

**RENDIMIENTO OPERATIVO DE LA TAMIZACIÓN DOBLE AJUSTADA
POR RAZA PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN POBLACIÓN
COLOMBIANA**

Eliana Patricia Rivera Moreno

**Claudia Guzmán Amaya
Emiliano Mauricio Herrera Méndez
Milciades Ibáñez
Jorge Orjuela
Mario Alonso Rebolledo Ardila
Catalina María Valencia**

**ORGANIZACIÓN SANITAS INTERNACIONAL
CLINICA COLSANITAS
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA MATERNO FETAL
BOGOTA D.C.
2010**

Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Programa de Medicina Materno Fetal
Título de la Investigación: Rendimiento Operativo De La Tamización Doble Ajustada Por Raza Para La Detección De Aneuploidías En Población Colombiana
Línea de Investigación: Tamización de anomalías congénitas
Instituciones Participantes: Organización Sanitas Internacional Clínica Colsanitas: Clínica Reina Sofía y Clínica Universitaria Colombia Universidad del Rosario
Tipo de Investigación: Institucional
Investigador Principal: Eliana Patricia Rivera Moreno Investigadores asociados: Claudia Guzmán Amaya, Emiliano Mauricio Herrera Méndez, Milciades Ibáñez, Jorge Orjuela, Mario Alonso Rebolledo, Catalina María Valencia.
Asesores Clínicos: Mauricio Herrera Méndez, Jorge Orjuela, Mario Alonso Rebolledo, Catalina María Valencia. Asesor Metodológico: Jaime Ardila – Carlos Pinzón Asesor Estadístico: Milciades Ibáñez Pinilla

“La Clínica Colsanitas y la Universidad del Rosario no se hacen responsables de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Mi mayor reconocimiento al grupo de Investigación de la Clínica Colsanitas quienes a través de sus aportes y apoyo lograron que este trabajo haya tenido una gran utilidad. Así mismo a mis asesores metodológicos los cuales a través del tiempo fueron ayudando a refinar y organizar la información obtenida y presentar este proyecto de investigación.

Rendimiento Operativo De La Tamización Doble Ajustada Por Raza
Para La Detección De Aneuploidías En Población Colombiana

E. Rivera, C. Guzmán, M. Herrera
J. Orjuela, M. Rebolledo, C.Valencia

	Contenido	Página
	Resumen	10
	Abstract	11
I.	Introducción	12
II.	Justificación	13
III.	Planteamiento del problema	14
IV.	Marco teórico y Estado del Arte	16
V.	Objetivos	25
	1. General	
	2. Específicos	
VI.	Aspectos Metodológicos	26
	1. Tipo y diseño general del estudio	26
	2. Población de referencia y muestra	26
	2.1 Población Universo	
	2.2 Población Blanco	
	2.3 Población Estudio	
	2.4 Criterios de Selección	27
	2.5 Tamaño de la Muestra	
	3. Variables del Estudio	28

4. Técnicas y procedimiento para la recolección de información	30
5. Métodos para el control de calidad de los datos	31
6. Materiales y Métodos	31
7. Análisis estadístico	32
VII. Aspectos éticos	34
VIII. Presupuesto	35
IX. Cronograma	36
X. Resultados y Análisis	37
XI. Discusión	50
XII. Conclusiones	52
XIII. Referencias	54

Lista de tablas y gráficas

	Página
Tabla 1. <i>Distribución de frecuencia de pacientes de acuerdo a edad gestacional</i>	37
Tabla 2. <i>Análisis de varianza de las medianas de la B-hCG libre y la PAPP-A</i>	38
Tabla 3. <i>Pruebas post-hoc para determinación de frecuencias de la B-hCG</i>	39
Tabla 4. <i>Pruebas post-hoc para determinación de frecuencias de la PAPP-A</i>	39
Tabla 5. <i>Valores de medianas de B-hCG y comparación con otros estudios</i>	40
Tabla 6. <i>Valores de medianas de PAPP-A y comparación con otros estudios</i>	40
Tabla 7. <i>Comparación del rendimiento operativo de la prueba utilizando mediana convencionales y ajustado por raza mestiza para el total de la muestra</i>	41
Tabla 8. <i>Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 11</i>	42
Tabla 9. <i>Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 12</i>	42
Tabla 10. <i>Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 13</i>	43
Gráfico 1. <i>Curva ROC para valores de Spencer (Tamizaje convencional)</i>	44
Gráfico 2. <i>Curva ROC para valores ajustados por raza (Tamizaje ajustado)</i>	45

Gráfico 3. <i>Curva ROC para valores de Spencer en semana 11</i>	46
Gráfico 4. <i>Curva ROC para valores de Spencer en semana 12</i>	46
Gráfico 5. <i>Curva ROC para valores de Spencer en semana 13</i>	47
Gráfico 6. <i>Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 11</i>	48
Gráfico 7. <i>Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 12</i>	48
Gráfico 8. <i>Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 13</i>	469

Actualmente, los algoritmos utilizados para la detección de alteraciones cromosómicas se han basado en los resultados obtenidos de poblaciones caucásicas, afrocaribeñas y asiáticas, las cuales, no tienen las mismas características de la raza mestiza. De allí, surgió el interés de realizar un estudio que permitiera determinar los valores de los marcadores serológicos, empleados en la tamización de aneuploidías, en población latina, para establecer un punto de corte ajustado a la raza mestiza.

Se encuentra en desarrollo un estudio de validación de prueba diagnóstica, cuyos avances se presentan a continuación. En esta investigación, hasta el momento, se han incluido 1418 pacientes entre 11-13.6 semanas, sometidas a tamización combinada para la detección de aneuploidías. Se realizó un ajuste por raza de valores de medianas y sus múltiplos para los marcadores y se determinó el rendimiento operativo de la prueba luego de dicho ajuste. Posteriormente, se realizó una comparación entre ambas pruebas.

Los niveles de B-hCG son 17.1 % más bajos en población mestiza colombiana, comparado con población caucásica y los niveles de PAPP-A son 19% inferiores. Las tasas de detección de la prueba, utilizando los valores convencionales, son del 60 % y, luego del ajuste por raza, es del 53 %. Haciendo el cálculo de riesgo, utilizando los nuevos múltiplos de mediana, no existen diferencias en aplicar la tamización con los valores convencionales entre las semanas 11 y 12 pero, en semana 13, los valores aplicados a población caucásica presentan una mejor tasa de detección que utilizar la prueba ajustada.

PALABRAS CLAVES: Tamización combinada, aneuploidías, Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo, Fracción Beta de la Gonadotropina Coriónica Humana.

Currently, the algorithms used for the detection of chromosomal alterations have been based on the results from Caucasian populations, Afro-Caribbean and Asian, which do not have the same characteristics of the mixed race. From there, we became interested to conduct a study to determine the values of biochemical markers, used in the screening for aneuploidy in Latino population, to establish a cutoff point set to the mixed race.

Is developing a validation study of diagnostic tests, whose results are presented below. In this investigation, so far, 1418 patients were included between 11-13.6 weeks, subject to combined screening for the detection of aneuploidies. Were adjusted for race and median values for multiple markers and determined the operating performance of the test after the adjustment. Subsequently, a comparison was made between the two tests.

The B-hCG levels are 17.1% lower in Colombian mestizo population, compared with Caucasians and PAPP-A levels are 19% lower. Detection rates of the test, using the conventional values, are 60% and, after adjusting for race, is 53%. Using the calculation of risk using the new multiple of median, no difference in applying the screening with conventional values between weeks 11 and 12 but in week 13, the values applied in the Caucasian population have a better detection rate using test set.

KEY WORDS: combined screening, aneuploidy, associated plasma protein A Pregnancy, Section Beta human chorionic gonadotropin.

I. Introducción

Las alteraciones cromosómicas están asociadas a una significativa mortalidad y morbilidad, sobre todo en el período neonatal e infancia. Estas anormalidades se presentan con una frecuencia de 1 por cada 160 nacidos vivos, siendo las más frecuentes las trisomías 21, 13 y 18¹.

Existe amplia evidencia en la literatura que el uso de la tamización de primer trimestre combinando los niveles plasmáticos de la Fracción Libre de la Hormona Gonadotrópica Humana (B-hCG), la Proteína A Plasmática asociada al Embarazo (PAPPA), la medición ecográfica de la Translucencia Nucal y utilizando la Edad Materna, se puede lograr tasas de detección de aproximadamente un 90 %, lo cual reduce el número de pacientes que serían candidatas a realización de procedimientos invasivos como amniocentesis o biopsias de vellosidad corial².

La tamización doble que consiste en la toma de los niveles séricos maternos de B-hCG y PAPP-A entre las semanas 11-13.6 de gestación, tiene una tasa de detección del 60 % con unos falsos positivos del 5 %.

Un estudio realizado en Londres en el año 2000, logró demostrar que existía variación en los niveles plasmáticos de las proteínas previamente señaladas, en las diferentes razas a las cuales fue aplicado el estudio³.

En el presente estudio se demuestra una reducción más significativa de los valores de la B-HCG libre y de la PAPP-A, y el rendimiento operativo de la prueba luego del ajuste por raza.

¹ Citado en artículo del New England Journal of Medicine 2009, por Deborah Driscoll and Susan Gross, artículo Prenatal Screening of Aneuploidy: From Thompson and Thompson genetics in Medicine. 7th Ed. 2007. Philadelphia.

² Nicolaides K., Sebire N., Snijders R. (2004) *The 11 – 13+6 week Scan*. Fetal Medicine Foundation. London.

³ Spencer K., Charas Y., Nicolaides K., (2000). The influence of ethnic origin on first trimester biochemical markers of chromosomal abnormalities. *Prenatal diagnosis*. Vol. 20, 491.

II. Justificación

La tamización doble tiene como objetivo primordial la identificación de fetos con riesgo de aneuploidías y ofrece como beneficio secundario la identificación de embarazos con alto riesgo de complicaciones perinatales como Preeclampsia, RCIU u Óbito fetal, cuando se descarta alteración cromosómica como origen de valores alterados¹.

El estudio SURUSS permitió demostrar la efectividad de la tamización combinada de primer trimestre para la detección de alteraciones cromosómicas, con muy buenas tasas de sensibilidad y bajos falsos positivos². Sin embargo, es una revisión en la cual se establecen los valores obtenidos de muestras de poblaciones de otros orígenes étnicos.

Al hacer la corrección de estos datos de acuerdo a la raza se identifica una reducción importante en los niveles plasmáticos de B-hCG y PAPP-A³. Para poder realizar la aplicabilidad de esta tamización ya corregida es fundamental demostrar que las tasas de sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos se mantengan en rangos aceptados comparados con las mediciones convencionales (refiriéndonos a los estándares para población no latina).

Para ello se presenta la siguiente línea de investigación que busca determinar el rendimiento operativo de la prueba de tamización haciendo la corrección de la mediana en los valores de B-hCG y PAPP-A por raza y compararlo con los mismos valores obtenidos sin hacer dicha corrección. De esta manera se podrá demostrar si la tasa de detección se mantiene o mejora para poder aplicarlo de rutina en los protocolos institucionales.

¹ Dugoff L. and cols. (2004). First Trimester Maternal Serum PAPP-A and free BHCG concentrations and nuchal translucency are associated with obstetrics complications: A population based screening study (The FASTER trial). *American Journal Obstetrics and Gynecology*.

² Wald N.J. and cols. (2005). SURUSS in perspective. *Seminars in Perinatology*.

³ Guzmán C., Herrera M., Orjuela J. (2006). Marcadores séricos de aneuploidías en primer trimestre del embarazo en una población obstétrica colombiana.

III. Planteamiento del problema

Las aneuploidías afectan un 0.3 % de los recién nacidos, 4 % de mortinatos y más del 35 % de los abortos espontáneos. Igualmente se establece que un gran número de alteraciones morfológicas fetales y neonatales están relacionadas con aneuploidías, por lo tanto se ha observado un mejoramiento de las técnicas de detección de dichas alteraciones cromosómicas que permitan llegar a un diagnóstico específico y de esta manera establecer un pronóstico y probabilidad de recurrencias. Es por ello el interés tan marcado por diseñar estrategias de tamización cada vez más tempranas y lo menos invasivas posibles.

Las pruebas de tamización de tipo serológica maternas han demostrado tasas de detección de hasta el 95 % cuando se asocian a marcadores ecográficos, específicamente, Translucencia Nucal. Un estudio publicado en Londres en el año 2003 demostró esta sensibilidad para Trisomía 13 y 18, utilizando como punto de corte para alto riesgo de 1/150, con una tasa de procedimientos invasivos del 0.3 % ¹. En Australia entre los años 1995 a 2005, se desarrolló un estudio que logró demostrar con la introducción de la tamización combinada de primer trimestre, una tasa de detección de más del 80 % de los niños afectados con síndrome Down, además de lograr una reducción en los procedimientos invasivos².

Desafortunadamente al tratar de extrapolar los datos obtenidos a nuestra población, carecemos de literatura científica suficiente, dado que no existen estudios realizados con población de raza mestiza. Un estudio previo, realizado en el año 2005, demostró que los niveles de la Fracción Libre de la Gonadotropina Coriónica Humana y la Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo son, 15.5 % y 7%, masbajas respectivamente ³. Surge el interrogante acerca del rendimiento operativo de la tamización doble, es decir el uso de los marcadores ajustados para población mestiza de origen colombiano.

¹ Nicolaidis K. and Spencer K. (2002). A first trimester trisomy 13/trisomy 18 risk algorithm combining fetal nuchal translucency thickness, maternal serum free beta-hCG and PAPP-A. *Prenatal Diagnosis*. Vol. 20,495.

² Muller P. and cols. (2007). Trends in state/population-based Down syndrome screening and invasive prenatal testing with the introduction of first trimester combined Down syndrome screening, South Australia, 1995-2005. *American Journal Obstetrics and Gynecology*.

³ Guzmán C., Herrera M., Orjuela J. (2006). Marcadores séricos de aneuploidías en primer trimestre del embarazo en una población obstétrica colombiana

En nuestro medio, no contamos con estudios realizados, que establezca el rendimiento operativo de esta tamización combinada en nuestra población. Se consideraría que teniendo en cuenta la aplicabilidad a nivel mundial de esta prueba, las tasas de detección sean equivalentes. Pero debemos recordar que existen variaciones entre las razas, que como lo hemos explicado previamente, tienen un impacto sobre los valores de las proteínas séricas utilizadas dentro de esta tamización.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el rendimiento operativo de la tamización doble de primer trimestre corregida por raza para la detección de alteraciones cromosómicas aplicada a una población seleccionada de origen colombiano?

IV. Marco teórico

Un programa de tamización se define como “la aplicación sistemática de una prueba o investigación que permita identificar entre los individuos que no han buscado atención médica ni presentan síntomas específicos, aquellos con riesgo suficiente de padecer una condición específica y que se beneficiarían de estudios más profundos o acciones preventivas directas”.

La identificación de mujeres quienes tienen alto riesgo de tener fetos con síndrome Down, se ajusta a esta definición y las mediciones de utilidad. En pacientes con pruebas de tamización positivas se les ofrecen métodos diagnósticos invasivos, tales como biopsia de vellosidad corial en primer trimestre o amniocentesis en segundo trimestre. El objetivo de los métodos de tamización genética debe ser como lo describe Peter Rowley “... maximizar las opciones disponibles para la familia antes que disminuir la prevalencia de la entidad”, esto dirigido a que en muchos países, las mujeres con hijos afectados por síndrome Down pueden elegir la terminación del embarazo.

Las pruebas de tamización son evaluadas generalmente en términos de tasas de detección (sensibilidad), tasas de falsos positivos y las posibilidades de estar afectados dando un resultado positivo (OAPR). Estas mediciones basadas en el rendimiento son usadas frecuentemente para justificar protocolos particulares. Bajo estas definiciones enmarcamos nuestro trabajo para determinar así la importancia de su aplicación en nuestra población y realizar los ajustes necesarios evaluando entonces su rendimiento operativo.

5.1 Aspectos clínicos del síndrome Down

El síndrome de Down, la forma más común de compromiso del desarrollo cognitivo, fue descrito por John Langdon Down hace cerca de 150 años. Ocurre en cerca de 1/700 a 1/800 nacidos y según los datos epidemiológicos se estima una incidencia alrededor del mundo de 200.000 casos por año. Esto puede representar una subestimación considerando que el síndrome Down ocurre en cerca del 2% de los abortos espontáneos. El único factor de riesgo conocido para síndrome Down

es el incremento de los errores en la no disyunción meiótica que se presenta con la edad. La expectativa de vida es generalmente corta con respecto a la población normal y varía con la severidad del fenotipo (1).

Cerca de un siglo después de la primera descripción, estudios genéticos realizados por Lejeune en el año de 1959 demostraron que el síndrome Down es causado por una Trisomía del cromosoma 21. En algunos casos, ciertos individuos presentan una Trisomía parcial del cromosoma 21 y muestran fenotipos variables. Los estudios genéticos y fenotípicos en tales casos han definido regiones de los cromosomas asociados con distintos hallazgos y, en algunos casos, los genes responsables para fenotipos específicos del síndrome Down. Específicamente la parte distal del brazo largo del HSA21 ha sido identificada como "región crítica del Síndrome Down" y se ha asociado con compromiso del desarrollo cognitivo.

Históricamente, la consejería genética y el ofrecimiento de procedimientos no invasivos fueron hechos de rutina a mujeres de 35 años o mayores. La decisión de usar una edad como punto de corte se basó en una comparación entre el riesgo de aneuploidías y la probabilidad de pérdida del embarazo al realizar una prueba invasiva. Utilizando solo la edad materna como método de screening solo se lograría identificar el 30 % de fetos afectados, esto teniendo en cuenta que la gran mayoría de los fetos con anomalías cromosómicas nacen de madres menores de 35 años. Por esta razón el Colegio Americano de ginecología y Obstetricia recomienda no usar solo la edad como referencia para ofrecer procedimientos invasivos (2).

La relación entre edad materna avanzada y la probabilidad de tener un feto afectado por aneuploidías, particularmente síndrome de Down (Trisomía 21), ha sido reconocida en los últimos 40 años y ha permitido el desarrollo de pruebas de tamizaje (3). Las pruebas no invasivas se han asociado con una mejor predicción de embarazos afectados con aneuploidías que la edad materna sola, adoptando hoy en día nuevas estrategias de tamizaje y una disminución de niños con síndrome de Down en los Estados Unidos en donde los protocolos de interrupción del embarazo están ampliamente desarrollados y aceptados por las diferentes instituciones.

El uso de pruebas no invasivas ha contribuido a la vez a disminuir la necesidad de pruebas diagnósticas invasivas y reducir el riesgo de pérdidas de embarazos no afectados debido a complicaciones relacionadas con el procedimiento (ruptura prematura de membranas, trabajo de parto, infecciones, entre otras). Sin embargo, como toda prueba de screening tiene sus limitantes, incluyendo los resultados falsos positivos y negativos.

El screening de primer trimestre para síndrome de Down que incluye el uso de la ecografía para evaluar la translucencia nucal se ha venido generalizando desde su introducción por Nicolaides y colaboradores en la década de los 90 (7). Este tamizaje que incluye, además de la ecografía y la edad materna, la fracción libre de la Gonadotropina Coriónica humana (B-hCG) y la proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) es actualmente utilizada a nivel mundial con un porcentaje de detección de un 91% y tasas de falsos positivos de 4 %. Un gran estudio realizado en Estado Unidos, para tamizaje de primer trimestre, incluyendo 8514 embarazos, reporto una tasa de detección del 79% con un 5% de falsos positivos (13).

En un estudio realizado por un grupo de investigadores en Australia, se demostró un riesgo incrementado de síndrome de Down por test combinado de primer trimestre con valor predictivo positivo de 1/17, pero de 1/4 para defectos significativos al nacer, incluyendo otros defectos cromosómicos, estructurales o condiciones funcionales (1).

El tamizaje de segundo trimestre permanece como la prueba más común para evaluación del riesgo de síndrome de Down en Estados Unidos (2). Cuando se incluye la inhibina A se denomina tamizaje cuádruple, con una tasa de detección del 81 % con 5% de falsos positivos (2).

Diversos estudios han demostrado una asociación entre disminución de los niveles de PAPP-A en primer trimestre y Restricción del crecimiento intrauterino (4), bajo peso al nacer, (5) parto pretérmino, óbito fetal después de semana 24, riesgo incrementado de abortos, hipertensión gestacional y diabetes gestacional.

Estudios previos también han identificado resultado perinatal adverso asociando marcadores con Translucencia Nucal aumentada y niveles anormales de B-hCG libre, determinando madres con

alto riesgo de síndrome de Down, aborto espontáneo, placenta previa, muerte fetal intrauterina, hipertensión inducida por el embarazo y parto pretérmino. El uso de los niveles de PAPP-A como un marcador predictivo independiente del resultado del embarazo permanece controversial. Algunos expertos recomiendan que embarazos con niveles de PAPP-A bajos en primer trimestre, deben tener una vigilancia más estricta (6).

La PAPP-A es una de las diversas glicoproteínas producidas por las células del trofoblasto que actúan sobre una proteína ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP), específicamente IGFBP-4. Los IGF-I e IGF-II son liberados desde sus ligandos, promoviendo el crecimiento y desarrollo fetal a través de vías de diferenciación y metabólicas. Esto provee una racional influencia biológica del PAPP-A sobre el crecimiento y desarrollo feto-placentario, particularmente una asociación entre niveles bajos de PAPP-A y pobre resultado perinatal.

5.2 Tamización de primer trimestre

En la década de los 90, estudios demostraron que una acumulación de líquido incrementada a nivel de la nuca fetal estaba asociado con anomalías cromosómicas fetales (7). Con estudios posteriores se logró establecer que la tasa de detección de trisomía 21 basados en la edad materna y la TN, se encontraba en el rango del 72 a 77 %, cerca de 1/20 mujeres incluidas en el tamizaje tenían un resultado positivo y por tanto requerían uso de pruebas diagnósticas (8). La TN aumentada también ha estado asociada a otras anomalías cromosómicas (incluyendo trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner (45 X0) y triploidías como también con otras patologías genéticas y anomalías estructurales fetales (defectos cardíacos principalmente) (9). En la actualidad se ha establecido que toda persona que aplique el tamizaje de primer trimestre debe tener un entrenamiento y seguir las normas estrictas para una adecuada medición ecográfica y de esta manera evitar las tasas de falsos positivos y negativos.

En un gran estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos comparando el tamizaje combinado de primer trimestre con el tamizaje de segundo trimestre (Estudio FASTER), demostró que utilizando el tamizaje combinado de primer trimestre con una tasa de falsos positivos del 5 %, las tasas de detección de trisomía 21 fueron las siguientes: 87, 85 y 82 por

ciento para mediciones realizadas en 11, 12 y 13 semanas respectivamente; con el cuádruple test de segundo trimestre, 81 %; con el test secuencial (primer y segundo trimestre) 95 % y con el test integrado 88 %). Demostrando que el tamizaje de primer trimestre representa una superioridad en la tasa de detección comparado con las pruebas de segundo trimestre pero al combinarse se evidencia una mejoría en las tasas de detección (10). Es importante destacar que estos resultados fueron fácilmente demostrados en mujeres de 35 años o mayores, en las cuales se destaca que tienen mayores tasas de fetos afectados por aneuploidías que las pacientes más jóvenes.

En el Reino Unido resultados similares fueron reportados en el estudio comparativo SURUSS (estudio de tamizaje ecográfico, sérico y urinario), el cual fue un estudio prospectivo que incluyó 47.053 embarazos únicos (incluyendo 101 embarazos con síndrome de Down). Se logró una tasa de detección del 85 % de síndrome de Down y una tasa de falsos positivos del 0.9 % utilizando el test integrado. El test combinado con igual tasa de detección obtuvo un 4.3 % de falsos positivos y el cuádruple test de un 6.2 %. Estos estudios demuestran la superioridad de la realización del test combinado primer trimestre sobre las pruebas del segundo, pero que se mejoran las tasas de detección con tasas más bajas de falsos positivos al aplicar el test integrado (segundo y tercer trimestre) (11).

En las trisomías 18 y 13 los niveles de b-hCG libre y PAPP-A están disminuidos. En las anomalías cromosómicas sexuales la b-hCG libre es normal y la PAPP-A está disminuida. En la triploidía de origen paterno la b-hCG libre está muy aumentada mientras que la PAPP-A está ligeramente disminuida. La triploidía de origen materno se asocia a niveles muy bajos de b-hCG libre y PAPP-A.

El cribado mediante la combinación de la TN fetal y las concentraciones séricas de b-hCG libre y PAPP-A puede identificar alrededor del 90% de todas estas anomalías cromosómicas con una tasa de falsos positivos del 1%, además del 5% necesario en el cribado de la trisomía 21.

Un importante avance en el análisis bioquímico ha sido la introducción de una nueva técnica (*random access immunoassay analyzer using time-resolved-amplified-cryptate-emission*), que proporciona mediciones automatizadas, precisas y reproducibles a los 30 minutos de la obtención

de la muestra sanguínea. Esto ha hecho posible la combinación de la ecografía y las pruebas bioquímicas para asesorar a la paciente acerca del riesgo de cromosomopatías en una sola visita (*One-Stop Clinics for Assessment of Risk*, OSCAR) (Bindra et al 2002, Spencer et al 2003b).

5.3 Fracción Beta de la Gonadotropina Coriónica Humana Libre

La Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) es un heterodímero constituido por una subunidad alfa y otra beta. Se encuentra presente en el suero materno predominantemente con un dímero intacto activo, pero también en menor proporción como subunidades libres (“ β libre” o “ α libre”). Muchos de los modernos análisis de hCG no son específicos y miden tanto el dímero intacto como la subunidad β libre de la hCG. Sin embargo debido a que el dímero intacto se encuentra presente en una concentración 200 veces superior a la fracción libre, las pruebas son un reflejo de la concentración total de la hormona.

Muchos reportes bioquímicos retrospectivos indican que aunque la sub-unidad libre de la hCG es un marcador muy efectivo de síndrome de Down, en el primer trimestre, la hCG intacta no lo es (12). Como resultado la gran mayoría de estudios prospectivos de screening de primer trimestre han usado la combinación de hCG libre, PAPP-A y TN.

En embarazos con trisomía 21 a las 12 semanas, la concentración sérica materna de b-hCG libre es mayor (alrededor de 1.5 MoM) que en embarazos cromosómicamente normales. A medida que progresa la gestación, la diferencia en la concentración materna de b-hCG libre entre embarazos normales y con trisomía 21 aumenta. Estas variaciones en el tiempo de las concentraciones de los marcadores, su interrelación, y su asociación con el peso materno, deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar algoritmos para calcular riesgos paciente-específicos con precisión.

No existe ninguna asociación significativa entre la TN fetal y las concentraciones séricas maternas de b-hCG libre o PAPP-A en embarazos normales o con trisomía 21 y, por tanto, los marcadores ecográficos y bioquímicos pueden ser combinados para proveer un método de cribado más eficaz que cualquiera de los dos por separado (Spencer et al 1999). Seis estudios

prospectivos de cribado han confirmado lo factible y efectivo de la combinación entre la TN y las concentraciones de b-hCG libre y PAPP-A en el suero materno.

5.4 Proteína Plasmática Asociada al Embarazo (PAPPA)

La Proteína A Plasmática Asociada al embarazo (PAPP-A) es una proteasa ligada a la proteína 4 ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina. El factor de crecimiento similar a la insulina juega un papel importante en la regulación del crecimiento fetal por control del ingreso de la glucosa y aminoácidos en cultivos de trofoblasto. Se ha demostrado que ella juega un papel importante en el control autocrino y paracrino de la invasión del trofoblasto a la decidua. De esta manera se ha especulado que ciertas condiciones que están asociados con una inadecuada invasión del trofoblasto en el primer trimestre (aborto, bajo peso al nacer, RCIU y Preeclampsia) se han asociado con bajos niveles de PAPP-A.

Algunos estudios demostraron a comienzos de los 90 (14), que la concentración en suero materno de la Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo (PAPP-A), se encuentra reducida en fetos afectados de trisomía, pero que su desviación de la normalidad va disminuyendo conforme avanza la gestación, haciendo que la PAPP-A sea un marcador útil en el primer trimestre e inútil en el cribado del segundo trimestre.

Un meta análisis estableció que el nivel medio de PAPP-A en suero materno en embarazos afectados de Síndrome de Down es 0,35 Múltiplos de la Mediana (MoM), 0,40 MoM y 0,62 MoM a las 6-8 semanas, 9-11 semanas y 12-14 semanas de gestación, respectivamente, y 0,94 MoM posteriormente; Usando la PAPP-A como único marcador en cribado del primer trimestre se obtuvo una la tasa de detección de aneuploidías del 52% para una tasa de falsos positivos del 5% (15).

Estudios previos han hallado una inconsistente asociación entre niveles de PAPP-A en primer trimestre y niveles de B-hCG libre y resultado perinatal (16). Un estudio determino los niveles de B-hCG y PAPP-A en 73 mujeres cuyos niños tuvieron peso al nacer por debajo del percentil 5 y en 85 mujeres con historia de parto pretérmino (antes de semana 37), comparado con un grupo control. No hubo diferencias significativas entre los grupos de PAPP-A o B-HCG (17).

Sin embargo, un estudio multicéntrico de 8839 mujeres demostró una relación estadísticamente significativa entre niveles de PAPP-A en percentil 5 y RCIU, parto pretérmino, Preeclampsia y óbito fetal (18). Los niveles de B-hCG libre se asociaron con RCIU pero ningún otro resultado perinatal adverso. Un estudio de 5584 pacientes sometidas a screening de primer trimestre para síndrome de Down mostraron una asociación significativa entre niveles bajos de PAPP-A y abortos, hipertensión gestacional, RCIU y Diabetes Gestacional (21).

Estos autores también reportaron una asociación significativa entre niveles de B-hCG libre y abortos, hipertensión gestacional, RCIU y diabetes gestacional.

5.5 Influencia de la raza sobre el cribado de anomalías cromosómicas

En el año 2000, aparece una publicación en la revista de diagnóstico prenatal en la cual, se determina la influencia de la raza sobre los valores bioquímicos de las pruebas de primer trimestre para el cribado de anomalías cromosómicas. En este estudio los investigadores, demuestran que las pacientes de origen afrocaribeño tienen niveles más elevados de PAPP-A y B-hCG comparados con aquellas de origen caucásico. En las conclusiones finales, hacen énfasis en la necesidad de tener en cuenta estas variaciones influenciadas por el origen étnico en los diferentes protocolos que se utilicen para la detección de aneuploidías fetales.

En el año 2007 en la Universidad de Pensilvania, el grupo de investigación de David Stamilio y colaboradores, logró establecer por medio de un estudio de cohorte prospectivo en 2900 mujeres que acudieron a ecografía de rutina entre la semana 15-22, que aquellas mujeres de origen africano tienen una tasa de aneuploidías fetales de menos del 80 % comparado con las de otro origen étnico.

En el 2006 en la ciudad de Bogotá, un grupo de investigadores decidió luego de hacer una búsqueda de información, establecer los niveles de los marcadores séricos de primer trimestre luego de hacer un ajuste por raza. En este estudio se logró establecer que los niveles de B-hCG y

PAPP-A fueron un 15.5 % y 7 % menores, respectivamente, en comparación con la población caucásica (19).

V. Objetivos

a. *Objetivo General*

Determinar el rendimiento operativo de la tamización doble (doble marcador) en primer trimestre luego de la corrección por raza mestiza, en la detección de alteraciones cromosómicas en una población seleccionada de origen colombiano.

b. *Objetivos Específicos*

- a. Establecer los valores normales de las medianas y sus múltiplos para Proteína A Plasmática Asociado al Embarazo (PAPP-A) y Fracción Beta de la Hormona Gonadotropina Humana Libre (B-hCG libre) luego de la corrección por raza.
- b. Establecer la sensibilidad y especificidad de la tamización doble de primer trimestre luego del ajuste por raza.
- c. Determinar los valores predictivos de la tamización doble luego del ajuste por raza.
- d. Realizar una comparación de los valores obtenidos luego de hacer el ajuste con respecto a los valores reportados en la literatura para otras razas.

VI. Aspectos metodológicos

1. Tipo y diseño general del estudio

Se trata de un estudio de validación de prueba diagnóstica, en donde se busca establecer la sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativo y positivo de la tamización doble en primer trimestre luego del ajuste que se realiza para una población latina de origen colombiano seleccionada.

El Gold Estándar de esta prueba será el resultado de cariotipo a través de amniocentesis o biopsia de vellosidad corial o reportes de cariotipo y patología (en caso de abortos o mortinatos) en las pacientes que aceptaron la realización de la prueba diagnóstica, o el resultado post-natal en aquellas que no tenían indicación de realización de procedimientos invasivos (tamización de bajo riesgo) o las que no aceptaron someterse al procedimiento.

2. Población de referencia y muestra

2.1 Población Universo

Pacientes gestantes residentes en la Ciudad de Bogotá, de origen latinoamericano.

2.2 Población blanco

Pacientes atendidas en la Clínica Colsanitas pertenecientes al régimen contributivo, prepagada o particulares, en el período comprendido entre el primero de octubre de 2004 y el treinta de abril de 2010.

2.3 Población a estudio

Pacientes a quienes entre semanas 11-13.6 de gestación se les realizó tamización por medio de doble marcador, con el objetivo de detección de riesgo de alteraciones cromosómicas de la Clínica Colsanitas, en el periodo comprendido entre el primero de octubre de 2004 a treinta de abril de 2010.

2.4 Criterios de selección

a. Criterios de inclusión

- Pacientes con gestaciones intrauterinas entre semanas 11-13.6.
- Naturales de Colombia.
- Embarazo único o simple.
- Embarazo espontáneo.
- No alteraciones anatómicas evidentes en la ecografía.

b. Criterios de exclusión

- Pacientes con razas de origen caucásico, asiáticas o afrocaribeñas.
- Feto con anomalía congénita.
- Pacientes sin reportes de cariotipo por pérdida del embarazo sin estudio genético.
- Pérdida del seguimiento, sin determinar resultado perinatal ni postnatal.
- Productos de técnicas de fertilización In Vitro
- Pacientes con hábito de tabaquismo.
- Gestaciones múltiples.
- Diabetes Mellitus.
- Muestras no tomadas en el laboratorio de la Clínica Colsanitas (Clínica Reina Sofía o Clínica Universitaria Colombia.

2.5 Tamaño de la Muestra

a. Marco Muestral

Pacientes atendidas en la Clínica Colsanitas entre el primero de octubre de 2004 y el 30 de abril de 2010.

b. *Diseño muestral*

Muestra consecutiva o secuencial.

c. *Tamaño de la muestra*

El cálculo del tamaño de muestra fue determinado a través del programa Epidat 3.1, para obtener resultados con una confiabilidad del 95 % y una precisión absoluta o error admisible del 10 %; tasas de detección como lo muestran los estudios a nivel mundial que oscile entre el 88 y 92 % (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) y teniendo en cuenta una prevalencia del 1 %. El tamaño de la muestra es de 4101 pacientes, en este estudio como se trata de un resultado preliminar (hace parte de una línea de investigación) se incluyó un total de 1428 pacientes.

3. *Variables del estudio*

VARIABLE	DEFINICION	DEFINICION OPERATIVA	ESCALA OPERATIVA	ESCALA DE MEDICION
Edad Materna	Edad cronológica de la gestante.	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la toma de la muestra	Años y meses.	Cuantitativa, continua
Raza Latina	Características comunes a un grupo de individuos	Características comunes a pacientes nacidas en Colombia de origen latino.	Si No	Cualitativa, nominal
Edad Gestacional	Edad del embarazo.	Edad cronológica del embarazo datado desde la fecha de última regla confiable o por LCC.	Semanas y días	Cuantitativa, continua
Translucencia Nucal	Acumulación de líquido a nivel de la nuca fetal	Medición de la acumulación de líquido en la parte posterior de la nuca fetal.	Normal o anormal.	Cualitativa, nominal
Niveles de B-	Fracción de la hCG	Marcador	ng/mL.	Cuantitativa,

hCG libre	Beta que no se encuentra unida a receptores	bioquímico tomado en suero materno entre semana 11-13+6 de gestación.		continua
Niveles de PAPP A	Proteína circulante originada a partir del trofoblasto marcador de inadecuada placentación	Marcador bioquímico tomado en suero materno entre semana 11-13+6 de gestación.	mUI/ml.	Cuantitativa, continua
Riesgo	Probabilidad de que un evento ocurra o no.	Probabilidad de tener un hijo afectado con aneuploidías o embarazo complicado	Bajo Alto	Cualitativa, nominal
Aneuploidías	Alteración en el número de cromosomas de un individuo.	Alteración cromosómica identificada en un feto, mortinato o nacido vivo.	47 XY/XX +21 47 XY/XX +13 47 XY/XX +18 45 XX 45 XY...	Cualitativa, nominal
Preeclampsia	Enfermedad del embarazo humano caracterizado por Hipertensión y proteinuria	Embarazada luego de semana 20 con hipertensión asociado a proteinuria.	Si No	Cualitativa, nominal
Hipertensión Gestacional	Elevación de cifras tensionales en el embarazo sin proteinuria	Embarazada luego de semana 20 con HTA sin proteinuria.	Si No	Cualitativa, nominal
Hipertensión	Elevación de cifras de presión arterial, mayor a 140/90 mmHg.	Cifra tensional sistólica mayor o igual a 140 y diastólica mayor o igual a 90 mmHg.	Sí No	Cualitativa, nominal
Proteinuria	Presencia de proteínas en orina en ausencia de nefropatía.	Proteinuria en 24 horas > a 300 mg. o mayor de ++ en 2 muestras aisladas	Mg. o Cruces en muestra aislada.	Cuantitativa.

		separadas por lapso de 4 horas.		
Aborto	Perdida del embarazo antes de alcanzar la semana 20 o peso fetal menor a 500 gr.	Pérdida del embarazo antes de semana 20 o peso inferior a 500 gr.	Sí No	Cualitativa, nominal
Óbito fetal	Muerte del producto de la concepción después de semana 20	Pérdida del embarazo luego de la semana 20 de gestación.	Sí No	Cualitativa, nominal
Restricción del Crecimiento Intrauterino	Feto creciendo por debajo del percentil 10 para la EG con alteración hemodinámica fetal.	Feto por debajo del percentil 10 con doppler alterado o crecimiento por debajo del percentil 3.	Sí No	Cualitativa, nominal
Peso Bajo al Nacer	Peso al nacer por debajo del percentil 10, incluye RCIU y fetos constitucionalmente pequeños	Recién nacido con peso inferior al percentil 10 para la EG al momento del nacimiento.	Bajo peso Normal	Cualitativa, ordinal

4. Técnicas y procedimientos para la recolección de la información

En la Clínica Colsanitas se cuenta con una base de datos denominada PRISCA en la cual se ingresan los datos clínicos, resultados de laboratorios y de ecografía de todas las pacientes a las cuales se les realiza tamización combinada entre semanas 11 a 13.6. Inicialmente se determinó, el grupo poblacional que cumplía con los criterios de selección y se creó una base de datos de dichas pacientes. Posteriormente se realizó una búsqueda de los resultados perinatales, en términos de edad gestacional al parto, complicaciones maternas, fetales y/o neonatales, reportes de cariotipos mediante el análisis de pruebas antenatales realizadas (amniocentesis, biopsias de vellosidad corial, cordocentesis, muestras séricas al nacimiento) o el examen clínico para la detección de alteraciones fenotípicas.

Se ingresó los resultados obtenidos en el sistema de evaluación estadística SPSS, mediante el cual se logró establecer la mediana de los marcadores séricos de B-HCG y PAPP-A para cada una de las edades gestacionales, determinar los múltiplos de mediana para así establecer el punto de corte de mediana para población de raza mestiza. Posteriormente se realizó un cruce de variables para determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos de los marcadores de manera individual y posteriormente corregido. Se comparó los resultados obtenidos de la prueba sin corregir, es decir, utilizando las medianas aplicadas a población caucásica, y luego se realizó la corrección.

5. Métodos para el control de la calidad de los datos

a. Sesgos de Selección

Para evitar los sesgos de selección, la persona encargada de la revisión de historias clínicas era ciego a los objetivos del trabajo de investigación. Se excluyeron en el sistema las pacientes que no cumplieron con los criterios de selección.

b. Sesgos de transcripción

Se realizó un sistema de doble digitación de los datos para evitar los sesgos de transcripción, y se logró excluir pacientes que por errores estaban doblemente incluidas o cuyos datos no aparecían.

6. Materiales y métodos

Se realizó la búsqueda en la base de datos donde está contenida la información de los resultados de la tamización combinada (MoM de las pruebas bioquímicas). Esta base de datos se denomina PRISCA versión 4.0.15.9 manufacturada por DPC en el cual se registran las mediciones bioquímicas y ecográficas para posterior procesamiento de la información en el paquete SPSS para Windows versión 12.

Se aplicaron los criterios de selección y de esta manera obtuvimos una muestra poblacional de 1501 pacientes, de las cuales se excluyeron 83 pacientes que se encontraban en las 10 semanas de gestación.

Los datos obtenidos se compararon con los valores reportados en la literatura mundial para población caucásica en la realización de tamización de anomalías cromosómicas.

El análisis de las pruebas de variables y resultados se realizó a través de la distribución de las pruebas, la PAPP-A y la B-hCG libre en asimetría o sesgo mediante el coeficiente de asimetría. Las medidas gráficas y pruebas estadísticas se realizaron en forma independiente para las semanas 11, 12 y 13 de gestación. El ajuste por raza se realizó aplicando las medianas para niveles de B-hCG y PAPP-A que se obtuvo en este estudio, concluyendo que los niveles de los marcadores bioquímicos de la tamización combinada de primer trimestre en la población colombiana con fetos cromosómicamente normales era 17.1 % más baja para la B-hCG y 19 % para la PAPP-A.

Teniendo esos valores de referencia, se identifican los múltiplos de mediana (MoM) que corresponden a los valores normales y teniendo en cuenta que los MoM normales se sitúan entre 0.5 y 1.0 MoM para la B-hCG y mayor a 0.5 MoM para la PAPP-A, aquellos valores que estuviesen por encima o por debajo se consideraron como anormales. Se comparó el resultado de la prueba con los cariotipos pre o postnatales. Aquellos que permanecen con valores dentro de los límites normales serán los que nos permitirán establecer los falsos y verdaderos negativos. Se realizó la correlación entre las pruebas con los valores convencionales y luego corregidos.

La revisión de historias clínicas estuvo a cargo de una persona independiente del grupo de investigación, la cual se encargó de registrar en otra base de datos las variables con respecto al seguimiento y resultado del embarazo: cariotipo fetal (si las pacientes se realizaron prenatal) o neonatal si lo realizaron al nacer, registros de pediatría para evaluación post-natal (en aquellos en los que no se hizo estudio).

7. Análisis Estadístico

Las características operativas se determinaron en términos de sensibilidad, probabilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Se establecerán los índices de validez y exactitud y sus respectivos intervalos de confianza del 95 %.

Además se realizó curvas de ROC para hacer una evaluación del rendimiento global de la prueba, y hacer la comparación de los resultados de la prueba combinada no corregida con la ajustada raza, y así establecer la comparación del área bajo la curva en cada una de las pruebas.

Se realizó el análisis a través del paquete estadístico ANOVA, análisis de varianza para determinar la diferencia entre los valores ajustados de los niveles hormonales, test post-hoc para determinar las diferencias entre semanas.

VII. Aspectos éticos

La presente investigación por tratarse de un estudio de análisis retrospectivo ofrece un riesgo inferior al mínimo, dado que no realiza ninguna intervención sobre el individuo. Sin embargo, se manejó la información registrada con toda la confidencialidad evitando en las bases de datos utilizar nombres o números de cédulas que pudiesen permitir la identificación de las pacientes y así violentar su privacidad.

Antes de iniciar la recolección de la información el presente proyecto se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Clínica Colsanitas.

VIII. Presupuesto

RUBROS/FUENTES	CANTIDAD	VALOR INDIVIDUAL (en pesos)	VALOR TOTAL (en pesos)
PERSONAL:			
Investigador principal	1	4.000.000	4.000.000
Co-investigadores	1	3.000.000	3.000.000
Bioestadístico	1	0	0
MATERIALES:			
Papel - resma	2	10.200	20.400
Esferos	5	1.150	5.750
Computador	1	2.000.000	2.000.000
Cartucho impresora	1	80.000	80.000
Carpetas	1	5.000	5.000
IMPREVISTOS			500.000
COSTOS DE ADMINISTRACION			1.000.000
GRAN TOTAL			10.611.150

IX. Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEM.				OCTUBRE				NOVIEMB.				DICIEMB.				ENERO							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
PRESENTACION DE IDEA DE INVESTIGACION																																																								
PREPARACION Y PRESENTACION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION																																																								
RECOLECCION DE DATOS																																																								
PRESENTACION DE AVANCES																																																								
TABULACION Y RESULTADOS																																																								
PRESENTACION DEL TRABAJO FINAL																																																								

X. Resultados

Se incluyó un total de 1501 pacientes que cumplieron con los criterios de selección. En la tabla 1 se puede ver la distribución de las pacientes de acuerdo a edad gestacional al momento de la toma de la muestra sérica.

Tabla 1. *Distribución de frecuencia de pacientes de acuerdo a edad gestacional (Semanas)*

EDAD GESTACIONAL EN SEMANAS	NUMERO DE PACIENTES
10	83
11	409
12	578
13	431
Total general	1501

Sin embargo es necesario resaltar que debido a que el estudio es de tipo comparativo solo pudo realizarse la comparación entre las edades gestacionales de 11, 12 y 13 semanas, por lo que se excluyeron los 83 pacientes correspondientes a la semana 10. Se incluye un total de 1418 pacientes.

En primera instancia se verificara el marco de la comparación de las pruebas diagnosticas para determinar cuáles serán las pruebas objeto de comparación.

Análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los valores medios de la Beta-hCG libre y la PAPP-A

Como se tienen valores de múltiplos de mediana por semana y en general, se trata de determinar cuál es el más conveniente para realizar la comparación, por lo cual se realiza una prueba de cambio en el tiempo a través de un análisis de varianza, ya que si existen

cambios significativos a través del tiempo la comparación más conveniente entre las pruebas debe hacerse por la construcción de múltiplos de mediana por semana.

A través del análisis de varianza se busca determinar si existen diferencias significativas entre los niveles medios de la hormona B-HCG libre y de la PAPP-A.

Tabla 2. *Análisis de varianza de las medianas de la B-hCG libre y la PAPP-A*

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
B_HCG_value	Inter-grupos	55593,299	2	27796,649	29,781	,000
	Intra-grupos	1320716,536	1415	933,369		
	Total	1376309,835	1417			
PAPP_A_value	Inter-grupos	1002,240	2	501,120	162,776	,000
	Intra-grupos	4356,185	1415	3,079		
	Total	5358,425	1417			

Notamos que para ambos casos se rechaza la hipótesis nula de igualdad en medias para ambas variables, por lo que no solo se concluye que efectivamente los niveles tanto de la hormona como de la proteína son diferentes en las edades gestacionales de la semana 11 a la 13, sino que es claro que la comparación de la prueba diagnóstica se debe realizar con valores por semana.

Adicional a la prueba de análisis de varianza se realizan las pruebas post-hoc para determinar las diferencias más importantes entre semanas:

Tabla 3. Pruebas post-hoc para determinación de frecuencias de la B-hCG

		B_HCG_value			
Gestation_age_at_sampling_weeks	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
HSD de Tukey ^{a, b}	13	431	32,5118		
	12	578		41,8339	
	11	409			48,6823
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a, b}	13	431	32,5118		
	12	578		41,8339	
	11	409			48,6823
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 461,874.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Tabla 4. Pruebas post-hoc para determinación de frecuencias de la PAPP-A

		PAPP_A_value			
Gestation_age_at_sampling_weeks	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
HSD de Tukey ^{a, b}	11	409	1,6971		
	12	578		2,4376	
	13	431			3,8346
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Duncan ^{a, b}	11	409	1,6971		
	12	578		2,4376	
	13	431			3,8346
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 461,874.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Notamos que los niveles de B-hCG presenta una disminución en la medida en que aumenta el tiempo pasando de 48 en la semana 11 a 32 en la semana 13, contrario a lo que ocurre

con la PAPP-A ya que esta presenta niveles crecientes a través del tiempo pasando de 1.69 en la semana 11 a 3.8 en la semana 13.

Para realizar las pruebas post-hoc se realizaron las pruebas de Tukey y Duncan obteniendo los mismos resultados (Tablas 3 y 4).

Por lo anterior las comparaciones deben realizarse entre pruebas construidas con múltiplos de mediana por semana.

Como la comparación se realizara con las pruebas obtenidas a partir de los múltiplos de mediana construidos por semana se obtuvieron de la literatura estos valores y se compararon contra los obtenidos en la muestra observada:

Tabla 5. *Valores de medianas de B-hCG por edad gestacional y comparación con otros estudios*

EG (Semanas)	Guzmán y Cols. (2006)	Spencer – Caucásicos	Actual
11	40.2	45.3	38.05
12	34.6	37.1	32.5
13	27.7	35.2	26.9

Tabla 6. *Valores de medianas de PAPP-A por edad gestacional y comparación con otros estudios*

EG (Semanas)	Guzmán y Cols. (2006)	Spencer – Caucásicos	Actual
11	1.53	2.13	1.4
12	2.36	2.36	2.01
13	3.72	3.72	3.22

Una vez establecidos los niveles de mediana tanto de la B-hCG como de la PAPP-A tanto para el estudio de Spencer como para la población observada “actual”, se procede a revisar las diferencias entre los resultado de las pruebas, a partir de la definición de los múltiplos de mediana.

Tabla 7. Comparación del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza para el total de la muestra

PRUEBA TOTAL MUESTRA	AJUSTADO (%)	CONVENCIONAL (%)
SENSIBILIDAD	53.3	60,0
ESPECIFICIDAD	94.1	92.1
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	99.5	99.5
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	8.8	7.5

Con el fin de verificar si existen diferencias significativas entre los resultados de las pruebas diagnosticas se realiza una prueba de diferencia de proporciones entre las especificidades obtenidas tanto para la prueba ajustada como para la convencional, de manera general y en las diferentes semanas, obteniendo que existe diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de la población diagnosticadas por las pruebas, con un intervalo de confianza del 95 %, de modo que podemos concluir que las pruebas efectivamente presentan diferencias significativas al usar diferentes valores de múltiplos de median referentes a estudios internacionales y los observados en la población estudiada.

El resultado de la prueba se puede interpretar fácilmente al calcular el intervalo de confianza al 95% para la diferencia de las proporciones de especificidad de las pruebas ajustada y convencional y verificando que este intervalo no contiene el cero, ya que en este caso las diferencias son estadísticamente significativas:

Intervalo de confianza para la diferencia de especificidades, límite superior y límite inferior respectivamente:

$$(e_1 - e_2) + Z_{\alpha/2} * \sqrt{\frac{e_1 * (1 - e_1)}{ne_1} + \frac{e_2 * (1 - e_2)}{ne_2}}$$

$$(e_1 - e_2) - Z_{\alpha/2} * \sqrt{\frac{e_1 * (1 - e_1)}{ne_1} + \frac{e_2 * (1 - e_2)}{ne_2}}$$

Donde e1 es la especificidad de la prueba ajustada y e2 es la especificidad de la prueba convencional.

Al realizar los cálculos se tiene (0.0011 y 0.038) como los valores del intervalo de la diferencia de especificidades, por lo que podemos concluir que los modelos presentan valores de diagnostico estadísticamente diferentes, es decir que efectivamente al cambiar los valores de múltiplos de mediana para determinar el diagnostico de alguna anomalía, si se presentan resultados estadísticamente diferentes en las pruebas.

Del mismo modo que en el caso anterior y para profundizar mas en el análisis realizamos la prueba de diferencias para determinar si por semana se presenta esta diferencia:

Tabla 8. Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 11

PRUEBA SEMANA 11	AJUSTADO (%)	CONVENCIONAL (%)
SENSIBILIDAD	57.1	57.1
ESPECIFICIDAD	87.8	88.1
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	99.2	99.2
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	7.5	7.7

Al realizar los cálculos se tiene que el intervalo de confianza al 95% para la diferencia de especificidades es (-0.04 y 0.035) y como los valores del intervalo de la diferencia de especificidades contiene al cero, podemos concluir que los modelos no presentan valores de diagnostico estadísticamente diferentes, es decir que para los resultados de diagnostico de la semana 11 es igual usar la prueba ajustada a la convencional.

Tabla 9. Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 12

PRUEBA SEMANA 12	AJUSTADO (%)	CONVENCIONAL (%)
SENSIBILIDAD	66.7	66.7
ESPECIFICIDAD	95.3	93.2
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	99.8	99.8
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	6.9	4.9

Al realizar los cálculos se tiene que el intervalo de confianza al 95% para la diferencia de especificidades es (-0.001 y 0.043) y como los valores del intervalo de la diferencia de especificidades contiene al cero, podemos concluir al igual que para la semana 11 que los modelos no presentan valores de diagnostico estadísticamente diferentes, es decir que para los resultados de diagnostico de la semana 12 es igual usar la prueba ajustada a la convencional.

Tabla 10. Cuadro comparativo del rendimiento operativo de la prueba utilizando medianas convencionales y ajustado por raza mestiza en semana 13

PRUEBA SEMANA 13	AJUSTADO (%)	CONVENCIONAL (%)
SENSIBILIDAD	40.0	60.0
ESPECIFICIDAD	98.4	94.4
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	99.3	99.5
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	22.2	11.1

Al realizar los cálculos se tiene que el intervalo de confianza al 95% para la diferencia de especificidades es (0.007 y 0.072) y como los valores del intervalo de la diferencia de especificidades no contiene al cero, podemos concluir al igual que para la prueba en general que los modelos presentan valores de diagnostico estadísticamente diferentes, es decir que para los resultados de diagnostico de la semana 13 no es igual usar la prueba ajustada a la convencional.

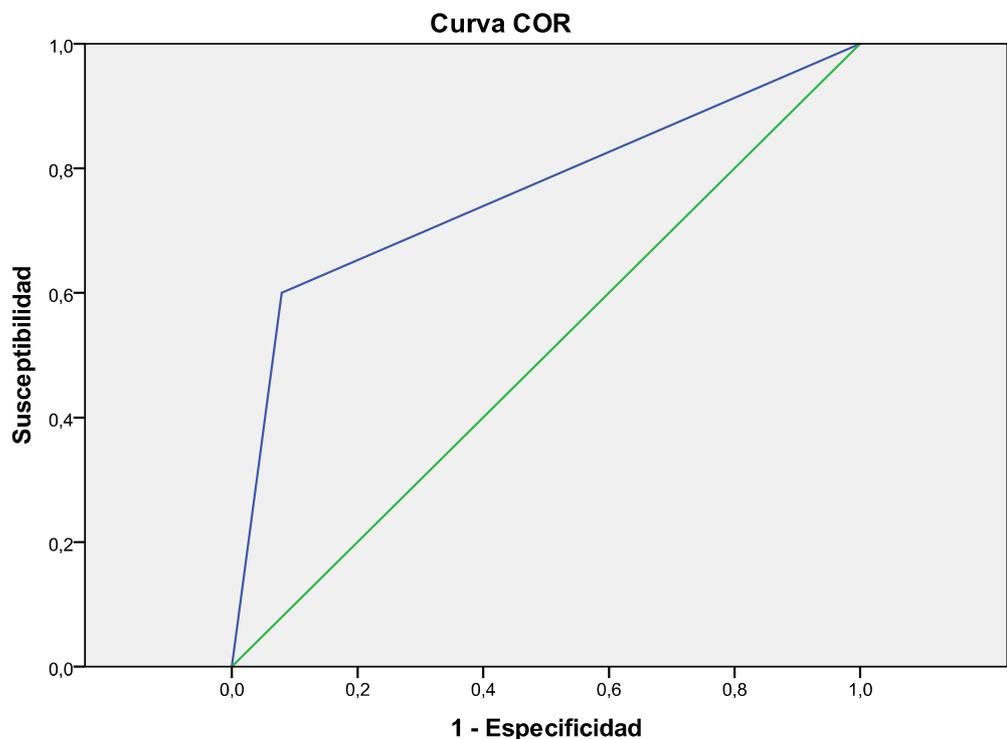
A este punto podemos concluir que las pruebas diagnosticas presentan diferencias estadísticamente significativas solo para los individuos de las semana 13 pero en las semanas 11 y 12 no hay evidencia de diferencias importantes, por lo que para las primeras 2 semanas se podrá utilizar cualquiera de las 2 pruebas.

También es importante resaltar que para la semana 13 las diferencias en las pruebas se debe principalmente a una menor sensibilidad en la prueba ajustada y a una mayor especificidad, siendo menos capaz de detectar anomalía la prueba ajustada que la convencional.

Curvas ROC para pruebas diagnosticas

La curva ROC muestra la relación entre la sensibilidad y el complemento de la especificidad, de modo que permite visualizar de manera grafica la mayor potencia de diagnostico de la prueba en términos de detección de casos anormales, como de detección de casos normales, a continuación se presenta la curva ROC para la prueba utilizando los valores convencionales o de Spencer:

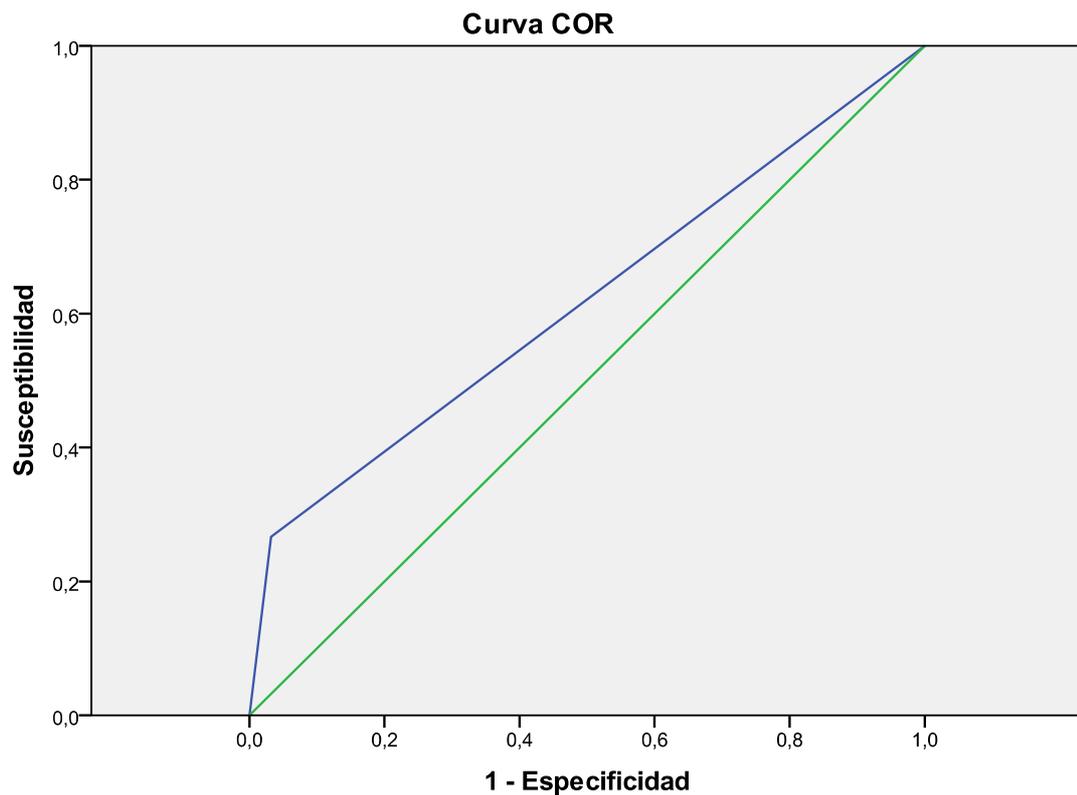
Gráfico 1. *Curva ROC para valores de Spencer (Tamizaje convencional)*



Notese que el área bajo la línea azul “que representa la capacidad de discriminación de la prueba” está entre 0.5 y 1 donde 1 es capacidad de diagnostico total y 0.5 es incapacidad de diagnostico, la prueba utilizando los valores de Spencer da un valor de 0.76, resultando satisfactoria, mientras que como se muestra a continuación para la prueba de valores medianos ajustados este valor es menor, luego podemos concluir que los valores de Spencer

resultan tener mayor sensibilidad en el uso del diagnostico para los pacientes analizados ya que el área para este último caso es de apenas 0.61.

Gráfico 2. Curva ROC para valores ajustados por raza (Tamizaje ajustado)



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

A continuación se presentan graficas de las curvas ROC por semanas con similares interpretaciones a las anteriores.

Gráfico 3. Curva ROC para valores de Spencer en semana 11

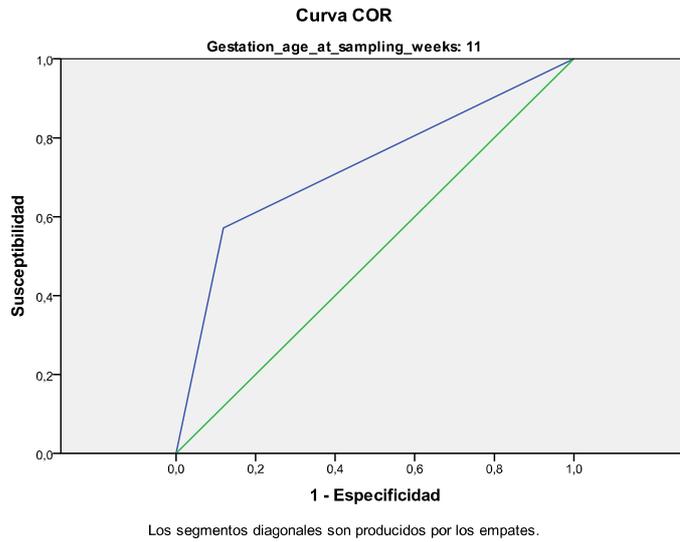


Gráfico 4. Curva ROC para valores de Spencer en semana 12

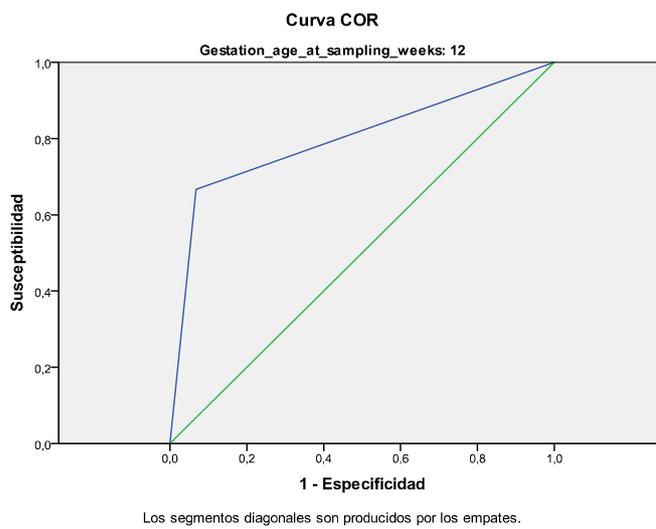
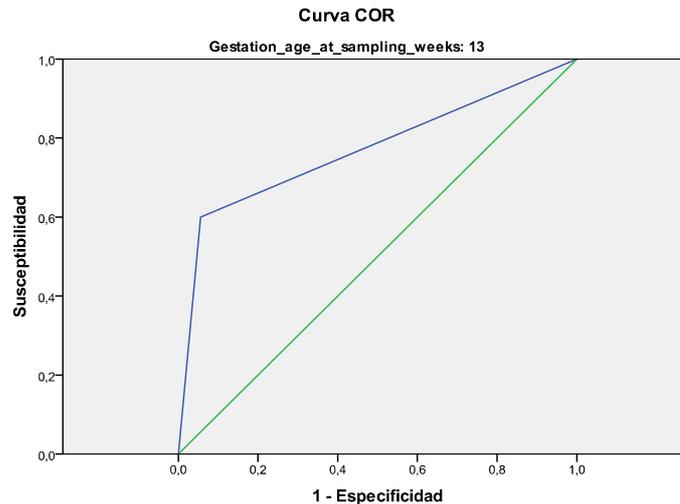


Gráfico 5. Curva ROC para valores de Spencer en semana 13



Ahora las graficas por semana para la prueba ajustada:

Resumen del proceso de casos^{b, c}

Gestation_age_at_sampling_weeks	caretipo_general_a	N válido (según lista)
11	Positivo ^a	7
	Negativo	402
12	Positivo ^a	3
	Negativo	575
13	Positivo ^a	5
	Negativo	426

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a. El estado real positivo es 1,00.

b. Para el archivo segmentado Gestacion_age_at_sampling_weeks = 12, la variable (o variables) de resultado de contraste: anormal_por_B_y_por_PAPP_general tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

c. Para el archivo segmentado Gestacion_age_at_sampling_weeks = 13, la variable (o variables) de resultado de contraste: anormal_por_B_y_por_PAPP_general tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

Gráfico 6. Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 11

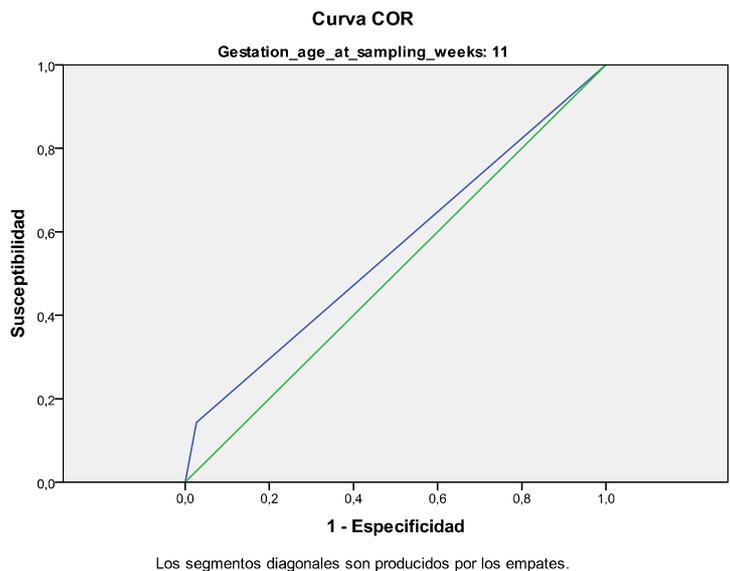


Gráfico 7. Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 12

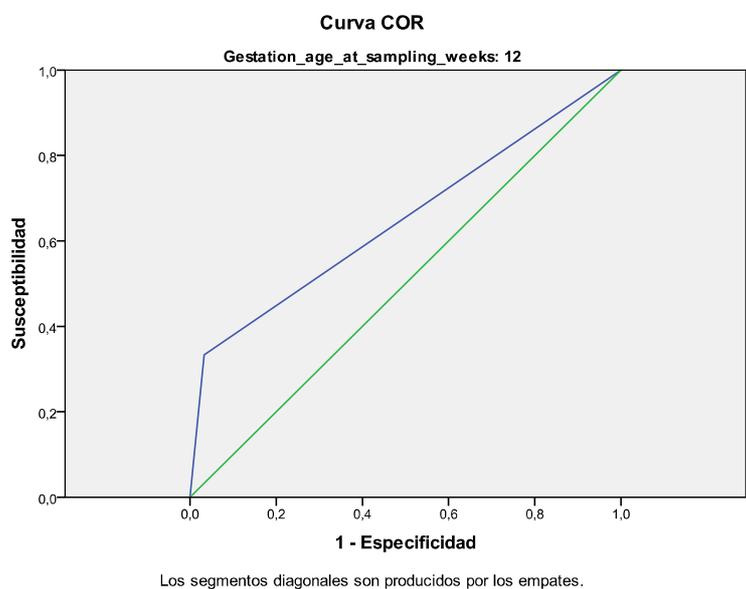
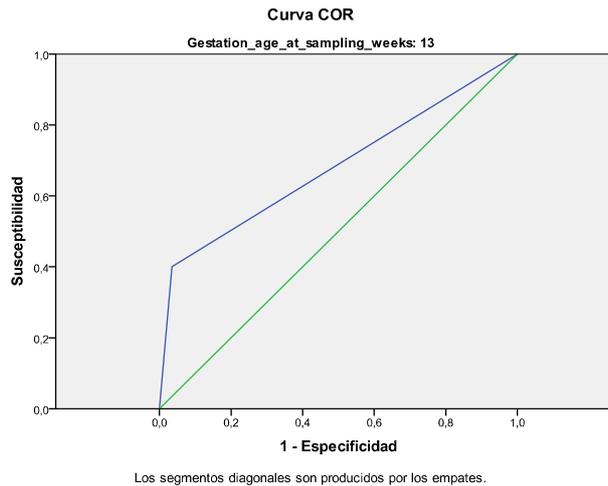
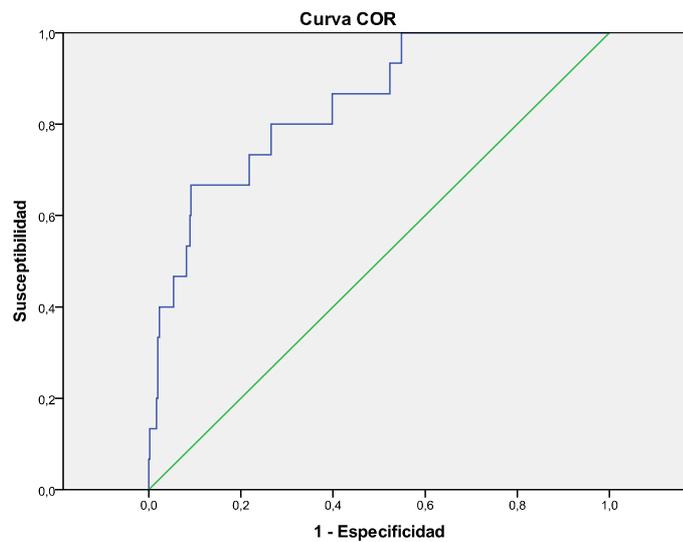


Gráfico 8. Curva ROC para valores ajustados por raza en semana 13



Aproximación por regresión logística binaria

Como sugerencia se deja la inquietud de darle un enfoque a través de modelamiento binomial con regresión logística para mejorar la capacidad de discriminación de la prueba ajustada, sin embargo esto como sugerencia para estudios posteriores, a continuación el resultado de un ajuste realizado como ejercicio:



XI. Discusión

Este es un reporte preliminar de una investigación cuyo cálculo de muestra es de en 4101 pacientes. Al momento de este avance se logró la recolección de 1418 pacientes que cumplieron con los criterios de selección.

Este trabajo queda como una línea de investigación, que busca documentar los valores séricos y las medianas de las hormonas utilizadas en la tamización combinada de primer trimestre, B-hCG y PAPP-A, como método para la detección de fetos en riesgo de alteraciones cromosómicas. Además, permite establecer el rendimiento operativo de la prueba al realizar la corrección de las medianas y sus múltiplos en la detección de fetos en riesgo de aneuploidías.

En este trabajo preliminar, se establece que los valores de las medianas y sus múltiplos para ambos marcadores en la población colombiana, fueron significativamente menores a los de las mujeres caucásicas, afro-caribeñas y asiáticas. Esto está en concordancia parcial con el reporte de Guzmán y cols. (19) en donde el valor de la β -HCG libre fue un 15.5 % menor con relación a la población caucásica y los niveles de PAPP-A un 7 % inferior.

Estudios previos documentan la influencia del origen étnico en el resultado final de los marcadores bioquímicos de primer trimestre para detección de aneuploidías, y reportan factores de corrección para las poblaciones de origen afro-caribeño y asiático, con relación a población caucásica (34, 35).

Estos hallazgos son importantes en la medida en que se establece la variación de las medidas y la corrección de los valores específicos para la población local, con lo cual se puede predecir un aumento en la tasa de detección en relación con los puntos de corte para el cálculo de riesgo de determinada aneuploidía. Sin embargo, este estudio preliminar evidencia que utilizando el doble marcador, luego de la corrección de las medianas de los niveles de B-hCG y PAPP-A para población mestiza de origen colombiano, no se mejora la tasa de detección. Se observa como los niveles de la fracción libre de Hormona Gonadotrófica Humana- Beta tiene una disminución en la medida que avanza la edad

gestacional al contrario de lo que sucede con la Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo la cual presenta un aumento significativo en el transcurso de la gestación.

Al realizar la comparación de las medianas en la población con cariotipos normales se observa una disminución del 17.1 % de los valores de la B-hCG y del 19 % en los valores de la PAPP-A, comparado con los valores publicados por Spencer en relación a población caucásica.

Con base en esta corrección de medianas, se determina como valor anormal Múltiplos de Mediana de la B-HCG por debajo de 0.5 MoM o por encima de 1.5 MoM y Múltiplos de Mediana de la PAPP-A por debajo de 0.5 MoM para cada edad gestacional. Realizando este ajuste tenemos una sensibilidad del 53.3 % comparada con el 60 % evidenciado en los estudios mundiales al utilizar los valores sin corregir. La especificidad es del 94.1 %, lo cual es relativamente mejor comparado con el tamizaje sin ajustar. No existe variación en el valor predictivo negativo (99.5 %) pero existe un discreto incremento en el valor predictivo positivo (8.8 % del ajustado Versus 7.5 % del tamizaje convencional). Al realizar las pruebas de significancia estadística se aprecia que los resultados en las diferentes pruebas son significativos estadísticamente (IC 95 % 0.0011 - 0.038).

Al realizar la discriminación por Edad Gestacional se aprecia que no existen diferencias estadísticamente significativas al aplicar los dos tipos de tamizaciones entre semana 11 y 12 (IC 95 % -0.04 y 0.035 en semana 11 y -0.001 y 0.043 en semana 12). Sin embargo en semana 13 al realizar los cálculos estadísticos se aprecia una diferencia en especificidades con un IC al 95 % entre 0.007 y 0.072, lo cual se permite concluir que las pruebas presentan diferencias pero con mayor sensibilidad pero más baja especificidad al aplicar la tamización sin ajuste.

Como sugerencia para estudios posteriores se deja la inquietud de darle un enfoque a través de modelamiento binomial con regresión logística para mejorar la capacidad de discriminación de la prueba ajustada.

Como este es un estudio con resultados parciales, se esperará completar el total de la muestra para verificar que estos valores se repiten o si al aumentar la muestra existen cambios en el rendimiento operativo de la prueba ajustada por raza.

XII. Conclusiones

Se demuestra que los niveles de la fracción libre de la Gonadotropina Coriónica Humana Beta y los niveles de PAPP-A están considerablemente reducidos en pacientes de raza mestiza de origen colombiano. A pesar de ello, no existe mayor tasa de detección de aneuploidías al realizar el ajuste de las medianas y sus Múltiplos. Queda claro que existe una mayor especificidad pero en semanas 13 no así en las semanas 11 y 12.

Después de comparar las pruebas realizadas entre las pruebas diagnosticas obtenidas a partir de los múltiplos de mediana de Spencer y ajustados para la población estudiada, se puede concluir que no existe diferencia significativa entre los valores de sensibilidad de la prueba, y aunque en primera instancia si se pueden observar diferencias, la prueba para diferencia de proporciones no las determina estadísticamente significativas debido al reducido número de anormalidades

Debido a que se ha observado que existen diferencias significativas entre los niveles hormonales y proteínicos, y por tanto en los diagnósticos que se realizan en las diferentes semanas, sería útil verificar en un estudio posterior el cambio que pueden tener el nivel de la hormona B-HGC y la proteína plasmática PAPPA, pues la prueba diagnóstica puede verse influenciada por la edad gestacional del paciente, esto a través de un estudio de cohorte con medidas repetidas a través de las 3 semanas gestacionales de interés.

En próximos estudios deberá tenerse en cuenta la variable de razas con el fin de garantizar la precisión de los resultados hacia poblaciones de interés, pues debe tenerse en cuenta que a pesar de contar con información de una muestra de tamaño significativo la variedad étnica de la población colombiana es mayor que la de países con el que se realiza la comparación de estudios anteriores, por lo que será de gran utilidad incluir este factor como influyente en el comportamiento de los niveles hormonales, y por tanto en el diagnostico de anormalidades.

Dado el conocimiento que se puede alcanzar de la distribución de los valores hormonales en la población de embarazadas resultaría útil verificar si el método de múltiplos de mediana son los más adecuados para realizar la pruebas diagnosticas o si se puede recurrir

al uso de valores percentiles de las distribuciones de concentración hormonal con el fin de mejorar la capacidad diagnostica de las pruebas.

Con un enfoque de modelamiento multivariado, como el ejemplo de la aproximación por regresión logística binaria podrían obtenerse mejores resultados en la realización de las pruebas diagnosticas miniando el margen de error de diagnostico con el uso de las mismas variables pero aprovechando su condición continua al igual que su interacción en la explicación de la variable respuesta.

Referencias bibliográficas

1. Egan JF, Kaminsky LM, DeRoche ME, Barsoom et al. (2002). Antenatal Down syndrome screening in the United States in 2001: a survey of maternal-fetal medicine specialists. *American Journal Obstetrics Gynecology*; 187:1230-4.
2. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, et al. (2003). First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess*; 7: 1-77.
3. Ong CY, Liao AW, Spencer K, Munim S, et al. (2000). First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *British Journal Obstetrics and Gynecology and International Journal Obstetrics and Gynecology*. 107: 1265–1270.
4. Cowans NJ, Spencer K. (2007). First-trimester ADAM12 and PAPP-A as markers for Intrauterine fetal growth restriction through their roles in the insulin-like growth factor system. *Prenatal Diagnosis*. 27: 264–271.
5. Kavak ZN, Basgul A, Elter K, Uygur M, Gokaslan H. (2006). The efficacy of first-trimester PAPP-A and free beta-hCG levels for predicting adverse pregnancy outcome. *Journal Perinatal Medicine*. 34: 145–148.
6. Nicolaides KH, Azar G, Byne D, et al. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *British Medicine Journal*. 304:867- 89.
7. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. (1998). UK multicenter project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Lancet*. 352:343-6.
8. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:45-67.
9. Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *New England Journal Medicine*. 2005; 353:2001-11.
10. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med*. 1999;341:461-7.
11. Cuckle HS, Wald NJ, Barkai G, et al. First trimester biochemical screening for Down syndrome. *Lancet*.1988;2:851-2.

12. Wapner R., Thom E., et al. First-Trimester Screening for Trisomies 21 and 18. *NEJM*. October 2003.
13. Brambati B, Macintosh MC, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, Bonacchi I, Tului L, Chard T, Grudzinskas JG. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Apr;100(4):324-326.
14. Macintosh MC, Iles R, Teisner B, Sharma K, Chard T, Grudzinskas JG, Ward RH, Muller F. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A, markers for fetal Down syndrome at 8-14 weeks. *Prenatal Diagnosis* 1994 Mar;14(3):203-208.
15. Smith GCS, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1762-7.
16. Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor JM. Combined ultrasound and biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester: a Scottish multicenter study. *BJOG* 2002;109:667-76.
17. Smith GCS, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1762-7.
18. Stamilio D. and cols. (2007). Racial Disparity in Fetal Aneuploidy risk in an ultrasound screening population: a result of selection bias?. *Seminars Maternal Fetal*.
19. Guzmán C., Herrera M., and cols. (2006). Marcadores séricos de aneuploidías en primer trimestre del embarazo en una población obstétrica colombiana.
20. Spencer K, Spencer C., Power M. et al. (2003). Screening for Chromosomal abnormalities in first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years prospective experience. *An International Journal of Obstetrics and Gynecology*.
21. Perni S., Predanic M., Robin K. et al. (2006). Clinical Use of first-trimester aneuploidy screening in a United States population can replicate data from clinical trials. *American Journal Obstetrics and Gynecology*. 194, 127-30.

22. Avgidou K., Papageorghiou A., Bindra R. et al. (2005). Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30.564 pregnancies. *American Journal Obstetrics and Gynecology*. 192, 1761-7.
23. Crossley J., Aitken D., Cameron A. et al. (2002). Combined ultrasound and biochemical screening for Down's Syndrome in first trimester: a scottish multicentre study. *An International Journal obstetrics and Gynecology*. Volumen 109 issue 6.
24. So-Haei Liu S., Cheong M., Lee J. et al. (2004). First-trimester combined Test screening for down syndrome: Results a series with 5.036 cases. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. Vol 43 Issue 2.
25. Valinen Y., Rapakko K., Kokkonen H. et al. (2007). Clinical First-trimester routine screening for Down Syndrome in singleton pregnancies in northern Finland. *American journal Obstetrics and Gynecology*. 196.
26. Graaf I., Cuckle H., et al. (2000). Co-variables in first trimester maternal serum screening. *Prenatal Diagnosis*. Vol. 20, 186.
27. Spencer K., Charas Y., Nicolaides K. (2000). The influence of ethnic origin on first trimester biochemical markers of chromosomal abnormalities. *Prenatal Diagnosis*. Vol. 20, 491.