo tiempo y mucho trabajo para aumentar el número de células en división, que es el

prerrequisito del análisis cromosómico convencional. Esta técnica requiere técnicos muy entrenados y es muy cara.

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas de ADN específicas facilita la detección de aberraciones cromosómicas numéricas y de otro tipo, incluso con los núcleos en interfase. El análisis citogenético de la interfase por FISH permite puntuar a los cromosomas en células que no se están dividiendo [1].

Por ejemplo, una célula que presenta trisomía del cromosoma 21 tiene tres señales, mientras que una célula normal tiene dos. Se han publicado numerosos trabajos que presentan la experiencia clínica de FISH sobre amniocitos no cultivados en el diagnóstico prenatal [2-7]. Sin embargo, si sólo utilizamos células amnióticas no cultivadas, no obtenemos

información de todo el conjunto de cromosomas. De acuerdo con nuestra experiencia, por este motivo, la técnica FISH aplicada sobre las vellosidades coriónicas es incluso más favorable para el *screening* del síndrome de Down fetal. Es posible usar la preparación directa de cromosomas, que es más barata que el cultivo y la paciente puede ser informada en un tiempo más corto. El método FISH puede aumentar la fiabilidad del diagnóstico.

El objetivo de este estudio fue valorar la exactitud, la utilidad y las limitaciones del método FISH sobre las vellosidades coriónicas, como parte del diagnóstico citogenético prenatal sistemático del síndrome de Down.

Materiales y métodos

Durante el período transcurrido desde enero de 1996 a abril de 1999, se realizaron FISH y preparación directa de los cromosomas en 336 muestras de vellosidades coriónicas consecutivas en el grupo de estudio. La edad de gestación de las pacientes osciló de 10 a 20 semanas. Se ofreció la técnica de FISH a aquellas pacientes que cumplieron al menos una de las siguientes indicaciones: sospecha de síndrome de Down por ecografía, un hijo anterior con síndrome de Down, pruebas de *screening* de suero materno indicativas de síndrome de Down o edad materna entre 35 y 38 años. Las mujeres gestantes que no se incluyeron en el estudio se analizaron por cultivos a largo plazo y preparación cromosómica directa, o se realizó una amniocentesis.

Tras el consejo genético, se realizó un muestreo transabdominal de las vellosidades coriónicas abdominales (MTAVC). El MTAVC se hizo en condiciones estériles bajo guía ecográfica continua, usando la técnica de doble aguja. Las agujas aplicadas fueron de calibre 15 y 20 de diámetro externo. Puesto que esta técnica necesita un diámetro mayor, los procedimientos se hicieron con anestesia local, con el fin de reducir el malestar de la paciente. No hubo ningún muestreo fallido. Cuando la placenta (corion frondoso) parecía ser inalcanzable según la exploración ecográfica realizada antes de esta intervención, el muestreo se retrasó a una edad de la gestación más tardía, en la que se hizo una amniocentesis (esas pacientes no se incluyeron en el estudio). Siempre hemos tratado de evitar la infección transamniótica por la aguja. Las muestras se separaron en tres partes –una para la preparación cromosómica directa, la otra para FISH y una pequeña cantidad de vellosidades se reservó para el cultivo si uno de estos métodos, previa-

mente mencionados, fallaba–. Las preparaciones directas se hicieron por el método de Simoni et al. modificado [8]. Brevemente, las vellosidades se incubaron por la noche a 37°C en el medio de Chang. Después de un tratamiento con colcemida, hipotonización y fijación, las muestras se deshidrataron en una serie de varios alcoholes. Las células de las vellosidades se disociaron en una solución de ácido acético al 40 y 60% y la suspensión se colocó en portaobjetos microscópicos templados. Las vellosidades destinadas a FISH se disociaron con tripsina y colagenasa según el método de Bryndorf et al. [9] y las suspensiones celulares se colocaron en un portaobjetos para microscopio con silicona. Para este estudio utilizamos primero una sonda de ADN cCMP21.a (Cambio) marcada con biotina y después una sonda de ADN Qe21 (Oncor) marcada con DIG, que son específicas del brazo largo del cromosoma 21.

El procedimiento se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio OPTON (Zeiss, Alemania) equipado con una lámpara de mercurio HBO 200 w/4.

Se registró el número de señales fluorescentes por núcleo. En cada caso se puntuaron 100-200 células. Si no había al menos 50 núcleos evaluables, el procedimiento no se consideró satisfactorio.

Se envió un cuestionario a todas las pacientes después del parto para conocer el resultado de la gestación.

Resultados

En el período del estudio se realizaron 336 MTAVC para FISH y preparación directa de los cromosomas. La prueba FISH se consideró insatisfactoria en cinco casos porque se puntuaron menos de 50 núcleos, pero incluso en estas preparaciones existían 40 células analizables. Con el análisis cromosómico directo se encontraron 12 muestras que tenían un cariotipo característico de síndrome de Down (SD). En la Tabla 1 se presenta la distribución de las señales de FISH por núcleo cuando la preparación directa de los cromosomas de las vellosidades coriónicas no demostraba la presencia de SD (n=324). Se puntuaron dos señales con la sonda de ADN cCMP21.a en el 88,54% (DE \pm 4,85, intervalo: 66,7-93,55) de las células. Esta tasa fue del 91,22% (DE \pm 3,64, intervalo: 73-97,41) con la sonda QE21. En la Tabla 2 se presenta la distribución de las señales en los casos de SD. Se puntuaron tres señales por cCMP21.a (n=3) en el 79,62% de los núcleos (intervalo: 72,3-87,45) y el 86,94% (intervalo: 81,1-94,57) de

Tabla 1
Distribución de señales en casos normales (n=234)

	Una señal (%)	Dos señales (%)	Tres señales (%)	Cuatro señales (%)
cCMP21.a(N=77)	7,91	86,54	3,63	1,57
Intervalo	0,00-14,95	66,7-93,55	0,89-19,3	0,00-10,71
QE21 (N=247)	5,56	91,22	2,16	0,99
Intervalo	1,3-23,00	73,00-97,41	0,00-8,57	0,00-6,52

Tabla 2
Distribución de señales en casos con síndrome de Down (n=234)

	Una señal (%)	Dos señales (%)	Tres señales (%)	Cuatro señales (%)
cCMP21.a (N=3)	4,29	13,99	79,62	1,89
Intervalo	1,74-7,72	6,82-18,64	72,3-87,45	1,37-2,61
QE21 (N=9)	1,35	8,85	86,94	3,19
Intervalo	0,00-4,08	2,33-15,54	81,1-94,57	2,14-4,27

los núcleos mostró tres señales con la sonda de ADN QE21 en nueve casos de trisomía.

El modelo de hibridación de los tres casos de trisomía fue claramente distinto del observado en las células normales. En función del estudio de seguimiento, no hubo ningún falso negativo ni falso positivo en este estudio.

Las gestaciones con resultados anormales se interrumpieron, siguiendo los deseos de la paciente. Después de la interrupción de la gestación en 12 casos de SD, quedaban disponibles nueve fetos para el análisis citogenético. Los nueve cultivos de fibroblastos confirmaron el diagnóstico original.

Discusión

La amniocentesis y el muestreo transabdominal de las vellosidades coriónicas se utilizan sistemáticamente en nuestro laboratorio de citogenética, pero generalmente se prefiere realizar MTAVC incluso en el segundo y tercer trimestre de la gestación. Se prefiere el MTAVC a la amniocentesis porque el resultado se obtiene en pocos días por determinación directa del cariotipo. Está indicado realizar el método más rápido de que dispongamos cuando las anomalías detectadas por ecografía requieran tomar decisiones obstétricas rápidamente. 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. En los casos de oligohidramnios y anhidramnios, las biopsias placentarias son más fáciles de realizar que la amniocentesis o el muestreo de sangre fetal.

Hay pocos artículos sobre muestreo tardío de las vellosidades coriónicas [10,11]. En función de nuestras experiencias con casi 4.000 MTAVC, la tasa de aborto de este método está por debajo del 1%, de forma que no hay diferencia en comparación con la amniocentesis, desde este punto de vista, incluso en edades gestacionales más tardías. Por esto, no restringimos el MVC (muestreo de las vellosidades coriónicas) tardío al grupo de alto riesgo en nuestra rutina clínica. Entre otros, el estudio de Cederholm y Axelsson [12] reveló que la amniocentesis precoz tiene una tasa de aborto más alta y más resultados insatisfactorios que el MVC, de forma que el MVC parece más adecuado también en este período.

En un estudio realizado en colaboración por Hahnemann y Vejerslev [13] se demostró que el diagnóstico citogenético de las células trofoblásticas tenía un riesgo bajo, pero apreciable, de resultados falsos. Se encontró un resultado citogenético

ambiguo en el 1,51% de las muestras del MVC. Se ofreció amniocentesis, o más raramente, cordocentesis, cuando el muestreo de las VC mostraba mosaicismo. Sin embargo, el consejo genético antes de realizar estos procedimientos depende del tipo de aberración cromosómica y el resultado de la investigación ecográfica también influye en la decisión. El diagnóstico de falsos negativos es un problema más difícil, pero afortunadamente esta discrepancia se produjo sólo en el 0,03% de los casos [13]. La gran mayoría de los casos falsos negativos se diagnosticó sólo por preparación directa. Por esto, se recomienda además realizar cultivo celular. En el caso de la preparación directa, se investigan las células trofoblásticas y después del cultivo de las vellosidades coriónicas, se evalúan las células mesenquimáticas. El análisis de dos tipos celulares diferentes con dos métodos distintos tiene gran fiabilidad, y la posibilidad de que al menos uno de los dos métodos sea satisfactorio es cercana al 100%. Sin embargo, el cultivo de células es caro y generalmente se tarda dos o tres semanas en dar el diagnóstico a la paciente.

Hemos introducido el análisis FISH de los núcleos en interfase como método alternativo a la preparación cromosómica directa.

Usando el FISH es posible conseguir resultados incluso en un tiempo más corto que con la preparación directa, lo que significa que las pacientes pueden conocer el resultado en tres días. Es importante hacer esfuerzos para dar el resultado a los padres lo más rápidamente posible.

El mosaicismo cromosómico (linajes celulares con complementos cromosómicos diferentes) es la situación más frecuente, lo que influye en la fiabilidad del resultado. La primera tarea es distinguir entre el verdadero mosaicismo y pseudomosaicismo [14]. El pseudomosaicismo es un artefacto del cultivo tisular. Puesto que los análisis de FISH pueden dar información sobre núcleos en interfase no cultivados, se excluye la observación de pseudomosaicismo. El reconocimiento del verdadero mosaicismo por FISH de la interfase es más fiable que con los métodos citogenéticos convencionales, puesto que el número de células analizadas está generalmente entre 100 y 200, en comparación con el análisis cromosómico en metafase, donde se investigan generalmente 10-15 células. La selección clonal durante el cultivo celular puede alterar el resultado del análisis citogenético convencional. Otra ventaja del ensayo FISH basado en células no cultivadas es que los resultados reflejan la distribución *in vivo* de linajes celulares diferentes cromosómicamente. El hallazgo del mosaicismo en las vellosidades coriónicas que no está

presente en el feto (mosaicismo placentario confinado) no es simplemente un resultado falso, sino que frecuentemente tiene consecuencias clínicas para la gestación.

Es probable que en un futuro cercano, el análisis de FISH en la interfase se ayude de un sistema computadorizado, y de esta forma podrán puntuarse más núcleos con menos trabajo y tiempo.

La digestión de las vellosidades coriónicas antes de FISH aporta células de las capas mesenquimática y citotrofoblástica. Igualmente que con la combinación directa/cultivo, la fiabilidad del análisis es muy alta. La exactitud de FISH se basa en parte en la concordancia con la preparación directa. Los resultados se confirmaron después del parto (el 96% de los pacientes devolvieron los cuestionarios) y también se confirmaron los resultados positivos cuando los fetos tenían posibilidades de investigación (9 de 12 casos). La FISH de la interfase también puede ser útil para confirmar el diagnóstico cuando la calidad y número de metafases es escasa. Esto da una tasa de éxito muy alta del análisis.

La desventaja de FISH es que la sonda cromosómica específica marca sólo el cromosoma investigado. Usando cinco sondas para las aneuploidías más frecuentes (X, Y, 13,18 y 21), sólo se detectaron el 65% de las alteraciones cromosómicas [15]. Sin embargo, encontramos una tasa de detección del 83% si sólo se incluían aquellos casos que tenían mayor riesgo de ciertas aneuploidías (por ejemplo, se excluyeron las pacientes con translocación). Puesto que la preparación cromosómica directa da información sobre todas las anomalías cromosómicas, es suficiente centrarse en la anomalía cromosómica que tiene mayor riesgo. En el caso de amniocentesis, no es posible hacer una preparación directa de los cromosomas, puesto que las células no cultivadas no se están dividiendo, por lo que es necesario esperar el resultado de un cultivo a largo plazo.

En nuestra práctica, se investigó el cromosoma 21 en la mayoría de los casos porque es la alteración cromosómica más frecuente en recién nacidos y esta anomalía tiene consecuencias graves a largo plazo para la familia. Sin embargo, dependiendo de la razón del análisis, pueden utilizarse sondas específicas para diferentes cromosomas.

Se utilizan diferentes tipos de sondas específicas para detectar la trisomía 21.

La sonda del satélite alfa 13-21 no se incluyó en este estudio porque, de acuerdo con la literatura [16] y con nuestros experimentos preliminares, esta sonda no permite la diferenciación fiable entre los casos normales y anormales en los núcleos en interfase. Además, hay algunos informes sobre la hibridación cruzada de esta sonda [17,18]. La sonda QE21 dio señales más intensas que la sonda cCMP21.a. La razón es que la secuencia diana de QE21 es cinco veces más larga que la de cCMP21.a, y como la primera está marcada con digoxigenina en vez de con biotina, el ambiente tiene menos "ruidos", con lo que se consigue una puntuación más fácilmente y resultados más significativos.

Nadal et al. [19] concluyeron que la duplicación de las regiones distales a 21q22 contribuye a las principales caracte-

terísticas del SD. Puesto que las sondas cCMP21.a y QE21 son específicas para esta región crítica del cromosoma 21, esto da un diagnóstico fiable, incluso en el caso de existir anomalías estructurales del cromosoma 21. Aunque no había anomalías estructurales del cromosoma 21 en nuestros casos prenatales, encontramos un niño durante el análisis postnatal de sangre periférica con una traslocación 21/21 y otro niño con una reorganización compleja del cromosoma 21 [20]. Ambos pacientes tenían características de SD y aproximadamente el 90% de sus núcleos de linfocitos en interfase presentaban tres señales.

Hubo una variación en el intervalo de núcleos que mostraban una, dos, tres o cuatro señales (Tablas 1 y 2). Los núcleos que mostraban una señal en casos normales pueden atribuirse a baja eficacia de hibridación o a dos señales de hibridación muy cercanas. Puesto que los embriones con monosomía generalmente no sobreviven hasta la edad de gestación del diagnóstico prenatal, este resultado no influye en la fiabilidad.

Pueden detectarse tres de cuatro señales si la hibridación no es suficientemente específica debido a razones técnicas (ambiente "ruidoso") o se ven dos señales dobles debidas a cromátidas separadas en la fase G-2 de los núcleos. Hasta cierto grado se producen células poliploides en la placenta sin consecuencias dañinas. En casos de trisomía pueden producirse dos señales debido a la contaminación celular materna. Bryndorf et al. [9] encontraron que la tasa media de contaminación celular materna por muestra era del 0,3%. Esta tasa baja no produce problemas en la evaluación de las señales de FISH, pero puede producir dificultades con diagnósticos basados en técnicas de RCP. La selección cuidadosa de las vellosidades coriónicas de la decidua puede reducir esta posibilidad.

El mayor valor con tres señales (19,3%) en nuestro grupo de cCMP21.a normal se observó en un solo caso. Nuestros resultados indican que la variación de señales de los núcleos no influye en la fiabilidad, y las distribuciones de señales fueron muy significativas entre los casos normales y anormales.

Los resultados de este estudio recomiendan la utilización combinada del análisis de las vellosidades coriónicas por tecnología citogenética directa y FISH. El coste de FISH es aproximadamente un quinto del método de cultivo.

Este procedimiento permite una identificación exacta y barata del síndrome de Down en un tiempo significativamente menor en comparación con los métodos convencionales. Aunque la conclusión final sobre la eficacia necesita una experiencia mayor, este procedimiento se ha convertido en una parte integral de nuestro *screening* citogenético prenatal sistemático en una población de mujeres gestantes con mayor riesgo de síndrome de Down.

Referencias

- [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] Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21 by fluorescence *in situ* hybridization to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 1991;49:112-9.
- [3] Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, Pavelka K, Dackowski W. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992;55-65.
- [4] Spathas DH, Divane A, Maniatis GM, Ferguson-Smith ME, Ferguson-Smith MA. Prenatal detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization: a prospective study. *Prenat Diagn* 1994;14:1049-54.
- [5] 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.
- [6] D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D, Ward BE, Bianchi DW. Defining the role of fluorescence *in situ* hybridization on fluculture amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:769-76.
- [7] Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel Reppel JT. A prospective comparative study on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn* 1998;18:901-6.
- [8] Simoni G, Gimelli G, Cuoco C, Terzoli BL, Ferari M, Fraccaro M. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet* 1983;63:239-57.
- [9] Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Carelli MP, Ward BE, Klinger KW, Bang J, Philip J. Prenatal detection of chromosome aneuploidies in uncultured chorionic villus samples by FISH. *Am J Hum Genet* 1996;59:918-26.
- [10] Szabó J, Gellén J, Szemere Gy. Why confine chorionic villus (placental) biopsy to the first trimester? *Lancet* 1986;1:1030.
- [11] Holzgreve W, Miny P, Gerlach B, Westendorp A, Ahlert D, Horst J. Benefits of placental biopsies for rapid karyotyping in the second and third trimesters (late chorionic villus sampling) in high-risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1188-92.
- [12] Cederholm M, Axelsson O. A prospective comparative study on transabdominal chorionic villus sampling and amniocentesis performed at 10-13 weeks gestation. *Prenat Diagn* 1997;17:311-7.
- [13] Hahnemann JM, Vejerslev LO. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS) diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centers contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn* 1997;17:801-20.
- [14] Schwartz S, Leana-Cox J. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH): a new application in the delineation of true vs. pseudomosaicism in prenatal diagnosis. *Prenat Genet* 1993;13:661-70.
- [15] Evans MI, Klinger KW, Nelson BI, Shook D, Holzgreve W, McGuire N, Johnson MR. Rapid prenatal diagnosis by fluorescent *in situ* hybridization of chorionic villi: an adjunct to long-term culture and karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1522-5.
- [16] Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, Oury JF, Séro S, Nessmann C. Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 1994;14:79-86.
- [17] Verlinsky Y, Ginsberg N, Chmura M, Freidine M, White M, Strom C, Kuliev A. 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* 1995;15:831-4.
- [18] Tardy E, Tóth A. Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA to chromosome 22 or a rare polymorphism. *Prenat Diagn* 1997;17:487-8, Letter.
- [19] Nadal M, Milá M, Pritchard M, Mur A, Pujals J, Blouin JL, Antonarakis SE, Ballesta F, Estivil X. YAC and cosmid FISH mapping of an unbalanced chromosomal translocation causing partial trisomy 21 and Down syndrome. *Hum Genet* 1996;98:460-6.
- [20] Tardy E, Tóth A, Kosztolányi Gy. Preanatal exclusion of segmental trisomy in familial chromosome 21 pericentric inversion by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 1997;17:871-3.