

VALORACIÓN DEL HUESO NASAL EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE TRISOMÍA 21

B. Adiego. Área de Ginecología y Obstetricia. Fundación Hospital Alcorcón. badiego@fhacorcon.es

Introducción

La trisomía 21 (T21) es la anomalía cromosómica más frecuente en recién nacidos y es la causa del síndrome de Down, una particular combinación de anomalías fenotípicas que incluyen retraso mental y malformaciones congénitas con un amplio rango de variabilidad en sus manifestaciones.

En 1866, Langdon Down refirió que unas de las características más frecuentes en los pacientes con T21 eran una pobre elasticidad cutánea que le daba la apariencia de ser demasiado grande para el cuerpo y un perfil plano, a veces cóncavo, causado por una frente y una mandíbula prominente con subdesarrollo del área nasal debido a una hipoplasia de los huesos nasales (HN) (1). La ausencia de HN se relaciona sistemáticamente con síndromes malformativos y no se ha descrito de forma aislada. Un estudio antropométrico sobre 105 pacientes con síndrome de Down entre 7 meses y 36 años de edad describe un acortamiento anormal en la raíz nasal en un 49,5% de los casos (2).

Hoy en día sabemos que el exceso de piel en la nuca de los individuos con T21 puede observarse por ecografía como una translucencia nucal incrementada y su aplicación a los programas de cribado en el primer trimestre ha demostrado una alta eficacia con un índice de detección (ID) del 82% para una tasa de falsos positivos (FP) del 8.3% (3). La segunda observación de Langdon Down sobre la hipoplasia del HN y su aplicación al diagnóstico prenatal se presenta en la actualidad como un marcador prometedor en el diagnóstico de la T21.

El proceso de osificación intramembranosa del HN se realiza a partir de centros de osificación que están en íntimo contacto con el septo cartilaginoso nasal y procede embriológicamente de células de la cresta neural emigradas del ectodermo al mesénquima de la región frontal del cráneo. El HN está presente desde la 10 semana de desarrollo embrionario y es evidenciable por ecografía ya desde el primer trimestre. La longitud del hueso nasal se relaciona con la edad gestacional y muestra una relación lineal con otros parámetros de crecimiento fetales (4-6).

En el complejo proceso de osificación intervienen múltiples factores tanto genéticos como exógenos. El crecimiento del hueso depende de la matriz colágena circundante y estudios bioquímicos en la piel de fetos con T21 han demostrado alteraciones en la composición de la matriz extracelular, que podría ser atribuida a efectos por exceso de material genético. Se ha descrito un aumento significativo en la cantidad de ácido hialurónico que podría ser consecuencia de un incremento en la superóxido desmutasa, codificada por el cromosoma 21 y que protege frente a la degradación mediada por radicales libres del ácido hialurónico (7). La piel de los fetos con T21 es rica en colágeno tipo IV y los genes de dos de las cadenas de este colágeno están codificadas por el cromosoma 21 (8).

Los estudios radiográficos e histológicos postmortem informan de una frecuencia de ausencia de hueso nasal en un 23-47% de fetos afectados de T21 (9-12) y de ausencia-hipoplasia del 61% (10). Se ha postulado que este hecho podría ser debido a un retraso en la maduración ósea en estos fetos, que podría manifestarse en otras regiones esqueléticas en forma de acortamiento de huesos largos, braquicefalia o hipoplasia de la falange media del 5º dedo (11) característicos todos de la T21.

Técnica de medición.

Se necesita un adecuado entrenamiento para reconocer el hueso nasal hipoplásico que es más corto, delgado, menos ecogénico y de contorno menos definido que el hueso normal. La imagen debe estar magnificada para que solo la cabeza y la parte superior del tórax se incluyan en la pantalla.

La evaluación del HN se realiza en un plano mediosagital con el perfil fetal orientado hacia el transductor. Los HN se identifican como estructuras ecogénicas que se proyectan en sentido anterior cuyo extremo superior se sitúa aproximadamente a nivel del borde superior de la órbita sin extenderse más allá de su reborde inferior. En el plano mediosagital se observan como una fina línea ecogénica que adopta una forma triangular más gruesa al angular el transductor lateralmente. En un desplazamiento más lateral aún, la estructura observada es el maxilar cuyo ángulo es más obtuso respecto al perfil fetal y se extiende por debajo del nivel de la órbita y que no debe confundirse con el HN.

El perfil fetal, línea de referencia que conecta la frente con la barbilla, debe estar en un ángulo de 45º respecto al eje de insonación, o lo que es igual, el ángulo de insonación sobre el HN

debe ser de 90°. Debe desplazarse la sonda mínimamente en sentido parasagital ya que la estructura cartilaginosa de la sutura nasal es lo que se encuentra en el plano sagital exacto. Si el ángulo de insonación es inferior a 45° el HN puede aparecer falsamente ausente y si es próximo a 90° su longitud puede sobreestimarse. Entre la 11-14 semanas el HN presenta pequeñas “extensiones” menos ecogénicas que probablemente representan una osificación incipiente y que no deben incluirse en la medición. (Fig 1 y 2)



Fig. 1. Hueso nasal normal, feto cromosómicamente normal

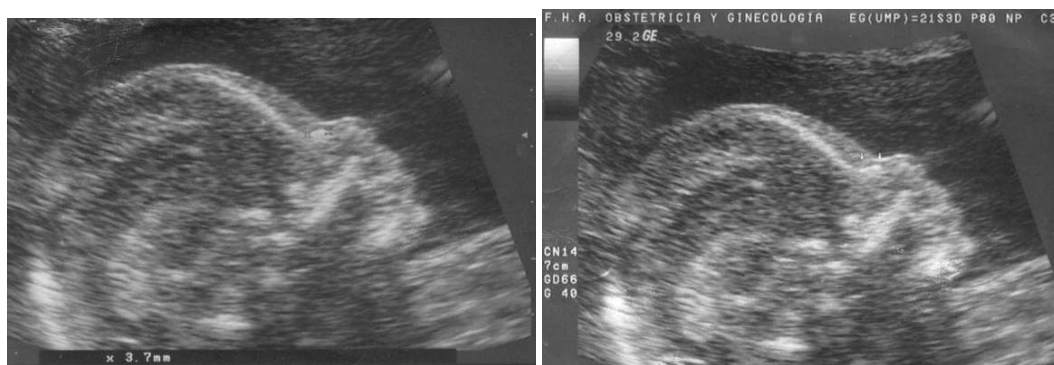


Fig. 2. Hueso nasal hipoplásico, feto portador de trisomía

Tres hitos se requieren para definir las características sonográficas del HN: el HN, la delgada piel sobre la nariz en situación anterior y paralela semejando un “signo igual” y la punta de la nariz en continuidad con la piel pero a un nivel distal a la frente.

En HN en el segundo trimestre

Un informe preliminar sobre tres fetos con T21 observados en segundo trimestre alertó inicialmente sobre la diferencia en la apariencia del HN en fetos afectados de esta anomalía (13), llamando la atención sobre la aparente ausencia o hipoplasia del mismo.

La evaluación del HN en el segundo trimestre hace uso de estos dos fenómenos: ausencia e hipoplasia del HN. Varios estudios se han realizado para confeccionar curvas de normalidad de la medida del HN en distintas edades gestacionales, requisito básico para definir la hipoplasia como una longitud inferior al p 2.5. (4,14, 15).

Vintzileos (16) informa de una frecuencia de ausencia de HN en el sonograma genético del segundo trimestre en un 41% de fetos con T21 y en ningún caso de feto cromosómicamente normal.

Bromley (5) en un estudio sobre 239 gestantes de alto riesgo remitidas para amniocentesis entre la 15 y la 20 semana encontró una frecuencia de HN ausente en un 37% de los fetos con T21 y en un 0.5% de los fetos cromosómicamente normales, con una razón de verosimilitud (LR) de 83. La longitud del HN fue significativamente inferior en los fetos con T21 (3.5 mm vs 4.6 mm) Demostró una asociación lineal entre el DBP y el HN en fetos cromosómicamente normales, sugiriendo que podría emplearse un punto de corte único para la relación DBP/LHN

a lo largo de toda la gestación en el periodo de estudio. Un punto de corte de 10 alcanza un ID del 81% para un 11% de FP y un punto de corte de 11 obtiene un ID del 69% para un 5% de FP.

En una serie sobre 1046 amniocentesis (17) entre la 15-22 semanas, el HN fue ausente-hipoplásico en el 61,8% de fetos con T21, en un 1,2% de fetos cromosómicamente normales y en un 3,3% de fetos con otras anomalías. La LR para T21 en el caso de hipoplasia de HN fue de 132,1 (IC95% 49.1-351.9) para mujeres caucásicas y de 8.5 (IC95%:2.7-20.1) para afrocaribeñas y los valores respectivos para la presencia de HN fueron de 0.39 (IC95%:0.24-0.58) y 0.27 (IC95%:0.05-0.77).

Bunduki (15) investigó la utilidad de la medición del HN en 1631 en el segundo trimestre. La asociación entre hipoplasia (definida como una longitud inferior al p5 para sus curvas de referencia) demostró una sensibilidad del 59% con una tasa de falsos positivos del 5.1% y una LR de 11.6. Igualmente Gamez (18) utilizando un punto de corte del p2.5 de su curva de referencia señala una sensibilidad del 100% para una tasa de falsos positivos del 1.8%.

Aun es prematuro especular sobre las tasas de detección que podrían conseguirse con la combinación de la determinación del HN con los marcadores bioquímicos del segundo trimestre y la EM. Sin embargo los hallazgos de estos estudios sugieren que el HN es el marcador ecográfico de segundo trimestre más prometedor y sugieren su incorporación como inevitable en el estudio ultrasonográfico rutinario de segundo trimestre.

El HN en el primer trimestre

En los últimos años hay evidencia cada vez más consistente de que la ausencia de HN en primer trimestre está asociada con un riesgo aumentado de T21.

En el primer trabajo de Cicero (19) sobre 701 casos en población de alto riesgo remitida para BC, el HN no se visualizó en un 73% de fetos con T21 y en solo 0.5% de fetos normales. La LR para T21 en ausencia de HN fue de 146 (IC95%:50-434) y de 0.27 (IC95%:0.18-0.4) para la presencia de HN. Los autores además no observaron correlación con la TN, sugiriendo que ambos marcadores podrían combinarse para confeccionar una única modalidad de cribado, prediciendo una sensibilidad del 85% para una tasa de falsos positivos del 1%.

Otaño (20) en una serie preliminar sobre 194 gestaciones de alto riesgo observó que la ausencia de HN mostraba un ID del 60%, mientras que solo un 0.6% de fetos normales exhibía esta característica. Igualmente Wong (21) en su breve serie de 143 mujeres de raza china encontró un HN ausente en el 66.7% de fetos con T21 y en el 0.88% de fetos normales, resaltando el hecho de que entre mujeres de raza china la incidencia de ausencia de HN no está incrementada.

Estas ciertas series iniciales se han visto ampliadas recientemente. Cicero (22) en 2003 estudia 3788 embarazos sometidos a biopsia corial en la 11-14s en los que la incidencia de HN ausente fue del 2.8% en los 3358 fetos normales, del 67% de los 242 fetos con T21 y del 33% de los 188 con otras anomalías cromosómicas. En todos los casos la frecuencia de la ausencia de HN descendió con el CRL, aumentó con la TN y fue substancialmente mayor en mujeres de raza afrocaribeña que en caucásicas. En consecuencia el cálculo de la razón de verosimilitud debe ajustarse a estos factores de confusión. Así la LR de T21 para mujeres de raza caucásica fue de 26 y sólo de 7 para mujeres afrocaribeñas, fue de 17 para CRLs entre 45-54 mm y de 44 para CRLs de 75-84 mm, y fue de para TN inferiores al p95 y descendió a 5 para TN de >5.5 mm.

Con posterioridad Cicero amplía su serie en 2004 (23) para reunir 5851 casos en los que describe un HN ausente en un 68.8% de fetos con T21 y un 2.5% de fetos normales. Refiere una asociación entre la ausencia de HN y otros factores como la raza (2.2% en caucásicas, 9% en afrocaribeñas), el CRL (4.7% para CRL:45-54 mm, 1% para CRL: 75-84 mm) o la TN (2.7% para TN <3.4 mm, 15% para TN >5.5 mm) y confecciona un modelo de regresión logística que le permite evaluar el riesgo de T21 en función de estas cuatro variables.

También se han realizado estudios sobre la eficacia de la detección del HN en población general. Zoppi (24) sobre una población de bajo riesgo de 5532 fetos con resultado cromosómico disponible en 3503, encontró un HN ausente en un 70% de fetos con T21 y en un 0.2% de fetos cromosómicamente normales. Al contrario que Cicero encontró una correlación positiva entre la presencia de HN y la TN siendo la TN de 2.9 MoM en fetos con HN ausente y de 1.9 MoM en fetos con HN presente. En caso de que esta correlación se confirmase el HN debería utilizarse más que de forma combinada con la TN, como un método para incrementar la sensibilidad como ha sido propuesto para el estudio del ductus venoso.

Orlandi (25) estudió la presencia del HN en una población no seleccionada de 1027 casos, encontrando un HN ausente en un 66.7% de fetos con T21 y en un 1% de fetos cromosómicamente normales. Utilizando un procedimiento de modelado matemático por ordenador, la combinación de edad materna, TN, HN y marcadores bioquímicos de primer trimestre se obtuvo un ID del 98% para un 5% de FP o del 91% para un 1% de FP.

Viora (26) en su serie de 1906 casos en población de bajo riesgo observó ausencia de HN en un 60% de fetos con T21 y en un 1.4% de fetos cromosómicamente normales. Además en fetos normales encuentra un coeficiente de correlación de 0.09 entre la TN y la ausencia de HN concluyendo que ambos marcadores son independientes y por lo tanto combinables en el cálculo de riesgo de T21. Como novedad incorpora la consideración de hipoplasia (longitud inferior al p10 para un CRL determinado) como marcador de riesgo al igual que se ha realizado en segundo trimestre, y obtiene un 80% de sensibilidad con un 3.7% de falsos positivos. Sin embargo existen objeciones a esta consideración. En un estudio sobre 16 casos de T21 entre la 11-14 semanas se identificó HN hipoplásico en 10 casos y ausente en 6 por ecografía. El estudio patológico demostró la presencia de un centro de osificación en todos los casos, lo que lleva al autor a concluir que la ecografía sirve para distinguir entre ausencia o presencia y no entre normalidad o hipoplasia. (27). Además Cicero (28) realizó una comparación en la medida del HN en la 11-14s y las diferencias entre fetos normales y aneuploides no resultó suficientemente grande como para ser de relevancia clínica.

En todos los estudios llama la atención la proporción extremadamente baja de fetos normales que presentan un HN ausente, lo que hace de este marcador el que se asocia a una tasa de positiva más baja de todos los marcadores aislados. (tabla 1)

Autor	N Población	Medición exitosa	Marcador	HN A T21	HNA Normales	LR+	LR-
Cicero 2001	AR pre BC	701/701 (100%)	Ausencia/presencia	73	0.5	146	0.27
Otaño 2002	AR pre BC	183/194 (94.3%)	Ausencia/presencia	60	0.6		
Zoppi 2003	BR	5525/5532 (99.8%)	Ausencia/presencia	70	0.2	66.7	0.22
Orlandi 2003	BR	1027/1089 (94.3%)	Ausencia/presencia	66.7	1		
Viora 2003	BR	1752/1906 (91.9%)	Ausencia/presencia	60	1.4		
			A-hipoplasia/presencia	80	3.7		
Wong 2003	AR pre BC	119/143 (83.2%)	Ausencia/presencia	66.7	0.9		
Cicero 2003	AR pre BC	3788/3829 (98.9%)	Ausencia/presencia	67	2.8	24	0.34
Cicero 2004	AR pre BC	5851/5918 (98.9%)	Ausencia/presencia	68.8	2.5		

Tabla 1: Resumen de estudios del HN en primer trimestre (11-14 semanas). AR pre BC: Población de alto riesgo remitida para biopsia corial. BR: población de bajo riesgo no seleccionada. HNA T21: proporción de HN ausente en fetos con T21. HNA Normales: proporción de HN ausente en fetos cromosómicamente normales. LR+: razón de verosimilitud para HN ausente. LR-: razón de verosimilitud para HN presente.

Los datos preliminares sugieren que el cribado entre la 11-14 s para T21 mediante una combinación de los marcadores ecográficos TN y HN con los marcadores bioquímicos f-beta-hCG y PAPP-A, podrían asociarse a un índice de detección de 97% para un 5% de FP o una detección del 95% para una tasa de FP del 2%. (29) lo que lo convierte en la estrategia de cribado más rentable (30) (tabla 2).

Estrategia de cribado	ID (%)	FP (%)
EM	30	5
EM + MB1T entre 11-14s	60	5
EM + TN entre 11-14s	75 (o 70)	5 (o 2)
EM + TN + HN entre 11-14s	90	5
EM + TN + MB1T entre 11-14s	90 (o 80)	5 (o 2)
EM + TN + HN + MB1T entre 11-14s	97 (o 95)	5 (o 2)
EM + MB2T entre 15-18s	60-70	5
Marcadores ecográficos y anomalías estructurales en 2T	75	10-15

Tabla 2: Resumen de las distintas estrategias de cribado. Tomado de Nicolaides 2003 (30)
EM: edad materna, MB1T: marcadores bioquímicos b-hCG y PAPP-A, TN: translucencia nucal, HN: hueso nasal, MB2T: marcadores bioquímicos de segundo trimestre.

Reproductibilidad.

Para que un método de cribado pueda ser introducido en la práctica clínica, además de demostrar una sensibilidad y especificidad aceptables debe ser una técnica factible y reproducible.

En lo referente a la factibilidad todos los estudios acuerdan en demostrar que ecografistas entrenados pueden obtener buenos planos en un 99% de los casos. (19,20,22,24,25)

Un estudio sobre 501 fetos consecutivamente explorados por ecografistas con experiencia informó de que el HN puede ser valorado y medido con éxito en todos los casos sin necesidad de prolongar significativamente el tiempo de la exploración (31). Otro estudio que investigó el entrenamiento de 15 ecografistas para identificar el HN demostró que el número de exploraciones supervisadas requerido era una media de 80 con un rango entre 40 y 120. (32).

Sin embargo hay escasas pruebas de que la valoración del HN sea una técnica reproducible. El estudio de Senat (33), señaló una moderada reproductibilidad con un nivel de acuerdo intraobservador del 65-75% e interobservador del 75-80%, con índices Kappa en torno a 0.4. Debe tenerse en cuenta que el impacto del desacuerdo en el cálculo del riesgo es máximo cuando la asignación como ausencia o presencia multiplica el riesgo pretest por 146 o 0.27. Aunque el comportamiento del test en fetos con alto riesgo de T21 se ha referido como bueno, su aplicación a la población general debe acompañarse de programas de entrenamiento y estandarización de la técnica y de controles de calidad.

Resumen

De la revisión de la literatura actual puede concluirse que la valoración del hueso nasal es un instrumento eficaz y prometedor para el cribado prenatal de la trisomía 21. Su uso como marcador único en primer trimestre alcanza índices de detección del 70% para un 1.5% de falsos positivos y del 60% en segundo trimestre para un 3-5% de falsos positivos. El hecho de que se comporte como un marcador independiente de la translucencia nucal o de los parámetros bioquímicos del primer trimestre hace que su valoración pueda incorporarse en un cálculo combinado de riesgo que proporcionaría un índice de detección del 97% para un 5% de falsos positivos. Queda por demostrar que esta técnica tenga una buena reproductibilidad, de manera que antes de implantarse como método de cribado en la población general debe someterse a programas de entrenamiento y de control de calidad apropiados.

Bibliografía

1. Down JH. Observations on an ethnic classification of idiots. London Hospital Clinical Lecture Reports 1866;3:259-62.
2. Farkas LG, Katic MJ, Forst CR, Litsas L. Surface anatomy of the face in Down's syndrome: linear and angular measurements in the craniofacial regions. J Craniofac Surg 2001;12:373-9.
3. Snijders RMJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. 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.
4. Guis F, VilleY, Vincent Y, Doumerc S, Pons JC, Frydman R. Ultrasound evaluation of the length of the nasal bones throughout gestation. Ultrasound Obstet Gynecol 1995;5:304-7.
5. Bromley B, Lieberman E, Shipp TD, Benacerraf BR. Fetal nose bone length. A marker for Down syndrome in the second trimester. J Ultrasound Med 2002;21:1387-94.
6. Sonek, JD, McKenna D, Webb D, Croom C, Nicolaides KH. Nasal bone length throughout gestation: normal ranges based on 3537 fetal ultrasound measurements. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;21:152-5.
7. Bohlandt S, von Kaisenberg CS, Wewetzer K, Christ B, Nicolaides KH, Brand-Saberi B. Hyaluronan in the nuchal skin of chromosomally abnormal fetuses. Hum Reprod 2000;15:1155-58.
8. von Kaisenberg CS, Krenn V, Ludwig M, Nicolaides KH. Collagen type IV gene expression in the skin of trisomy 21 fetuses. Obstet Gynecol 1998;91:319-23.
9. Tuxen A, Keeling JW, Reintoft I, Fisher Hsansens B, Nolting D, Kjaer I. A histological and radiological investigation of the nasal bone in fetuses with Down syndrome. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;22:22-6.
10. Keeling JW, Fisher Hansen B, Kjaer I. Pattern of malformations in the axial skeleton in human trisomy 21 fetuses. Am J Med Genet 1997;68:466-71.
11. Stempfle N, Hutten Y, Fredouille C, Brisse H, Nessmann C. Skeletal abnormalities in fetuses with Down's syndrome: a radiographic post-mortem study. Pediatr Radiol 1999;29:682-8.
12. Larose C, Massoc P, Hillion Y, Bernard JP, Ville Y. Comparison of fetal nasal bone assessment by ultrasound at 11-14 weeks and by postmortem X-ray in trisomy 21: a prospective observational study. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;22:27-30.
13. Sonek JD, Nicolaides KH. Prenatal ultrasonographic diagnosis of nasal bone abnormalities in three fetuses with Down syndrome. Am J Obstet Gynecol 2002;186:139-41.
14. Sonek JD, McKenna D, Webb D, Croom C, Nicolaides KH. Nasal bone length throughout gestation: normal ranges based on 3537 fetal ultrasound measurements. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;21:152-5.

15. Bunduki V, Ruano R, Miguelez J, Yoshizaki CT, Kahhale S, Zugaib M. Fetal nasal bone length: reference range and clinical application in ultrasound screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21:156-60.
16. Vintzileos A, Walters C, Yeo L. Absent nasal bone in the prenatal detection of fetuses with trisomy 21 in a high-risk population. *Obstet Gynecol* 2003;101:905-8.
17. Cicero S, Sonek JD, McKenna DS, Croom C S, Nicolaides KH. Nasal bone hypoplasia in trisomy 21 at 15-22 week's gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21:15-18.
18. Gamez F, Ferreiro P, Salmeán JM. Ultrasonographic measurement of fetal nasal bone in a low-risk population at 19-22 gestational weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;23:152-3.
19. Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides KH. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study. *Lancet* 2001;358:1665-7.
20. Otaño L, Aiello H, Igarzábal L, Matayoshi T, Gadow E C. Association between first trimester absence of fetal nasal bone on ultrasound and Down syndrome. *Prenat Diagn* 2002;22:930-2.
21. Wong SF, Choi H, Ho LC. Nasal bone hypoplasia: is it a common finding amongst chromosomally normal fetuses of southern Chinese women?. *Gynecol Obstet Invest* 2003;56:99-101.
22. Cicero S, Longo D, Rembouskos C, Sacchini C, Nicolaides KH. Absent nasal bone at 11-14 weeks of gestation and chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:31-5.
23. Cicero S, Rembouskos G, Vandercruys H, Hogg M, Nicolaides KH. Likelihood ratio for trisomy 21 fetuses with absent nasal bone at the 11-14 week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;23:218-23.
24. Zoppi MA, Ibba RM, Axiana C, Floris M, Manca F, Monni G. Absence of fetal nasal bone and aneuploidies at first-trimester nuchal translucency screening in unselected pregnancies. *Prenat Diagn* 2003;23:496-500.
25. Orlandi F, Bilardo CM, Campogande M, Krantz D, Hallahan T, Rossi C et al. Measurement of nasal bone length at 11-14 weeks of pregnancy and its potential role in Down syndrome risk assessment. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:36-9.
26. Viora E, Masturzo B, Errante G, Sciarrone A, Bastonero S, Campogrande M. Ultrasound evaluation of fetal nasal bone at 11 to 14 weeks in a consecutive series of 1906 fetuses. *Prenat Diagn* 2003;23:784-7.
27. Minderer S, Gloning KP, Henrich W, Stöger H. The nasal bone in fetuse with trisomy 21: sonographic versus pathomorphological findings. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:16-21.
28. Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Tripsanas C, Nicolaides KH. Fetal nasal bone length in chromosomally normal and abnormal fetuses at 11-14 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11:400-2.
29. Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Spencer K, Nicolaides KH. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent nasal bone, free b-hCG, and PAPP-A at 11 to 14 weeks. *Prenat Diagn* 2003;23:306-10.
30. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21:313-21.
31. Kanellopoulos V, Katssetos C, Economides DL. Examination of fetal nasal bone and repeatability of measurements in early pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:131-4.
32. Cicero S, Dezerega V, Andrade E, Séller M, Nicolaides KH. Learning curve for sonographic examination of the fetal nasal bone at 11-14 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:135-7.
33. Senat MV, Bernard JP, Boulvain M, Ville Y. Intra- and interoperator variability in fetal nasal bone assessment at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22:138-41.