



Beatriz Rojas Pérez-Esquerra.

## Incorporación de los test no invasivos de diagnóstico prenatal al cribado de cromosopatías fetales

Rojas Pérez-Esquerra B<sup>1</sup>, Aragón Sanz MA<sup>1</sup>, Tapia Lanuza A<sup>2</sup>, Guardia Dodorico L<sup>1</sup>, Maduta T<sup>1</sup>, García Lasheras AJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Ginecología y Obstetricia.

Hospital de Barbastro. Huesca

<sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos.

Hospital de Barbastro. Huesca

Dirección para correspondencia: brojasp@salud.aragon.es

### Resumen

**Objetivo:** El diagnóstico prenatal de cromosopatías en España, sobre todo síndrome de Down, ha cambiado de forma drástica en los últimos años. En el sector sanitario de Barbastro, perteneciente al Servicio Aragonés de Salud, en 2005 estábamos realizando pruebas invasivas para obtención de cariotipo fetal al 25% de la población gestante. Diez años después, gracias a la mejora de los métodos de cribado y a la incorporación del estudio de ADN fetal en sangre materna, el 2% de las embarazadas se sometieron a amniocentesis. Esto ha supuesto una clara disminución del coste económico en el diagnóstico de aneuploidías, sin afectar a la tasa de detección.

**Métodos:** Se han analizado las amniocentesis realizadas en un periodo comprendido entre el 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2015, y los cribados combinados de primer trimestre desde 2011. Se revisan las indicaciones, la tasa de detección y el número de abortos asociados a la prueba.

**Resultados:** En 2005 realizábamos unas 200 amniocentesis al año, la mayoría en gestantes que no se sometían a ningún tipo de cribado y se indicaban por edad mayor a 35 años y ansiedad materna. A partir de 2008 el número de estas pruebas empezó a disminuir progresivamente, primero por la incorporación del cribado combinado de primer trimestre, y después por la erradicación del criterio edad materna como motivo de amniocentesis. En 2015, la incorporación de pruebas mucho más sensibles, como es el estudio de ADN fetal en sangre materna, ha hecho caer el número de pruebas invasivas hasta únicamente 16 al año.

**Conclusiones:** Las pruebas invasivas de diagnóstico prenatal no pueden aplicarse de forma universal por el alto riesgo de aborto que conllevan. Con el objetivo de minimizarlas al máximo se han ido desarrollando estrategias de cribado para intentar convertirlas en prácticamente pruebas de diagnóstico. En los próximos años, la universalización del estudio de ADN fetal en sangre materna va a mejorar las tasas de detección de cromosopatías con una clara disminución de las amniocentesis y el gasto económico que estas conllevan.

*Palabras clave:* ADN fetal; Amniocentesis; Cribado combinado; Cromosomopatías; Síndrome de Down.

## **Incorporation of the non-invasive prenatal testing to the screening of fetal chromosomal abnormalities**

### **Abstract**

*Objective:* In the last years Prenatal Diagnosis for aneuploidy, especially Down's syndrome, has changed drastically in Spain. During 2005, in public health area of Barbastro Hospital we were performing invasive test to obtain fetal karyotype in 25% of the pregnant population. Ten years later, thanks to improved screening methods and the incorporation of the study of fetal DNA in maternal blood, 2% of pregnant women undergoing amniocentesis. This has led to a clear decrease in economic costs in the diagnosis of aneuploidy, without affecting the detection rate.

*Methods:* We analyzed amniocentesis performed in a period from January 1, 2005 to December 31, 2015, and the combined first trimester screening since 2011. We reviewed the indications, the detection rate and the number of abortions associated to the test.

*Results:* In 2005 we performed 200 amniocenteses, mostly in pregnant women who did not submit to any kind of screening and older indicated by 35 and maternal anxiety. Since 2008 the number of these tests began to decrease gradually, first by the introduction of the combined first trimester screening, and then to eradicate maternal age criteria as grounds for amniocentesis. In 2015, the addition of more sensitive tests such as the study of fetal DNA in maternal blood, has brought down the number of invasive tests to only 16 per year.

*Conclusions:* Invasive prenatal diagnostic tests cannot be applied universally by the high risk of abortion involved. In order to minimize the maximum, they have developed screening strategies attempt to make them virtually diagnostic tests. In the coming years, the universalization of the study of fetal DNA in maternal blood will improve detection rates of chromosomal abnormalities with a clear decrease of amniocentesis and the economic cost they entail.

*Key words:* Amniocentesis; Combined screening; Cromosomopathies; DNA fetal; Down's syndrome.

### **Introducción**

En los últimos 40 años, el cribado y diagnóstico de cromosomopatías fetales ha ido, desde la realización de amniocentesis en el segundo trimestre por edad materna avanzada entendida como más de 35 años en el parto,

hasta la posibilidad de biopsia corial en el primer trimestre a únicamente las pacientes de alto riesgo identificadas por la medición de la translucencia nuchal (TN) entre las 11-13,6 semanas de gestación y la bioquímica sérica con determinación de la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A).

Con la primera opción se diagnosticaban un 30% de los síndromes de Down con una tasa de falsos positivos (FP) del 5%, mientras que con la segunda se ha alcanzado tasas de detección del 90% con unos FP del 3-5%<sup>1</sup>.

Al final de la década de los noventa, estudios liderados por el grupo de Lo<sup>2</sup> demostraron la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) fetal en altas concentraciones en plasma materno desde etapas precoces del embarazo. Esto abrió un campo para el diagnóstico de las más frecuentes cromosomopatías fetales, siendo validado por múltiples estudios que han demostrado unas tasas de detección para trisomía 21 en embarazos únicos del 99% y FP del 0,08%, del 96,8% y FP del 0,15% para trisomía 18, y del 92,1% con FP del 0,20% para trisomía 13<sup>3,4</sup>.

En marzo de 2015 comenzamos a incorporar el estudio de ADN fetal en sangre materna (Non Invasive Prenatal Testing [NIPT]) en el sector del Hospital de Barbastro, Huesca, en las pacientes consideradas de alto riesgo clasificadas así por el cribado mediante TN y bioquímica sérica, con lo que hemos conseguido disminuir de forma drástica el número de pruebas invasivas, en general amniocentesis, que tienen un riesgo de pérdida fetal del 1%. En los próximos años se pretende aumentar el número de pacientes a las que se pueda ofrecer el NIPT para aumentar la tasa de detección y llegar a convertir la amniocentesis en casi una prueba de diagnóstico, no de cribado como era hasta hace pocos años.

## Método

El cribado combinado de primer trimestre se puso en marcha en junio de 2008 en el Sector de Barbastro (Huesca), para un área que abarca una población de 100 000 habitantes,

atendiéndose en nuestro hospital unos 700 partos al año. Se ofrece a todas las gestantes que acuden a la primera visita de embarazo entre las 11-13<sup>6</sup> semanas o, lo que es lo mismo, cuando la longitud craneocaudal (LCC) en esa primera ecografía está entre 45 y 85 mm. Los criterios de exclusión son embarazo múltiple de más de dos fetos y la revocación por parte de la paciente, después de haber sido debidamente informada y suministrando consentimiento informado por escrito. Si la paciente no llega a realizarse el cribado de primer trimestre pero está dentro de las primeras 18 semanas de gestación, se le ofrece la posibilidad de cribado bioquímico de segundo trimestre mediante doble test determinándose alfafetoproteína (AFP) y hormona gonadotropina coriónica (HCG). Las pacientes mayores de 38 años a las que no se realiza ecografía de primer trimestre ni cribado combinado entran en el grupo de amniocentesis, puesto que el resultado del NIPT tarda en estos momentos unos 15 días y el límite legal de interrupción del embarazo en España son las 22 semanas. Estos casos son poco habituales y se individualiza la conducta consensuada con la paciente.

En los primeros años de implantación del cribado, de 2008 a 2010, se ofrecía amniocentesis a las embarazadas mayores de 38 años aunque el resultado del cribado de primer trimestre fuera de bajo riesgo, siguiendo la primera estrategia de cribado de diagnóstico prenatal que se había establecido en Cataluña en 1998<sup>5</sup>. También se seguía permitiendo la realización de técnicas invasivas a todas aquellas gestantes que la pidieran, independientemente de su riesgo, lo que considerábamos como criterio "ansiedad materna". Esto hizo que la disminución en el número de pruebas invasivas fuera paulatina y que en esos años cambiaran los principales motivos de indicación,

igualándose el número de amniocentesis realizadas por la edad materna con las indicadas por el cribado bioquímico, que en estos momentos se ha convertido en la principal indicación de prueba invasiva (figura 1).

En 2011, siguiendo la Estrategia de Cribado de Cromosopatías en Aragón y los protocolos que se estaban llevando a cabo en otras comunidades autónomas, se desterró el criterio "ansiedad materna" y se aumentó la edad materna a 40 años. Con los años, la información a las pacientes y a los profesionales ha mejorado hasta llegar a erradicar la edad materna como indicación de prueba invasiva, reforzado este punto en el reciente Protocolo Regional de Cromosopatías de Aragón.

El cribado se realiza en una sola visita. Se programa una exploración ecográfica entre la 11.<sup>a</sup> y la 13.<sup>a</sup> semana<sup>6</sup>, idealmente en la 12.<sup>a</sup>, y tras esta, se envía a la paciente a laboratorio para la extracción de sangre con los datos

de la LCC y la TN, medidos según los criterios de la Fetal Foundation Medicine<sup>6</sup>. Los valores obtenidos de PAPP-A, HCG y TN se convierten en múltiplos de la mediana (MoM) para la correspondiente edad gestacional y se calcula el riesgo. Se tienen en cuenta como factores de corrección el peso y la fecha de nacimiento de la paciente, el tabaco, la diabetes, la raza, si se trata de una fecundación in vitro y, en el caso de los gemelos, la corionicidad. El cálculo del riesgo de aneuploidías se envía en informe al obstetra que es el que informa a la paciente una semana después de la ecografía.

Hasta 2015, el punto de corte utilizado para ofrecer la realización de técnicas invasivas dado por nuestro laboratorio era un riesgo igual o superior a 1/270 en el caso de trisomía 21 y 1/100 en el caso de trisomías 13 y 18, y la obtención de cariotipo fetal se realiza mediante amniocentesis a partir de las 15 semanas. En marzo de 2015 empezamos a sustituir la amniocentesis en estas pacientes por el NIPT, de manera



Figura 1. Indicaciones de pruebas invasivas

que a las pacientes consideradas de riesgo muy alto definido como riesgo mayor a 1/50 se les ofrece amniocentesis de entrada, y a las de riesgo alto (mayor a 1/270) se les ofrece NIPT y solo amniocentesis para confirmar los positivos de este último.

Hasta enero de 2016, las pacientes con un riesgo menor de 1/270 continuaban el seguimiento normal del embarazo y solo se les ofrecía amniocentesis si en la ecografía morfológica a las 20 semanas se observan malformaciones o marcadores menores de anomalías cromosómicas corrigiendo su riesgo inicial obtenido por el cribado combinado con los *likelihood ratio* de los marcadores hallados, según protocolo de la Fetal Medicine Foundation y los criterios de Agathokleous<sup>7</sup>. Este año hemos incorporado como indicación de NIPT a las pacientes "de riesgo intermedio" consideradas estas las de riesgo mayor a 1/3000 para trisomía 21, tras redefinir el riesgo inicial del cribado combinado con la medición del índice de pulsatilidad del *ductus venoso* y la ausencia o presencia de hueso nasal. Con esto esperamos aumentar el número de NIPT hasta un 20% de las gestantes, pero asegurar el diagnóstico de las tres trisomías más frecuentes, ya que la mayoría de los falsos negativos se encuentran en ese grupo de pacientes de riesgo intermedio.

## Resultados

Se han analizado 3952 cribados bioquímicos de primer y segundo trimestre realizados entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2015, realizados en población general no seleccionada del sector Barbastro, que engloba a gestantes controladas en las consultas de Obstetricia de Barbastro, Monzón y Fraga.

3752 de los cribados fueron combinados de primer trimestre y 200 doble test de segundo trimestre, en la mayoría de los casos inmigrantes que acuden tarde a la primera visita de embarazo.

Las indicaciones de las amniocentesis desde 2005 vienen reflejadas en la tabla 1. Con la introducción del cribado combinado ha habido una total inversión de la indicación principal, además de que se han reducido el número de indicaciones hasta ser el cribado positivo prácticamente la única. Esto también va a cambiar en los próximos años gracias a la incorporación del NIPT, ya que la mayoría de los positivos por el cribado combinado se estudiarán por ADN fetal en sangre materna en lugar de prueba invasiva mientras que, el aumento de la translucencia nucal, con su gran peso como marcador de trisomía 21 pero también de muchas otras aneuploidías, sigue

Tabla 1. Indicación de amniocentesis por años

Año	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Edad Materna	72%	68%	37%	49%	40%	26%	18%	20%	6%
PAPP-A	0	5%	26%	6%	24%	52%	63%	74%	43%
TS	16%	11%	3%	7%	3%	6%	9%	0%	0%
Ansiedad	7	10%	20%	20%	17%	1%	0%	0%	0%
Hallazgos ecográficos	0%	0%	7%	3%	4%	8%	3%	14%	31%
Antecedentes	4%	2%	4%	0%	3%	3%	2%	2%	0%
Total de amniocentesis	200	124	101	96	76	81	68	35	16

Principales indicaciones de amniocentesis recogidas desde 2007 hasta 2015.

siendo indicación clara de amniocentesis, por lo que probablemente los hallazgos ecográficos llegarán a convertirse con los años en prácticamente la única indicación de obtención de cariotipo fetal.

La tasa de detección del cribado bioquímico para trisomías 18 y 21 fue del 94,4%, con el inconveniente de que en alguno de los casos diagnosticados en los primeros años del cribado no se llegó a realizar este si ya había indicación de amniocentesis por otro motivo, por ejemplo, edad materna mayor de 35 años.

Al 76,74% de las cromosopatías graves diagnosticadas se les realizó la amniocentesis por el cribado en conjunto, combinado de primer trimestre o triple *screening* antes de la aparición del PAPP-A. El 44,18% de estas aneuploidías tenían la translucencia nucal aumentada, siendo este el marcador de más peso en el diagnóstico prenatal.

Se han registrado 43 aneuploidías graves en nuestro centro desde enero de 2005: 31 trisomías 21, cuatro trisomías 18, dos trisomías 13, una trisomía 22 y cinco alteraciones de los cromosomas sexuales. De todas ellas, 19 se diagnosticaron o sospecharon por el aumento de la translucencia nucal, 14 por el resultado de los análisis y cinco por edad materna en los primeros

años estudiados. Tres pacientes revocaron amniocentesis, pero se confirmó el diagnóstico de sospecha posparto.

Dos casos pasaron desapercibidos: una trisomía 21 en una paciente de 32 años y una trisomía 13 en una paciente de 33 años. En el recién nacido con trisomía 21 no se hallaron malformaciones ni durante el embarazo ni tras en el nacimiento, y en el caso de la trisomía 13 únicamente se vio un foco ecogénico de ventrículo izquierdo en la ecografía de nivel II y una aplasia *cutis* además de una comunicación interventricular leve tras el nacimiento. La translucencia nucal en el primero fue 1,5 mm y en el segundo 1,4 mm (tabla 2).

La tasa de falsos positivos para el cribado combinado de primer trimestre fue de 6,4% en 2015. La tasa global de pérdida fetal es de 1,8% si consideramos los abortos de menos de 20 semanas (ocho abortos en cinco años, 422 amniocentesis).

En los años previos a la implantación del cribado estábamos realizando aproximadamente 200 amniocentesis al año, la mayoría por edad materna para no diagnosticar apenas casos por ese motivo. En el año 2015 se han realizado 16 amniocentesis, gracias a la incorporación del NIPT. El precio de la prueba era 450 euros cuando comenzamos con el proyecto, y en un año se ha abaratado a 350 euros, por lo que

Tabla 2. Detección de cromosopatías

Año	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
Número cribados primer trimestre	681	832	753	752	734	3752
Riesgo > 1/270	31	71	62	39	48	251
Aneuploidías graves detectadas	4	1	6	5	2	18
No detectadas	1	0	0	0	0	2
Tasa de detección	80%	100%	100%	100%	100%	94%
Tasa FP	4,3%	8,1%	7,9%	4,9%	6,3%	6,4%

Número de cribados combinados realizados desde 2011 y tasa de detección del mismo.

se presume va a ir disminuyendo según aumentamos el número de pruebas a realizar. Esto ha supuesto un gasto para el Hospital de Barbastro de 18 000 euros en 2015. Si lo comparamos con los 60 000 euros que suponían las 200 amniocentesis del 2007, supone una clara disminución del gasto hospitalario, todo ello sin contar el menor número de consultas (por ejemplo, el control postamniocentesis) y el coste de los abortos (ingreso, antibioterapia, legrado...).

### Discusión

El cribado combinado para la detección de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de la gestación, especialmente la trisomía 21, es la estrategia recomendada en España y avalada por la Sociedad de Ginecología y Obstetricia<sup>8,9</sup>. En los últimos años se ha ido afianzando como el método de elección para el diagnóstico de aneuploidías, llegando ya al 94% de los centros encuestados en una revisión realizada a nivel nacional en 2011 que incluía al 30% de las gestantes de toda España<sup>10</sup>.

Históricamente la edad materna avanzada fue casi exclusivamente el único criterio para el cribado de cromosopatías, lo que, junto con el retraso progresivo en la edad de maternidad, conducía a un aumento notable en el número de técnicas invasivas con el consiguiente aumento de pérdidas fetales inherentes a estas pruebas. En 2010 dejamos de realizar de forma sistemática las pruebas invasivas por esta indicación, siendo este el principal factor para la caída en el número de amniocentesis (figura 2).

La introducción del cribado combinado y el progresivo abandono de la edad materna como criterio aislado para la indicación de técnicas invasivas junto con la erradicación del criterio "ansiedad materna", han conllevado la disminución del número de amniocentesis sin merma en la tasa de detección de síndrome de Down<sup>11</sup>. En el año 2007 realizamos 100 amniocentesis para diagnosticar una anomalía cromosómica grave, mientras que en 2014 se realizaron siete por cada una de ellas.

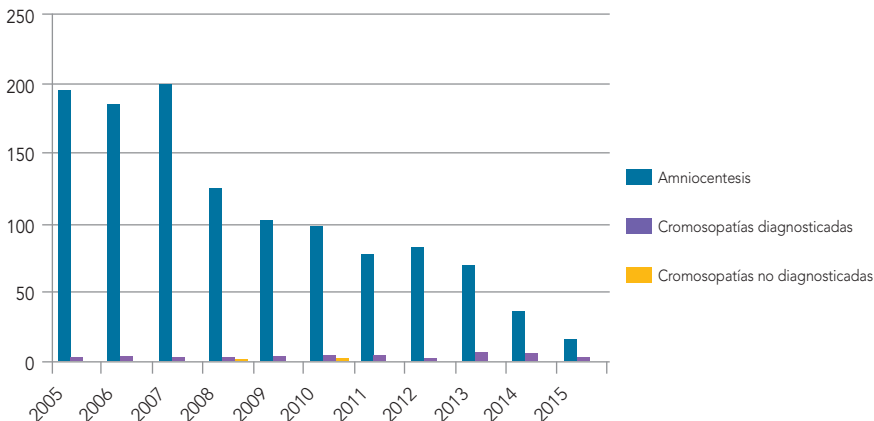


Figura 2. Número de amniocentesis

En enero de 2013 se introdujo en muchos centros privados españoles el estudio de ADN fetal en sangre materna para el diagnóstico de alteraciones de los pares cromosómicos 13, 18 y 21. En 1997 el descubrimiento de la presencia de ADN fetal circulante en sangre periférica materna<sup>2</sup> abrió un campo de investigación, generando enormes expectativas acerca de la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales sin la necesidad de procedimientos invasivos. Cuando surgieron los primeros estudios el fin era que este test llegara a sustituir a los procedimientos invasivos, pero, al no llegarse a los niveles de sensibilidad y especificidad del 100%, se empezó a hablar de los mismos como una herramienta de cribado<sup>12</sup> más que de diagnóstico.

La mayoría de los estudios se han centrado en población de alto riesgo seleccionada por el cribado combinado y/o marcadores ecográficos en el primer o segundo trimestre, por lo que tampoco queda claro si serían aplicables a la población general. En nuestro medio, se realiza a todas las gestantes con resultado de cribado combinado de primer trimestre y cribado de segundo trimestre de alto riesgo, lo que ahora supone un 74% de las indicaciones de amniocentesis. En la visita de las 12-14 semanas, en la que informamos del riesgo, se les propone la realización del estudio de ADN fetal, citándolas a resultados en dos semanas, todavía a tiempo de realizar estudio de cariotipo por medio de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR), disponible el resultado en 24-48 horas en los casos de test de ADN fetal positivo.

En el caso de pacientes con importantes marcadores ecográficos o malformaciones asociadas, el estudio de ADN fetal se desestimaría por no poder descartar estas otras anomalías cromosómicas que, aunque excepcionales, tienen

gran expresividad ecográfica, además de que la sensibilidad para la detección de trisomía 13 y 18 se ha estimado en un 92% y un 96% respectivamente<sup>13</sup>. Por ello, una duda que se nos plantea es cuál es el peso de la translucencia nucal como para permitirnos el desestimar la amniocentesis en el caso de estudio de ADN fetal normal y TN mayor del P95. Aunque la incorporación del estudio de ADN fetal al cribado del primer trimestre disminuirá dramáticamente la prevalencia de síndrome de Down en el segundo trimestre, el sonograma genético tendría su importancia en el asesoramiento de una prueba invasiva en pacientes con resultado no válido, hasta un 4,8%<sup>13</sup>, embarazos múltiples, y en los casos de resultados *borderline* cuando los test no invasivos de diagnóstico prenatal den los resultados según la probabilidad de riesgo específico para cada paciente<sup>14</sup>.

El cribado combinado de primer trimestre es el mejor método de *screening* de síndrome de Down en estos momentos y debe ser ofertado a todas las gestantes, independientemente de su edad, como cribado universal. Pero el estudio de ADN fetal en sangre materna deberá ser incorporado al *screening* en pacientes de alto riesgo como paso previo a la realización de una prueba invasiva, para ir ampliando de forma progresiva el número de indicaciones hasta llegar a sustituir el cribado combinado actual.

El alto coste actual de la prueba va a limitar su introducción en los sistemas públicos de salud, al menos para aplicarse de forma universal a todas las embarazadas. Por ello se propone como complemento del cribado combinado, usando este para dividir a la población en tres grupos: muy alto riesgo, riesgo intermedio y riesgo bajo<sup>15</sup>. A las pacientes del primer grupo les ofrecemos de entrada una prueba invasiva, a las de bajo riesgo nada, y son las



pacientes de riesgo intermedio las que se beneficiarían del estudio de ADN fetal. Se estima que con esta política se sometería al 25% de las gestantes a la prueba si el punto de corte considerado alto riesgo estuviera entre 1/11 y 1/2500 para detectar el 98% de las trisomías 13,18 y 21<sup>15</sup>. En nuestras previsiones, al incorporar al NIPT a las pacientes de riesgo intermedio hasta 1/1000, vamos a someter a la prueba a un 20% de las gestantes, lo que supondrá unos 40 000 euros anuales. Estas cifras quedan todavía muy por debajo del coste de las amniocentesis en los años previos al cribado y con ese punto de corte nos aseguramos una tasa de detección para síndrome de Down del 100%.

Es necesario que la administración pública y las sociedades científicas tengan en cuenta estos cambios en el diagnóstico prenatal para poder incorporarlos lo antes posible a nuestra práctica diaria.

### Agradecimientos

A los doctores Diego Lerma Puertas y Rafael González de Agüero del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Al Servicio de Genética del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, las doctoras María José Alcaine, Ana Rodríguez Valle y María Dolores Miramar.

### Bibliografía

1. Nicolaidis KH. Turning the pyramid of prenatal care. *Fetal Diagn Ther.* 2011;29:183-96.
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.

3. Nicolaidis K, Syngelaki A, Ashoor G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207:374,e1-6.
4. Gil MM, Akolebar R, Quezada MS, et al. Analysis of cell-free DNA fetal in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35:156-73.
5. Instrucción 01/1998 CatSalut. Implantación del diagnóstico prenatal de anomalías congénitas en Cataluña. Barcelona: Dirección General de Salud Pública; 1998. Generalitat de Catalunya. Departamento de Salut. Protocolo de Diagnóstico Prenatal de anomalías congénitas fetales en Cataluña. Barcelona: Dirección General de Salud Pública; 2008. Disponible en: [http://atenciontemprana.com/wp-content/uploads/2015/09/diagprenfetcas\\_breu.pdf](http://atenciontemprana.com/wp-content/uploads/2015/09/diagprenfetcas_breu.pdf)
6. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, et al. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Lancet.* 1998;351:343-6.
7. Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LC, et al. Meta-analysis of second trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:247-61.
8. Fortuny A, Gómez ML, Ortega MD, et al. Propuesta de screening combinado de cromosopatías en el primer trimestre de la gestación para todo el territorio nacional. Recomendaciones para la organización de un Servicio de Obstetricia y Ginecología. Documentos SEGO; 2005. p. 9-21.

9. Nicolaidis K, Falcón O. La ecografía de las 11-13<sup>ª</sup> semanas. En: Fetalmedicine [en línea]. Disponible en: <http://www.fetalmedicine.com/fmf/FMF-spanish.pdf>
10. Manzanares S, Pineda A, Durán MD, et al. Cribado de cromosopatías fetales en España. Cambios hospitalarios en el periodo 2006-2011. *Diagn Prenat*. 2013;24:3-10.
11. Illescas T, Coronado PJ, Ortega MD, Soler P, Costa G, Montalvo J. Estudio descriptivo del cribado de cromosopatías en el primer trimestre de la gestación en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, España. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2011;76:318-24.
12. Rodríguez M, Bustamante A, Perlado S, et al. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. *Diagn Prenat*. 2012;23:67-75.
13. Gil M, Quezada M, Bregnant B, et al. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42:34-40.
14. Odibo A, Ghidini A. Role of the second-trimester "genetic sonogram" for Down syndrome screen in the era of first-trimester screening and noninvasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis*. 2014;34:511-7.
15. Gratacós E, Nicolaidis K. Clinical perspective of cell-free DNA testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:151-5.