

Aplicació del cribratge combinat bioquímico-ecogràfic en gestacions gemel-lars de primer trimestre per la detecció prenatal d'aneuploidia i d'altres defectes congènits

Anna Goncé Mellgren

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**APLICACIÓ DEL CRIBRATGE COMBINAT
BIOQUÍMICO-ECOGRÀFIC EN GESTACIONS
GEMEL·LARS DE PRIMER TRIMESTRE PER LA
DETECCIÓ PRENATAL D'ANEUPLOÏDIA I D'ALTRES
DEFECTES CONGÈNITS**

Anna Goncé Mellgren

Pel Ramon, el Joan, l'Adrià i la Carlota

*"No estem obligats a fer més del que podem.
Ni del que sabem ni del que ens deixen.
Però estem obligats a intentar-ho."*

F.M.

Agraïments:

A tots els que amb la seva generositat i paciència han fet possible la realització d'aquest treball

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

**Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Pediatria,
Radiologia i Anatomia**

Programa: Obstetrícia i Ginecologia

Bienni: 2005-2007

Memòria presentada per Anna Goncé Mellgren per aspirar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Barcelona sota la direcció del Dr. Antoni Borrell Vilaseca, Professor Associat del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia

Barcelona, juliol 2010

PRESENTACIÓ

Aquesta Tesi Doctoral ha estat estructurada seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesis doctorals com a compendi de publicacions aprovat per la Comissió de Doctorat de la Facultat de Medicina del dia 19 d'abril de 2006

Els dos treballs presentats corresponen a una mateixa unitat temàtica i han estat publicats en els cinc anys previs a la presentació d'aquesta tesi. El doctorand és el primer signant dels dos articles. Les revistes estan indexades dins dels dos primers quartils de l'àrea de coneixement d'Obstetrícia i Ginecologia. S'afegeix també en forma de document annex a la primera publicació, un tercer treball publicat en una revista sense factor d'impacte, però que amplia els resultats obtinguts en el primer treball.

PUBLICACIONS QUE COMPONEN AQUESTA TESI

1. "First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement?"*

Anna Gonc , Antoni Borrell, Albert Fortuny, Elena Casals, M  ngeles Martínez, Imma Mercadé, Vicenç Cararach, Joan Antoni Vanrell

Prenat Diagn 2005; 25: 1156-61 (December 2005)

 rea de Coneixement: Obstetrícia i Ginecologia, Factor d'impacte: 1.64

Quartil: 2n

*Annex a aquesta publicació: "Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado"

Anna Gonc , Antoni Borrell, Elena Casals, Florencia Steinvarcel, Agustí Ser s, Vicenç Cararach, Eduard Gratac s

Prog Obstet Ginecol 2008; 51 (10): 577-85

2. "Prevalence and perinatal outcome of dichorionic and monochorionic twins with nuchal translucency above the 99th percentile and normal karyotype"

Anna Gonc , Antoni Borrell, Eva M ler, Marta Arigita, Josep M  Martínez, Francesc Botet, Aurora Sánchez, Eduard Gratac s

Ultrasound Obstet Gynecol 2010; 35: 14-18 (January 2010)

 rea de Coneixement: Obstetrícia i Ginecologia, Factor d'impacte: 2.69

Quartil: 1r

ÍNDIX

Llista d'abreviacions utilitzades

I INTRODUCCIÓ. PLANTEJAMENT GENERAL I JUSTIFICACIÓ DEL TEMA DE LA TESI	17
1. Gestació múltiple: classificació i prevalença	19
2. Zigositat i corionicitat. Diagnòstic ecogràfic de corionicitat	20
2.1 Zigositat i corionicitat. Riscos associats a les placentes monocorials	20
2.2 Diagnòstic ecogràfic de corionicitat	23
3. Zigositat i risc d'aneuploïdia	24
4. Edat materna i risc d'aneuploïdia en gestacions múltiples	26
5. Cribratge bioquímic de segon trimestre	27
5.1 Cribratge bioquímic de segon trimestre en gestacions úniques	27
5.2 Cribratge bioquímic de segon trimestre en gestacions gemel·lars	28
6. Cribratge d'aneuploïdia mitjançant la translucència nugal (TN) fetal.	30
6.1 Cribratge per TN fetal en gestacions úniques	30
6.2 Cribratge per TN fetal en gestacions múltiples	31
6.3 TN: càlcul de risc d'aneuploïdia en gestacions monocorials i dicorials	32
7. Cribratge bioquímic-ecogràfic de primer trimestre: el Test Combinat	34
7.1 El Test Combinat en les gestacions úniques	34
7.2 El Test Combinat en les gestacions gemel·lars	35
7.3 Distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre en les gestacions gemel·lars	38
7.4 Distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre en funció de la corionicitat	40
7.5 Distribució dels marcadors bioquímics en funció del tipus de reproducció, espontània o medicament assistida (RMA)	40
7.6 Gruix de la TN: variacions en funció de la corionicitat i de les TRA	42
8. Cribratge de trisomia 18 en les gestacions gemel·lars	43

9. Valor dels altres marcadors ecogràfics d'aneuploidia de primer trimestre en la gestació múltiple: l'os nasal i el ductus venós	44
9.1 Valoració de l'os nasal en les gestacions úniques	44
9.2. Valoració de l'os nasal en les gestacions múltiples	46
9.3 Ductus venós i anomalies congènites en les gestacions úniques	47
9.4 Ductus venós anòmal en les gestacions múltiples de primer trimestre	51
10. Defectes estructurals en les gestacions múltiples. Diagnòstic en el primer trimestre.	52
11. TN augmentada amb cariotip normal	55
11.1 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions úniques. Intervals de referència de la TN en el nostre centre.	55
11.2 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions dicorials	58
11.3 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions monocorials. Predicció de resultats adversos i de la síndrome de transfusió feto-fetal (STFF)	58
12. Creixement fetal discordant en les gestacions gemel·lars de primer trimestre	60
12.1 Creixement fetal de primer trimestre i datació en les gestacions múltiples	60
12.2 Creixement discordant de primer trimestre i resultats obstètrics desfavorables.	61
12.3 Creixement discordant de primer trimestre com a predictor de STFF en les gestacions monocorials	62
12.4 Creixement discordant de primer trimestre com a predictor de pes fetal discordant al naixement	63
13 Plantejament general i justificació del tema de la tesi	64
II HIPÒTESI DE TREBALL	67
III OBJECTIUS	71
IV TREBALLS REALITZATS: MÈTODES I RESULTATS	75
1 Metodologia de l'estudi	77
	12

2 Resultats globals	77
3 Treballs realitzats	80
ESTUDI 1. "First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement?" Prenat Diagn 2005; 25: 1156-1161	80
Annex a l'estudi 1: "Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado" Prog Obstet Ginecol. 2008; 51 (10): 577-585	87
ESTUDI 2. "Perinatal outcome of dichorionic and monochorionic twins with an increased nuchal translucency above the 99 th percentile and a normal karyotype" Ultrasound Obstet Gynecol 2010; 35 (1): 14-18	97
V DISCUSSIÓ GENERAL	103
VI CONCLUSIONS	117
VII BIBLIOGRAFIA	121

LLISTA D'ABREVIACIONS UTILITZADES

AFP: alfa-fetoproteïna

DV: ductus venós

DC: dicorial

DZ: dizigòtic

f β -hCG: fracció β lliure de l'hormona gonadotrofina coriònica

FIV: fecundació in vitro

FSH: hormona foliculoestimulant

hCG: hormona gonadotrofina coriònica

ICSI: injeccions espermàtiques intracitoplasmàtiques

IPDV: índex de pulsatilitat del ductus venós

LCC: longitud cefalocaudal

MC: monocorial

MZ: monozigòtic

MoM: múltiples de la mediana

PAPP-A: proteïna plasmàtica A associada a l'embaràs

RCIU: restricció de creixement intrauterí

RMA: reproducció medicament assistida

STFF: síndrome de transfusió feto-fetal

TN: translucència nugal

TRA: tècniques de reproducció assistida

TRAP: seqüència de perfusió arterial reversa

uE3: estriol no conjugat

**I. INTRODUCCIÓ. PLANTEJAMENT
GENERAL I JUSTIFICACIÓ DEL TEMA
DE LA TESI**

1. Gestació múltiple. Classificació i prevalença

Hi ha dos tipus de gestació múltiple: la gestació múltiple dizigòtica que prové de l'ovulació i fertilització de més d'un oòcit i dona lloc a bessons diferents que comparteixen les mateixes semblances i diferències que dos germans, i les gestacions múltiples monozigòtiques que procedeixen de l'ovulació i fertilització d'un únic oòcit amb divisió postzigòtica que dona lloc a bessons idèntics i per tant amb el mateix cariotip. En condicions de fecundació espontània, 2/3 parts de les gestacions múltiples són dizigòtiques i 1/3 part monozigòtiques.

Les gestacions monozigòtiques tenen una freqüència constant que representa aproximadament una de cada 330 gestacions espontànies (0.4%) (Hall, 2003). S'ha vist però, que les tècniques de reproducció assistida (TRA) incrementen 2.25 vegades el risc de gestació monozigòtica (Vitthala et al., 2009) i encara que en menor mesura, els tractaments inductors de l'ovulació també (Källén et al., 2002). Les gestacions dizigòtiques tenen una freqüència variable que sembla tenir relació amb increments de l'hormona foliculoestimulant (FSH) en la mare. L'augment de les concentracions de FSH depèn de factors com ara l'edat materna, amb un increment progressiu del risc de gestació dizigòtica fins assolir un pic màxim cap als 37 anys, factors estacionals i geogràfics, factors ètnics, la paritat, el pes o la talla maternes i de forma induïda, pels tractaments d'inducció d'ovulació (Hall, 2003). Malgrat tot, la causa més freqüent avui dia de gestacions dizigòtiques, és la transferència de més d'un embrió en el decurs dels tractaments de fecundació in vitro (FIV). Aproximadament 93% dels bessons procedents de reproducció medicament assistida (RMA), que inclou les diverses TRA i la inducció de l'ovulació, són dizigòtics (Cleary-Goldman et al., 2005).

A partir del 1980, la prevalença de les gestacions múltiples va patir un augment important en el nostre entorn, degut sobretot a l'expansió dels tractaments de fertilitat, ja que d'una freqüència espontània de 1/80 naixements (12.5‰) es va passar a un 37‰ l'any 2000 a Catalunya o 31.1‰ al 2002 als EUA (Martin et al., 2003). L'endarreriment de la maternitat ha comportat un increment de gestacions

dizigòtiques espontànies, però sobretot un increment de la subfertilitat femenina i per tant de la necessitat de tractaments de reproducció assistida. L'edat materna avançada és un dels factors que comporta un major risc d'aneuploidia associat a les gestacions múltiples (Cleary-Goldman et al., 2005).

2. Zigositat i corionicitat. Diagnòstic ecogràfic de corionicitat

2.1 Zigositat i corionicitat. Riscos associats a les placentes monocorials

Les gestacions dizigòtiques tenen placentes i membranes separades i son sempre dicorials-diamniòtiques, encara que les placentes es puguin fusionar aparentment. Del total de gestacions monozigòtiques, en un 70-75% dels casos els fetus comparteixen la placenta (placenta monocorial diamniòtica) i en 1-2% dels casos comparteixen també el sac amniòtic (placenta monocorial monoamniòtica). La corionicitat i l'amnionicitat depenen del temps transcorregut entre la fecundació i la divisió de la massa embrionària en dos , tal com queda reflexat en la figura 1.

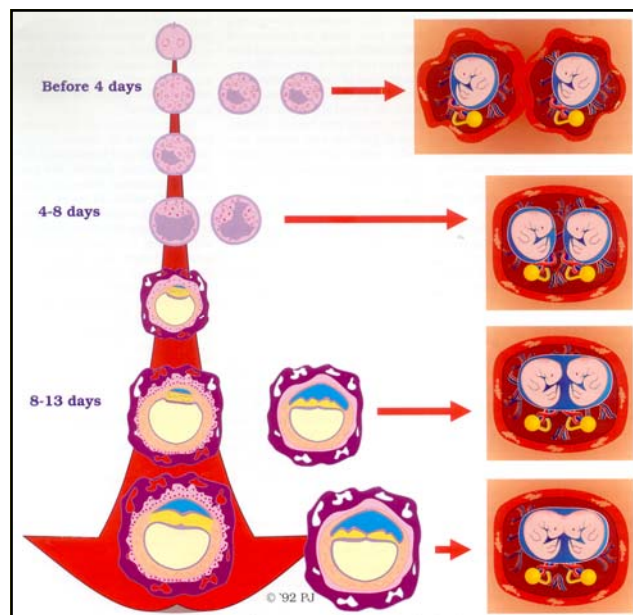


Figura 1: Gestació monozigòtica: corionicitat i amnionicitat, Segons el dia de la divisió postzigòtica. (Font: Philippe Jeanty 1992)

En les gestacions monozigòtiques monocorials sempre existeixen anastomosis vasculars en la placenta entre la circulació dels 2 fetus i en 25% dels casos aquest desequilibri pot donar lloc a una síndrome de transfusió feto-fetal (STFF), que és un desbalanç hemodinàmic crònic entre les dues circulacions, i on un fetus es converteix en donant i l'altre en receptor. En la meitat dels casos (12% de les gestacions monocorials) la STFF és greu, debuta abans de les 26 setmanes i comporta una elevada morbi-mortalitat fetal. El cas més extrem de STFF que es dona en un 1% de les gestacions monocorials, produeix la seqüència de perfusió arterial reversa (TRAP) on el receptor és un fetus acàrdic.

Degut a l'existència d'aquestes anastomosis vasculars, la mort d'un dels bessons en una gestació monocorial pot tenir greus conseqüències sobre el bessó viu. En el moment de l'agonia el fetus sa es pot exsanguinar en el territori feto-placentari del bessó agònic per una caiguda de les seves resistències vasculars, amb un risc superior al 30% de mort o de seqüeles neurològiques (Bajoria et al., 1999; Fusi et al., 1991; Nicolaidis 2004a;).

En general, els resultats perinatals de les gestacions gemel·lars monocorials són pitjors que els de les gestacions gemel·lars dicorials. Sebire i cols (1997a), en un moment on el seguiment ecogràfic de les gestacions monocorials no es feia d'una forma tan sistemàtica com ara, van comparar els resultats perinatals de 102 gestacions monocorials i 365 dicorials, amb el diagnòstic de corionicitat establert durant l'ecografia de primer trimestre. Es va evidenciar que el risc d'avortament, de mortalitat perinatal i de restricció de creixement intrauterí (RCIU) era significativament més elevat en les gestacions monocorials, però el que era especialment rellevant era la mort fetal abans de les 24 setmanes (12.2% dels fetus vs. 1.8%) (Taula 1 i Figura 2). Els autors van atribuir aquests mals resultats a STFF greus, que en la meitat dels casos no haurien estat diagnosticats intraúter.

Un altre estudi més recent, amb 74 gestacions monocorials i 421 dicorials també va posar de manifest que el risc de pèrdua gestacional abans de les 24 setmanes era significativament superior en les gestacions monocorials (10.9% vs. 3.0% $p < 0.05$). La raó de probabilitat (OR) de que el part es produís abans de les 28 setmanes era 4.2 vegades superior en les gestacions monocorials (Sperling et al., 2006).

Resultat	Monocorials (n=102)	Dicorials (n=354)	P
Mortalitat < 24 setm			
Gestacions	13 (12.7)	9 (2.5)	<0.001
Fetus	25 (12.2)	13 (1.8)	<0.001
Mortalitat ≥ 24 setm			
Gestacions	5 (4.9)	10 (2.8)	NS
Fetus	5 (2.8)	11 (1.6)	NS
Neonats vius			
Edat gestacional (setm)	36 (26 a 39)	37 (24 a 41)	0.003
Pes (g)	2353 (482 a 3600)	2600 (680 a 3657)	< 0.001
Discordància pes (%)	10.7 (0 a 37)	9.1 (0 a 47)	NS
Part < 37 setm (%)	56.3	48.5	NS
Part < 32 setm(%)	9.2	5.5	NS
1 fetus pes <10%	52.5	36.7	0.006
Ambdós fetus pes <10%	17.5	7.6	0.004

Taula 1 : Resultats de mort fetal (<24 setm i ≥ 24 setm), fetus vius, discordança de pes, proporció de parts < 37 setm i < 32 setmanes i proporció amb un o ambdós fetus amb pes < percentil 10 per edat gestacional (per gestació única) en gestacions gemel·lars monocorials i dicorials. Valors expressats en percentatges o medianes. NS=no significatiu (Font: Sebire et al., 1997a)

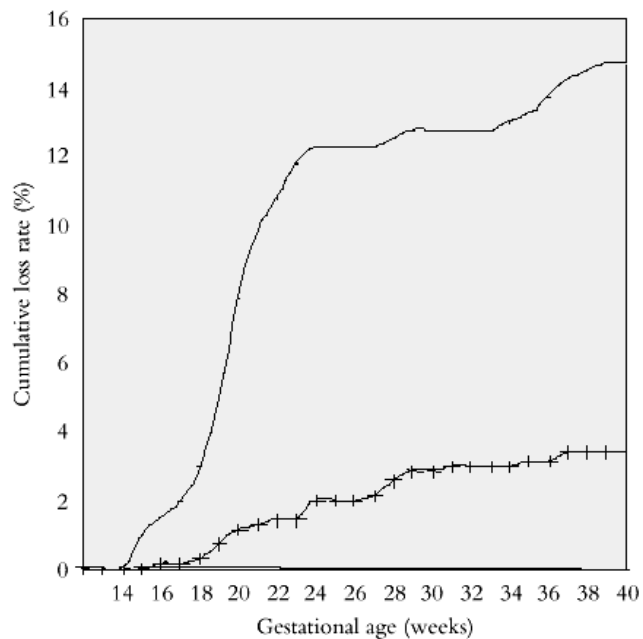


Figura 2: Taxa de pèrdues fetals acumulades, en gestacions gemel·lars monocorials(•) i dicorials (†) a partir de les 12 setmanes (Font: Sebire et al., 1997a)

En cas de gestació dicorial, les placentes no mostren diferències vasculars entre les gestacions monozigòtiques i dizigòtiques (Hall et al., 2003), ni s'han descrit diferències en els resultats perinatals.

2.2 Diagnòstic ecogràfic de corionicitat

La corionicitat és el que marca el pronòstic d'una gestació gemel·lar i condiciona el seguiment que se n'haurà de fer. El diagnòstic de corionicitat és ecogràfic i és indispensable que s'estableixi durant l'ecografia del primer trimestre. Conèixer la corionicitat permetrà realitzar de forma més acurada el cribratge d'aneuploidia, en les gestacions monocorials obligarà a fer un despistatge precoç de la STFF i serà imprescindible per un maneig adequat en cas d'un defecte congènit discordant, d'un RCIU selectiu o de l'òbit d'un bessó. El diagnòstic de la zigositat té menys importància obstètrica i per establir-lo en cas de dubte ecogràfic s'hauria de recórrer a estudis de l'ADN fetal després d'un procediment invasiu.

El diagnòstic ecogràfic de corionicitat, per ser del tot segur, ha de ser realitzat abans de les 15 setmanes. En el cas d'una gestació dicorial es poden observar dues placentes separades, però si són adjacents, presenten un signe ecogràfic inequívoc de dicorionicitat denominat signe de "lambda" que consisteix en una extensió del còrion dins de la membrana amniòtica (Sepulveda et al., 1996). En canvi, en les gestacions monocorials, aquest signe no apareix mai i la unió entre el còrion i l'amni és sempre en angle recte, en forma de "T" tal com es mostra en la imatge de les fotos 1 i 2.

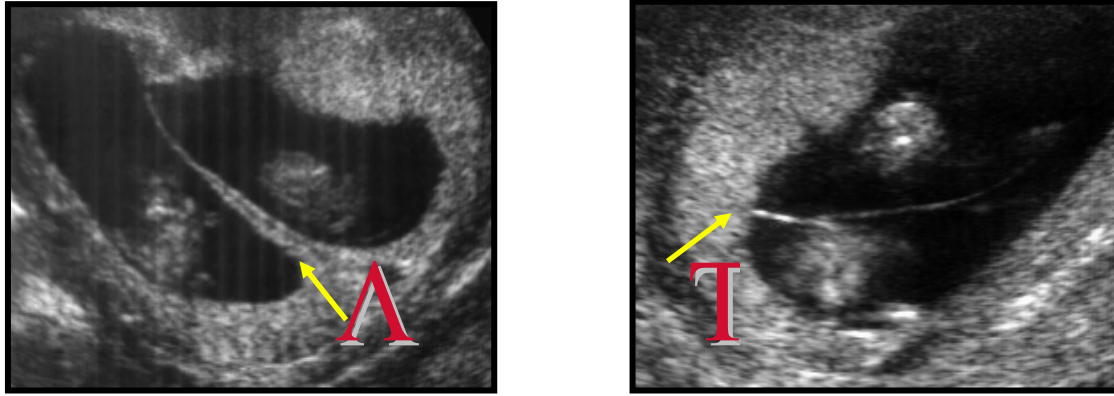


Foto 1 i 2: Signe de "lambda" en la gestació dicorial i signe de "T" en la gestació monocorial.

(Font: Nicolaides K et al., 1999. In "The 11-14 weeks scan" Multiple pregnancy).

En les gestacions monocorials, el signe "T" no canvia però en les gestacions dicorials el signe de "lambda" pot desaparèixer a partir de les 15 setmanes. S'ha vist que a les 20 setmanes aquest signe és absent en 13% de les gestacions dicorials (Sepulveda et al., 1997). En situació de dubte de corionicitat, amb sexes fetals idèntics i en absència de diagnòstic de primer trimestre, la gestació s'haurà de considerar com a monocorial. Aquesta gestació requerirà un seguiment exhaustiu i intervencions o decisions arriscades en cas d'anomalia discordant o d'èxitus o pre-èxitus d'un dels fetus, malgrat que pugui tractar-se en realitat d'una gestació dicorial.

3. Zigositat i risc d'aneuploïdia

La zigositat i no la corionicitat és qui determina el risc d'anomalies cromosòmiques i la concordança de l'anomalia entre els dos fetus. En les gestacions dizigòtiques, cada bessó té un risc independent d'aneuploïdia i així el risc global de la gestació i de tenir un fetus afectat, és el doble del que té una gestació única. El risc específic gestacional s'obté amb la suma dels riscos individuals de cada fetus (Jenkins et al., 2000). En canvi, en les gestacions monozigòtiques, el risc global de la gestació és el mateix que el d'una gestació única, ja que en aquest cas els dos fetus presenten un cariotip concordant (anòmal o normal). Existeix una situació extremadament

infreqüent en què dos bessons monozigòtics poden presentar un cariotip diferent i seran anomenats bessons heterocariocítics (Grynberg et al., 2007).

En la pràctica clínica, en el càlcul del risc d'aneuploïdia i en el consell que es dona als pares sobre el risc de defectes congènits, el concepte de zigositat s'assimila al diagnòstic ecogràfic de corionicitat és a dir gestació monocorial = monozigòtica i gestació dicorial = dizigòtica. Però mentre que el primer supòsit és sempre cert, considerar una gestació dicorial amb fetus del mateix sexe com a dizigòtica és erroni en un 10-20% dels casos, en què es tractaria d'una gestació monozigòtica dicorial. En absència d'ecografia i per tant amb desconeixement de la corionicitat i de la zigositat (sexes fetals també desconeguts), es pot dir que el risc d'aneuploïdia d'una gestació gemel·lar és 1.67 vegades superior al d'una gestació única, si es té en compte que una tercera part de les gestacions son monozigòtiques (Rodis et al.,1990; Fisk NM & Bennett PR., 1995).

Altres autors han redefinit el risc d'aneuploïdia de les gestacions gemel·lars de forma encara més acurada, basant-se en la probabilitat de dizigiositat en funció de l'ètnia materna, de la provenença de RMA, de la corionicitat determinada per ecografia i del sexe fetal. D'aquesta manera (Westover & Fisher; 2001) van dissenyar la següent taula on X representa el risc basal d'una gestació única (Taula 2):

TWIN CONDITION	ANEUPLOIDY RISC
USA population w/out US	33% X + 67% (2X) = 1.67 X
Any race, MC on US (100% MZ)	100% X + 0 % (2X) = X
Any race, DC/diff sex (100% DZ)	0% X + 100% (2X) = 2 X
Caucasian, DC/same sex	20% X + 80% (2X) = 1.8 X
Afr-Amer, DC/same sex	10% X + 90% (2X) = 1.9 X
Asian, DC/same sex	30% X + 70% (2X) = 1.7 X
Any race + ART/DC/same sex	2% X + 98% (2X) = 1.98 X

Taula 2: Refining the risk of aneuploidy in twins (Font: Westover & Fischer, 2000) MC, monochorionic; DC, dichorionic; US, ultrasound; ART, assisted reproductive technology

4. Edat materna i risc d'aneuploïdia en gestacions múltiples

L'edat materna avançada s'associa amb un risc augmentat d'aneuploïdia. En la dècada dels anys 1970 quan es va introduir l'amniocentesi, es va decidir per raons logístiques que els 35 anys, que representava en aquell moment el 5% de la població gestant, s'havia de considerar l'edat de risc a partir de la qual era raonable oferir el cariotip fetal (Odibo et al., 2003). També s'ha dit que aquest punt de tall es va establir perquè el risc de trisomia 21 als 35 anys era similar al risc de pèrdua fetal atribuïble a l'amniocentesi. En les gestacions múltiples, degut al risc additiu d'aneuploïdia generat per cada un dels fetus en les gestacions dizigòtiques, diversos autors van calcular l'edat considerada correcte per recomanar el cariotip per a obtenir la mateixa detecció que en gestacions úniques (Rodis et al., 1990 i Meyers et al., 1997). Rodis i cols.(1990), considerant una proporció fixa de gestacions dizigòtiques (80%) van calcular que el punt de tall s'hauria d'establir als 32 anys, però posteriorment Meyers i cols.(1997) van redefinir aquest càlcul tenint en compte les variacions de la zigositat en funció de l'ètnia i l'edat materna i van estimar que el punt de tall s'hauria d'establir als 31 anys, és a dir 4 anys abans que en les gestacions úniques. No obstant, un estudi posterior que recollia dades poblacionals del Regne Unit va suggerir que la utilització única de l'edat materna sobreestimava el risc de trisomia 21 en les gestacions de bessons, ja que el risc de trisomia 21 d'una gestant amb bessons no diferia del que presenta una gestant de la mateixa edat amb un únic fetus (Cuckle, 1998; Wald and Rish, 2005). Un estudi epidemiològic posterior a Bèlgica, també va evidenciar una menor freqüència de trisomia 21 en bessons (Jamar et al., 2003).

El cribratge d'aneuploïdia basat únicament en l'edat materna té una sensibilitat baixa, del 30% per un 5% de falsos positius. Però tenint en compte l'increment importantíssim de l'edat materna iniciat a la dècada del 1970, amb una proporció creixent de gestants per sobre dels 34 anys, que ja era del 32% a l'any 2002 a la ciutat de Barcelona (REDCB 2003), el fet d'establir el punt de tall per indicar el cariotip als 35 anys, portaria a un nombre inadmissible de procediments invasius innecessaris. En les mares de bessons, l'increment de l'edat és encara més acusat i els procediments invasius son més complexes i presenten més risc. Per aquest

motiu i amb la introducció d'altres proves de cribratge més sensibles i específiques, la International Down Syndrome Screening Group (IDSSG) (Ferguson Smith et al., 2004) ja a l'any 2004 va recomanar que es deixés de considerar l'edat materna aïllada com a indicació de procediment invasiu.

5. Cribratge bioquímic de segon trimestre

5.1 Cribratge bioquímic de segon trimestre en gestacions úniques

En els anys 1970 es va descriure l'associació entre nivells augmentats d'alfa-fetoproteïna (AFP) en líquid amniòtic i posteriorment en sèrum matern, i la presència d'un defecte de tub neural en el fetus (Brock et al., 1972). El 1984 es va observar que els fetus amb trisomia 21 presentaven uns nivells disminuïts d'AFP en sang materna (Merkatz et al., 1984). Degut a que en condicions normals les concentracions d'AFP augmenten a mesura que augmenta l'edat gestacional, es va decidir no expressar els valors en unitats absolutes, sinó en funció de l'edat gestacional i d'aquesta manera després de calcular les medianes (percentil 50) per cada setmana gestacional, els valors absoluts es converteixen en múltiples de la mediana (MoM).

El 1987, es va trobar que un segon paràmetre en sang materna, la gonadotrofina coriònica (hCG), presentava una concentració mitjana superior al doble de l'esperable (>2 MoM) en les gestacions afectes de síndrome de Down (Bogart et al., 1987). Poc després es va trobar un tercer paràmetre, l'estriol no conjugat (uE3), amb valors disminuïts en les gestacions afectes (0.73 MoM) (Canick et al., 1988). A partir d'aquestes observacions, Wald i cols., (1988) van publicar un estudi multicèntric que va establir les pautes metodològiques del cribratge bioquímic en les gestacions úniques. La combinació global dels 3 paràmetres amb l'edat materna ("Triple Test") permetia detectar el 65% de les gestacions amb trisomia 21, per un 5% de falsos positius, aplicant com a punt de tall de risc 1/250. A Europa, el "Double Test" sense l'uE3, ha estat més utilitzat que el "Triple Test" però ha aconseguit un índex de detecció semblant (Wald et al., 2003a) i es el

model que es va introduir a Catalunya al 1998 (Protocol de seguiment de l'embaràs a Catalunya, 1998).

Existeix una tendència a substituir la fracció total, per la fracció β lliure de la hCG (f β -hCG), ja que millora lleugerament la taxa de detecció de trisomia 21 en el segon trimestre (Wald al., 1993), però sobretot la seva efectivitat millora quan s'utilitza en el primer trimestre.

5.2 Cribratge bioquímic de segon trimestre en gestacions gemel·lars

En les gestacions gemel·lars, el valors dels marcadors bioquímics en sang materna són aproximadament del doble dels observats en les gestacions úniques. Wald i cols., (1991) a partir de la mitjana dels MoM obtinguda per cada un dels 3 marcadors sèrics de segon trimestre (AFP: 2.13, hCG:1.84 i uE3: 1.67) en una sèrie de 200 gestacions gemel·lars, van proposar dividir el valor total de cada marcador pel factor de correcció corresponent, i així estimar el risc de trisomia 21 com si es tractés d'una gestació única. Aquest mètode, que els seus autors anomenen "pseudo-risc", presenta una taxa de falsos positius similar a la que s'obté en gestacions úniques (Wald et al., 1991).

Una modelació estadística a partir dels resultats del "Triple Test" en 274 bessons de segon trimestre amb cariotip normal mostrava que la detecció de trisomia 21 variava de manera important entre bessons monozigòtics i dizigòtics ja que en els monozigòtics era del 73%, i en els dizigòtics del 43% amb una detecció global del 53%, sempre per un 5% de falsos positius (Neveux et al.,1995). Un estudi sobre la utilització del "Double Test" (AFP i hCG) en una sèrie de 420 gestacions gemel·lars que contenia 8 fetus amb trisomia 21 discordant, va obtenir una detecció del 51% per un 5% de falsos positius (Spencer et al., 1994).

Una meta-anàlisi posterior de Cuckle, que inclou 8 estudis de marcadors bioquímics de segon trimestre en bessons, va mostrar que la mediana de l'AFP, l'hCG i l'uE3 en gestacions gemel·lars euploides era de 2.26, 2.06 i 1.68 vegades l'observada en gestacions úniques, respectivament. Utilitzant aquests factors de

correcció, va estimar que s'obtidria una detecció de trisomia 21 del 45% per un 5% de falsos positius (Cuckle 1998).

En gestacions gemel·lars, el cribratge bioquímic de segon trimestre ha estat qüestionat per diversos motius (Nicolaidis 1999; Maymon et al., 2002). En primer lloc, perquè assumeix una contribució dels marcadors igual per cada un dels fetus, en segon lloc perquè la taxa de detecció de trisomia 21 és baixa, un 15 % inferior a la de les gestacions úniques, en tercer lloc perquè no es pot identificar quin és el fetus de risc i finalment perquè una finalització selectiva en el segon trimestre per aneuploïdia discordant, té més risc que en el primer trimestre.

Més recentment, Muller i cols., en un sèrie prospectiva molt àmplia de cribratge bioquímic de segon trimestre en més de 11 000 gestacions gemel·lars i 65 000 gestacions úniques a França, van obtenir uns resultats més favorables. La freqüència de gestacions amb trisomia 21 no mostrava diferències significatives entre bessons i únics (1/649 vs 1/754) ni tampoc la detecció de trisomia 21, encara que era 11 punts inferior: 74% en únics vs. 63% en gemel·lars (71% quan els 2 fetus eren afectes i 60% quan només n'era un). La taxa de falsos positius era molt similar, 10.8% en els gemel·lars i 10.3% en els únics. Aquests autors conclouen que el cribratge bioquímic de segon trimestre és clínicament aplicable i efectiu en les gestacions gemel·lars (Muller et al., 2003; Garchet-Beaudron et al., 2008).

Malgrat que algun estudi ha avaluat la distribució dels marcadors bioquímics de segon trimestre en les gestacions triples (Spencer et al., 1994), els cribratges que es basen únicament en la determinació de marcadors sèrics materns no semblen clínicament aplicables en les gestacions de més de 2 fetus.

6. Cribratge d'aneuploidia mitjançant la translucència nucal (TN) fetal

6.1 Cribratge per TN fetal en gestacions úniques

Als anys 1980 es va relacionar l'engruiximent del plec nucal fetal per sobre de 6 mm, visualitzat en el moment de realitzar l'amniocentesi entre les 15 i les 20 setmanes, amb la síndrome de Down (Benacerraf et al., 1987). Posteriorment, a l'inici dels anys 1990, diversos autors van demostrar en gestacions de risc també una associació entre una TN augmentada en el primer trimestre de la gestació i anomalies cromosòmiques (Nicolaidis et al., 1992; Johnson et al., 1993). En el primer trimestre s'utilitza el terme TN, ja que en aquest període gestacional tots els fetus presenten una certa acumulació de líquid a la zona nucal mesurable ecogràficament. Un ampli estudi multicèntric que incloïa més de 20 000 fetus únics va demostrar que la mida de la TN entre les 10 i les 14 setmanes no presentava un punt de tall fix, sinó que augmentava a mesura que augmentava la longitud cefalocaudal fetal (LCC) i que una TN per sobre del percentil 95 identificava al 77% de fetus amb trisomia 21 i altres aneuploidies, per un 5% de falsos positius (Pandya et al., 1995). El mateix grup del Prof. Nicolaidis va estandarditzar el sistema de mesura de la TN i va establir uns criteris molt estrictes perquè el cribratge obtingués resultats uniformes entre els diferents operadors. Així van establir que la mesura òptima de la TN s'obtenia amb una LCC d'entre 45 i 84 mm, és a dir entre les 11⁰ i les 13⁶ setmanes (Pandya et al., 1995; Nicolaidis, 1999). L'estudi FASTER (First and Second Trimester Evaluation of Risk) es va dissenyar per veure si la mesura de la TN era també aplicable a les gestacions dels Estats Units d'Amèrica. L'estudi incloïa 38 000 gestacions úniques i 117 fetus amb trisomia 21, i els resultats obtinguts en la taxa de detecció de la trisomia 21 van ser lleugerament inferiors. Es va veure que disminuïen progressivament entre les 11 i les 13 setmanes, ja que la detecció a les 11 setmanes era del 70% i a les 13 setmanes del 64%, sempre per un 5% de falsos positius (Malone et al., 2005).

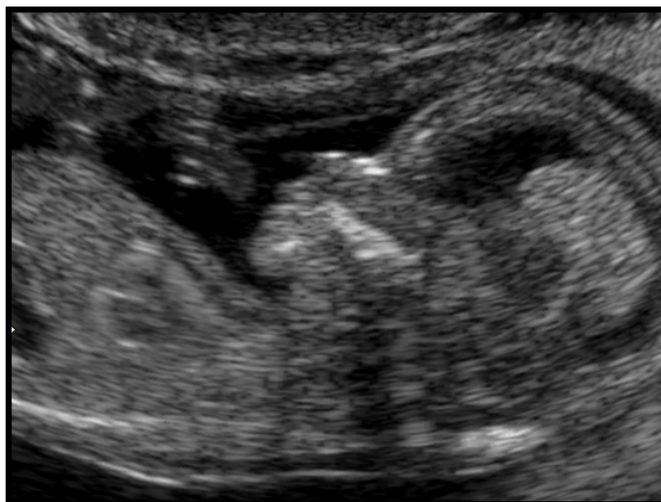


Foto 3: Tall correcte per a la mesura de la TN (Font: ICGON)

6.2 Cribatge per TN fetal en gestacions múltiples

Pandya i cols., al 1994 van constatar que la TN era també útil en gestacions gemel·lars ja que la TN a les 11-13⁶ setmanes estava augmentada (> 2.5 mm) en 8 dels 9 bessons trisòmics discordants i només en 1 dels 9 fetus amb cariotip normal (Pandya et al., 1994). Aplicant el percentil 95 a la TN, Maymon i cols. van observar que la TN estava augmentada en 16 fetus de 174 gestacions gemel·lars (4.6%) inclosos els 5 que presentaven una anomalia cromosòmica (Maymon et al., 2002). En un estudi previ, aquests autors havien comparat la mesura de la TN fetal en el primer trimestre amb el cribatge bioquímic de segon trimestre en 60 gestacions gemel·lars i van evidenciar que el 15% de falsos positius que obtenien amb la bioquímica materna disminuïa al 5% amb el cribatge ecogràfic. L'únic fetus amb trisomia 21 va ser identificat amb la mesura de la TN (Maymon et al., 1999a).

Un estudi molt més ampli del grup del Prof. Nicolaides, que incloïa 448 gestacions gemel·lars amb 8 fetus amb trisomia 21, va evidenciar que la TN estava augmentada per sobre del percentil 95 calculat en gestacions úniques, en 7 dels 8 fetus afectes de trisomia 21 (87.5%). En el grup de fetus euploides, la proporció de bessons monocorials (8.4%) amb una TN augmentada era superior a la dels dicorials (5.4%). La proporció de gestacions amb TN augmentada en al menys un dels fetus era del 13.7% en les gestacions monocorials i del 11.1% en les dicorials. Els autors van concloure que amb la mesura de la TN associada a l'edat materna

s'aconseguia la mateixa detecció de trisomia 21 que en les gestacions úniques, però amb un lleuger increment de falsos positius en les gestacions monocorials. Els autors van atribuir aquest fet a fenòmens hemodinàmics propis d'una STFF incipient (Sebire et al., 1996 i 1997b).

La mesura de la TN ha estat considerada durant molts anys el "gold-standard" del cribratge d'aneuploïdia en les gestacions múltiples. En primer lloc, perquè a diferència del cribratge bioquímic, en tractar-se d'un marcador fetal, es pot realitzar un càlcul de risc individualitzat per cada fetus en funció de la seva pròpia TN i a més permet identificar al fetus de risc i al fetus afecte en cas d'anomalia cromosòmica discordant. En segon lloc, perquè en ser un cribratge de primer trimestre, permet la realització d'un procediment invasiu (biòpsia de còrion) abans de les 14 setmanes i la obtenció dels cariotips fetals abans de les 16 setmanes. En cas d'aneuploïdia discordant, s'ha vist que la finalització selectiva té un risc de pèrdua global de la gestació tres vegades superior quan es realitza després de les 16 setmanes (Evans et al., 1994). I finalment, perquè la mesura de la TN associada a l'edat materna és l'únic cribratge d'aneuploïdia aplicable en gestacions de més de dos fetus (Maymon et al., 1999b).

6.3 TN: Càlcul de risc d'aneuploïdia en gestacions monocorials i dicorials

En les gestacions múltiples, el càlcul de risc d'aneuploïdia mitjançant la mesura de la TN associada a l'edat materna, ha de tenir en compte la corionicitat. En les gestacions monocorials, que són sempre monozigòtiques, el risc d'un fetus és coincident amb el de l'altre i per tant el risc de la gestació és únic, com si es tractés d'una gestació amb un sol fetus. Durant molts anys no era clara quina era la millor forma per calcular el risc global de la gestació: utilitzant la TN superior, la TN menor o la mitjana de les dues (Nicolaidis et al., 1999, Zoppi, 2009). Aquestes tres possibilitats van ser comparades en 769 gestacions monocorials. Aplicant el punt de tall de risc a 1/300, es podien diagnosticar les 6 gestacions afectes de trisomia 21 quan s'utilitzava la TN superior o la mitjana, però en canvi amb la TN menor només es detectaven 4 de les 6 gestacions afectes (66.7%) (Vandecruys i cols., 2005). Les taxes de falsos positius van ser de 19.4%, 7.5% i 13.9%, respectivament, tal com queda reflectit en la Taula 3. Els autors van concloure que

degut a l'increment de falsos positius, el més acurat en les gestacions monocorials era utilitzar la mitjana de les dues TN i com que no hi ha hagut altres estudis comparatius, aquesta és la recomanació actual (Cleary-Goldman and Berkowitz, 2005; Wald and Rich, 2005; Nicolaidis, 2004a; Protocol de Diagnòstic Prenatal actualitzat, Generalitat de Catalunya 2009).

Risc estimat $\geq 1/300$	Normal	Trisomia 21
Fetus amb TN major	148/761 (19.4%)	6/6 (100%)
Fetus amb TN menor	57/761 (7.5%)	4/6 (66.7%)
TN mitjana entre els 2 fetus	106/761 (13.9%)	6/6 (100%)

Taula 3: Taxa de detecció de trisomia 21 i de falsos positius en gestacions monocorials utilitzant la TN major, menor i mitjana i un cut-off $\geq 1/300$. (Font: Vandecruys et al., 2005)

No obstant, altres autors troben difícil acceptar la decisió imparcial de calcular la mitjana de les dues TN i el risc gestacional a partir d'una hipotètica LCC mitjana dels dos fetus (Zoppi, 2009). Encara que la literatura moltes vegades no ho especifica, sembla que el més acurat a l'hora de fer el càlcul de risc en les gestacions gemel·lars tant monocorials com dicorials, sigui utilitzar una única edat gestacional derivada de la LCC del fetus més gran, ja que es considera possible una restricció del creixement fetal precoç però no un creixement augmentat (Protocol de Diagnòstic Prenatal, Generalitat de Catalunya 2008).

En les gestacions dicorials, malgrat que aproximadament un 10% són monozigòtiques (Fisk and Bennett, 1995) s'assumeix que són dizigòtiques i que cada fetus té el seu propi risc independent d'aneuploïdia. Sembla ser que l'omissió d'aquest 10% de gestacions monozigòtiques no afecta de manera substancial l'efectivitat del cribratge (Wald et al., 2003b). En fer el càlcul de risc de la gestació, es poden calcular dos riscos, un per cada fetus en funció de la seva pròpia TN a partir de la distribució dels valors de la TN en fetus únics (Sebire et al., 1996; Maymon et al., 2002) o bé calcular un únic risc de trisomia 21 per tota la gestació sumant el risc dels dos fetus (Wald et al., 2003b). Per no augmentar els falsos positius, en aquest cas Wald i cols. consideraven que abans de sumar els riscos calia dividir per 2 el risc gestacional associat a l'edat materna, ja que el risc basal

de trisomia 21 que té un fetus procedent d'una gestació gemel·lar és la meitat del que té un fetus procedent d'una gestació única (Cuckle, 1998). La idea de calcular un únic risc per a tota la gestació, a l'hora de decidir sobre un procediment invasiu que s'obté dels 2 fetus pot semblar més coherent des d'un punt de vista teòric, però en la pràctica clínica, el sistema més aplicat en les gestacions dicorials, és el de calcular dos riscos. En general es recomana treure mostra de les dues placentes/sacs amniòtics malgrat que només un dels fetus presenti risc elevat (Sebire et al., 1996; Nicolaidis, 2004a; Chasen 2007).

7. Cribratge bioquímic-ecogràfic de primer trimestre: el Test Combinat

7.1 El Test Combinat en les gestacions úniques

L'any 1994 es va publicar el primer estudi que proposava combinar la TN amb un marcador sèric matern, la proteïna plasmàtica A associada a l'embaràs (PAPP-A) en el primer trimestre de la gestació (Brizot et al., 1994). Diverses combinacions de cribratge bioquímic-ecogràfic van ser avaluades retrospectivament fins a demostrar que amb el denominat "Test Combinat" que combina l'edat materna, un marcador ecogràfic (la TN) i dos marcadors bioquímics (la PAPP-A i la $f\beta$ -hCG), s'obtenia una taxa de detecció de trisomia 21 del 85%, per un 5% de falsos positius (Wald and Hackshaw, 1997; Spencer et al., 1999). Estudis prospectius posteriors van mostrar resultats encara més favorables amb taxes de detecció de trisomia 21 de fins a 90%, també per un 5% de falsos positius (Krantz et al., 2000; Bindra et al., 2002; Malone et al., 2005).

Contràriament al que s'esdevé en el segon trimestre, el cribratge bioquímic de primer trimestre presenta diferències en la seva efectivitat en funció de la setmana gestacional. La PAPP-A presenta una millor capacitat discriminant a les 8-10 setmanes que en setmanes posteriors i la $f\beta$ -hCG presenta un augment de la seva efectivitat a mesura que avança l'edat gestacional, però aquesta variació és menys remarcable. Per aquest motiu, amb el cribratge combinat realitzat en dos temps, la

bioquímica a les 8-10 setmanes i la mesura de la TN a les 11-12 setmanes, s'obtidrien els millors resultats.

Borrell i cols. (2004) en un estudi prospectiu en què s'aplica el Test Combinat en dos temps a 2780 gestacions úniques, la bioquímica materna a una edat gestacional mitjana de 9.4 setmanes i la mesura de la TN de 12.3 setmanes, van obtenir una detecció de trisomia 21 del 88% disminuint els falsos positius fins al 3.3%. En un estudi més ampli, Kagan i cols (2008a) mitjançant modelació matemàtica en 55 376 gestacions úniques, van calcular que realitzant el Test Combinat en una única visita (one-step) a les 11 setmanes es podia obtenir una detecció del 94%, del 90% a les 12 setmanes i del 83% a les 13, per un 5% de falsos positius. La taxa de detecció superior era del 96% i s'obtenia realitzant el cribratge en dos temps, la bioquímica a les 10 setmanes i l'ecografia a les 12. Els autors conclouen que per a obtenir la millor rendibilitat del cribratge i la millor capacitat diagnòstica de l'ecografia en el diagnòstic d'altres malformacions, el més adequat fora aplicar el cribratge en dos temps.

7.2 El Test Combinat en les gestacions gemel·lars

En les gestacions gemel·lars, el Test Combinat ha estat poc validat a diferència del que s'esdevé en gestacions úniques on ha estat demostrat que el cribratge combinat bioquímico-ecogràfic millora la sensibilitat i l'especificitat del cribratge ecogràfic, fins a considerar-se avui en dia el mètode de cribratge d'elecció en el primer trimestre (ACOG Practice Bulletin 2007). Les dades sobre gestacions gemel·lars amb fetus afectes de trisomia 21 i la distribució dels marcadors bioquímics són escasses, i la majoria d'estudis es basen en modelacions matemàtiques. De la mateixa manera que en el segon trimestre, els marcadors bioquímics de primer trimestre (f β -hCG i PAPP-A) procedents del fetus/placenta normal poden emmascarar els valors alterats del fetus/placenta afecte i per tant disminuir la sensibilitat del cribratge.

La contribució de la f β -hCG a les 10-14 setmanes ha estat posada en dubte per Noble i cols. (1997) en un estudi prospectiu que incloïa 4181 gestacions úniques i 148 gestacions gemel·lars. En les gestacions gemel·lars normals, la f β -hCG

presentava uns valors que gairebé eren el doble dels de les gestacions úniques, amb una mediana de 1.94 MoM. De les 12 gestacions gemel·lars amb un o ambdós fetus amb trisomia 21, la f β -hCG es trobava per sobre del percentil 95 només en una. Aquests autors van concloure que la f β -hCG no semblava un marcador útil per a la detecció de trisomia 21 en el primer trimestre.

Spencer (2000) va comparar la distribució de la f β -hCG i de la PAPP-A a les 10³-13⁶ setmanes entre 159 gestacions gemel·lars i 3466 gestacions úniques, totes euploides. Va trobar que la mediana de la f β -hCG era 1.9 vegades superior en les gestacions gemel·lars i la mediana de la PAPP-A 2.1. A partir de la distribució d'aquests marcadors, va realitzar una modelació matemàtica per tal de fer una predicció de l'eficàcia del cribratge bioquímic de primer trimestre associat a l'edat materna, i del cribratge combinat bioquímic-ecogràfic en les gestacions gemel·lars. Per un 5% de falsos positius, els marcadors sèrics podrien detectar entre 51 i 55% dels casos de trisomia 21, el que no suposava cap millora respecte al cribratge bioquímic de segon trimestre, però amb el Test Combinat es podria assolir una detecció del 80%, és a dir 5 punts per sobre del que s'obté amb la mesura de la TN aïllada, tant en les gestacions amb aneuploidia concordant (en general monozigòtiques) com discordant (dizigòtiques) (Taula 4).

Combinació de marcadors	Discordant per trisomia 21 Índex de detecció (%)	Concordant per trisomia 21 Índex de detecció (%)
TN + edat materna	75.2	75.2
fβ-hCG, PAPP-A + edat materna	51.5	55.4
TN, fβ-hCG, PAPP-A + edat materna	79.7	81.3

Taula 4: Modelització de detecció en gestacions gemel·lars utilitzant diverses combinacions de marcadors i després de la correcció dels paràmetres bioquímics per la presència de bessons. Índex de detecció calculat per 5% de falsos positius (Font: Spencer. 2000)

Posteriorment, aquest mateix autor (Spencer and Nicolaides, 2003) va publicar l'únic estudi d'aplicació clínica del Test Combinat en gestacions gemel·lars aparegut a la literatura fins a la publicació del primer article inclòs en aquesta tesi. En un període de 3 anys van aplicar el cribratge combinat a 224 gestacions gemel·lars

amb obtenció de la bioquímica i de la mesura de les TN en el mateix dia, entre les 10³ i les 13⁶ setmanes durant el primer any, i entre les 11⁰ i les 13⁶ durant el segon i el tercer. Van calcular un risc específic de trisomia 21 per cada fetus aplicant el factor de correcció per la presència de bessons (Spencer 2000) i pel pes matern. Utilitzant com a cut-off un risc superior a 1/300 en algun dels dos fetus, van obtenir una detecció de trisomia 21 del 75% (3/4), per una taxa de falsos positius del 9.0% de les gestacions i 6.9% dels fetus. Els autors van concloure que el cribratge combinat de primer trimestre era clínicament aplicable en bessons, amb uns resultats concordants amb la modelació teòrica realitzada prèviament. En la Taula 5 es reporta la distribució dels marcadors bioquímics i de la mesura de la TN en les 4 gestacions afectes, totes amb fetus discordants per trisomia 21.

	Edat	EG	Corio	TN 1 MoM	TN 2 MoM	Risc TN 1	Risc TN 2	fβ- hCG MoM	PAPP -A MoM	Risc Bioq	Risc Comb 1	Risc Comb 2	Result 1	Result 2
1	35	11.5	DC DA	1.43	1.86	212	46	1.86	0.64	120	122	27	N	T21
2	39	12.2	DC DA	1.03	2.58	503	3	0.80	0.46	118	758	4	N	T21
3	33	12.5	DC DA	0.69	0.80	2988	2988	1.57	0.55	214	1776	1776	N	T21
4	35	12.1	DC DA	1.06	1.98	1162	32	0.97	1.06	1593	2230	225	N	T21

TAULA 5: Casos de bessons discordants per T21 (Font: Spencer & Nicolaides, 2003)

EG: edat gestacional; corio: corionicitat; DC-DA: dicorial-diamniòtic; risc bioq: risc bioquímic; risc comb: risc combinat

Wald i cols (2003) consideren que en l'aplicació del Test Combinat en bessons s'ha de calcular un únic risc pel conjunt de la gestació, en comptes d'un risc específic per cada fetus, la mateixa recomanació que realitzaven amb el cribratge per mesura de la TN. En el cas del Test Combinat aquest mètode està més fonamentat ja que els marcadors sèrics materns és determinen en referència a tota la gestació. Els autors van descriure un mètode per combinar la TN i els marcadors sèrics en funció de la corionicitat i per tal d'obtenir un "pseudo-risc" gestacional. En les gestacions monocorials, calculaven primer el risc amb la mitjana de les dues TN i posteriorment incorporaven els valors de la PAPP-A i la fβ-hCG dividint els valors totals obtinguts pels factors de correcció establerts per Spencer (2000). En les

gestacions dicorials, calculaven primer un risc específic per cada fetus en funció de la seva TN i el dividien per dos (considerant que un fetus procedent d'una gestació dizigòtica té la meitat de risc de trisomia 21 que un fetus procedent d'una gestació única) sumaven els dos riscos fetals i incorporaven la bioquímica materna aplicant el mateix factor de correcció que en les gestacions monocorials. Posteriorment van realitzar una simulació matemàtica de l'efectivitat del Test Combinat i de l'efectivitat de la mesura de la TN aplicant aquesta fórmula de càlcul, per un 5% de falsos positius. En les gestacions monocorials van obtenir una detecció similar a la de Spencer (2000), 73% amb la TN associada a l'edat materna i 84% amb el Test Combinat, però en les gestacions dicorials van obtenir una detecció gairebé 15 punts inferior (Taula 6)

Fetus	TN (%)	Test Combinat (%)
Monocoriònics	73	84
Dicoriònics	68	70
Tots els bessons	69	72
Fetus únics	73	85

Taula 6: Efectivitat estimada del cribratge de trisomia 21 en les gestacions gemel·lars en funció del cribratge aplicat i de la corionicitat per un 5% de falsos positius (els 2 tests inclouen l'edat materna). (Taula adaptada de Wald i cols, 2003)

Tant els estudis de Spencer (2000, 2003) com el de Wald (2003) posen de manifest que la combinació de la bioquímica materna podria incrementar l'efectivitat del cribratge basat en la mesura aïllada de la TN, però que calien estudis prospectius més amplis abans de considerar-lo com el cribratge d'elecció, també en les gestacions gemel·lars (Cleary-Goldman and Berkowitz, 2005).

7.3 Distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre en les gestacions gemel·lars

En les gestacions gemel·lars euploides, la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre (β -hCG i PAPP-A) no sempre és pròxima als 2.0 MoMs esperables i s'han trobat variacions en les diferents sèries de la literatura, tal com mostra la

Taula 7. No obstant, en algun dels estudis els valors estan calculats a partir de pocs casos. Niemimaa i cols. (2002) en una sèrie de 67 gestacions gemel·lars van trobar que els valors de $f\beta$ -hCG eren menors del que era esperable (1.85 MoM) i en canvi la PAPP-A es trobava incrementada (2.36 MoM) i Mashiach i cols (2004), amb 93 gestacions van trobar que els dos marcadors sèrics es trobaven significativament incrementats sobre el que era esperable ($f\beta$ -hCG 2.18 MoM i PAPP-A 2.38 MoM). Mashiach i cols. conclouien que s'hauria de fer servir els valors propis com a factor de correcció en el càlcul de risc en les gestacions gemel·lars. Spencer (2005) va fer una metaanàlisi de totes les sèries publicades de marcadors de primer trimestre en bessons, amb un total de 825 gestacions amb valors de $f\beta$ -hCG i 707 gestacions amb PAPP-A. La mediana global de la $f\beta$ -hCG era 2.035 MoMs i la de la PAPP-A 1.826 MoMs (Taula 7)

Estudi	Gestacions gemel·lars (n)	Mediana MoM $f\beta$ -hCG	Mediana MoM PAPP-A
Noble et al. (1997)	148	1.94	
Spencer (2000)	159	2.10	1.86
Niemimaa i cols (2002)	67	1.85	2.36
Orlandi i cols. (2002)	150	2.02	1.52
Spencer i cols (2003)	206	2.15	1.93
Bersinger i cols (2003)	68		1.87
Mashiach i cols (2004)	93	2.18	2.38
Spencer (2005) Resum sèries	825/707	2.04 (825)	1.83 (707)
Wojdemann i cols. (2006)	128	2.06	2.14

Taula 7: Valors de la mediana de la $f\beta$ -hCG i de la PAPP-A reportats a la literatura en gestacions gemel·lars amb fetus euploides (Font: Spencer, 2005)

7.4 Distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre en funció de la corionicitat

Muller i cols (2003) analitzant la distribució dels marcadors bioquímics de segon trimestre van demostrar en una sèrie de 1561 gestacions dicorials i 244 monocorials que la hCG es trobava significativament incrementada en les gestacions monocorials (2.16 MoM vs 2.07 MoM). Els autors van concloure que per obtenir la màxima eficàcia del cribratge, s'hauria d'aplicar un factor de correcció específic de la corionicitat. En canvi, en el primer trimestre, fins a la realització dels treballs que constitueixen aquesta tesi, cap autor havia trobat diferències significatives de la f β -hCG i de la PAPP-A en funció de la corionicitat. Spencer (2001) en una sèrie de 180 gestacions gemel·lars, 135 dicorials i 45 monocorials, va trobar que la mediana de la f β -hCG no mostrava diferències en funció de la corionicitat (1.01 vs 1.00 MoM) mentre que la mediana de la PAPP-A era menor en les gestacions monocorials (0.89 vs 1.01), però aquesta diferència no era estadísticament significativa. Niemimaa i cols. (2002) i Wöjdemann i cols. (2006) amb sèries de 54 i 150 gestacions dicorials i 13 i 31 monocorials respectivament, tampoc van trobar diferències en la distribució dels marcadors sèrics en funció de la corionicitat.

7.5 Distribució dels marcadors bioquímics en funció del tipus de reproducció, espontània o medicament assistida (RMA)

Per obtenir una sensibilitat i especificitat màximes en l'aplicació del cribratge bioquímic, els valors de cada un dels marcadors han d'estar ajustats mitjançant factors de correcció que compensin els efectes que determinades circumstàncies com ara el pes matern, determinats grups racials o ètnics, el tabaquisme o la diabetis insulíndependent tenen sobre la concentració d'aquests marcadors (Kagan et al., 2008a; Protocol de Seguiment de l'Embaràs a Catalunya, 2008). Pel que fa a la RMA, l'aplicació d'un factor de correcció és més controvertida, ja que existeixen diferències en l'efecte de la distribució dels marcadors en funció del mètode de reproducció assistida utilitzat.

Diversos estudis en gestacions úniques de segon trimestre van trobar que l'hCG intacta i també però en menor mesura la f β -hCG, es trobaven incrementades de forma significativa en les gestants procedents de RMA (Wald et al., 1999; Frishman et al., 1997; Rätty et al., 2002) tot i que això no ha estat confirmat per algun altre autor (Muller et al., 2003). Alguns estudis havien posat de manifest també un increment de la f β -hCG en el primer trimestre en les gestacions procedents de RMA (Niemi et al., 2001; Bersinger et al., 2004) però aquest increment no ha estat confirmat en estudis més amplis (Orlandi et al., 2002; Gjerris et al., 2009; Amor et al., 2009). No obstant algun estudi ha suggerit que les corbes de distribució de la f β -hCG en el primer trimestre són diferents en les gestants procedents de TRA, i que a diferència de les gestacions espontànies, presenten una correlació positiva entre l'edat gestacional i els valors de f β -hCG (Gjerris et al., 2009). Una sèrie de 12 gestacions gemel·lars procedents de FIV també va confirmar aquesta correlació (Orlandi et al., 2002).

En relació a la PAPP-A, la majoria d'estudis confirmen una disminució del seu valor en les gestacions procedents de RMA. Liao i cols. (2001) van comparar el valor de la PAPP-A en 411 gestacions úniques procedents d'estimulació ovàrica, que incloïen 220 procedents de FIV convencional i FIV-ICSI, amb 1233 gestacions espontànies i van trobar una disminució significativa dels valors de la PAPP-A en les gestacions procedents de FIV. Posteriorment altres estudis han confirmat aquests resultats (Kagan et al., 2008; Gjerris et al., 2009; Amor et al., 2009). Amor i cols, (2009) en una sèrie molt àmplia van comparar els marcadors bioquímics de primer trimestre entre 50 253 gestacions espontànies i 1739 procedents de TRA incloent les diferents tècniques de tractament. Aquests autors van trobar uns valors significativament més baixos de PAPP-A en les gestants de TRA (0.83 MoM) respecte al grup control (1.00 MoM), fins i tot després d'excloure les gestacions que havien presentat complicacions perinatals. Van observar una associació a uns valors més baixos de PAPP-A amb la utilització d'embrions frescos (comparat amb els embrions congelats), i de cicles artificials per la transferència dels embrions congelats (comparat a cicles naturals). El tractament hormonal que acompanya a la majoria de cicles de RMA s'associava també significativament a valors més baixos de PAPP-A.

Liao i cols ja van suggerir a l'any 2001 que en les gestacions procedents de FIV, aquesta disminució de la PAPP-A comportava un increment d'1.2% de falsos positius en l'aplicació del Test Combinat. Estudis posteriors com el de Amor i cols. han confirmat la importància d'ajustar aquest marcador a l'hora de fer el càlcul de risc de trisomia 21 en totes les gestacions procedents de RMA per evitar procediments invasius innecessaris (Kagan et al., 2008; Amor et al., 2009).

En les gestacions gemel·lars hi ha molt poques dades publicades sobre l'efecte de la RMA sobre els marcadors bioquímics. En el segon trimestre, Rätty i cols (2000) van reportar un increment del 20% de la β -hCG en 29 gestacions gemel·lars procedents de FIV comparat amb 30 gestacions espontànies, però la diferència no arribava a la significança estadística. En una altra sèrie de 37 bessons procedents de RMA, els nivells d'Inhibina-A tampoc es mostraven significativament incrementats (Maymon et al., 2006).

Només hi ha un estudi que compari els marcadors de primer trimestre en gestacions gemel·lars espontànies i gestacions gemel·lars provinents de RMA. Orlandi i cols (2002) van examinar l'efecte dels tractament de FIV sobre els marcadors sèrics en 30 gestacions gemel·lars (16 FIV i 14 FIV-ICSI) en comparació amb 150 gestacions gemel·lars espontànies, però no van trobar diferències en els valors de la β -hCG ni de la PAPP-A. Degut a que el nombre de gestacions gemel·lars procedents de RMA és important, caldrien més estudis per decidir si s'ha d'ajustar el valor dels marcadors bioquímics, per evitar un excés de falsos positius en el càlcul de risc de trisomia 21.

7.6 Gruix de la TN: variacions en funció de la corionicitat i de les TRA

La majoria d'estudis han trobat un increment de la TN en els fetus procedents de les gestacions monocorials. Sebire i cols. (1996) amb la sèrie més ampla, que inclou 190 gestacions monocorials i 688 dicorials amb cariotip normal, van trobar una prevalença significativament augmentada de TN superior al percentil 95 en els fetus procedents d'una gestació monocorial (8.4% vs. 5.4%). Un estudi més recent sobre 34 gestacions monocorials i 181 dicorials euploides, també va constatar aquesta associació (7.4% vs. 1.7%) (Sepulveda et al., 2009). En canvi, altres

sèries no ho han confirmat: Maymon i cols (2001) van trobar que no hi havia més casos de fetus amb una TN superior al percentil 95 en comparar 32 gestacions monocorials amb 132 dicorials i Linskens i cols (2009) amb 163 gestacions dicorials i 37 monocorials van trobar que la mediana de la TN fetal era similar en els dos grups (1.3 mm vs. 1.3 mm).

Respecte a les diferències entre gestacions espontànies i gestacions procedents de RMA, la majoria d'estudis en gestacions úniques no han trobat diferències en la mesura de la TN en funció de les TRA emprades (Liao et al., 2001; Wöjdemann et al., 2001; Orlandi et al., 2002). Algun estudi no obstant, ha trobat un increment de la TN en funció del tipus de tècnica de reproducció (Hui et al., 2005) i dues sèries molt àmplies van trobar resultats contraposats. Gjerris i cols. (2009) van evidenciar que la mesura de la TN era inferior en el grup de fetus procedents de qualsevol tipus de RMA mentre que Amor i cols (2009) van trobar un lleuger increment de la TN fetal en aquest grup (0.91 MoM vs. 0.90 MoM) i que els autors van atribuir a factors relacionats amb els operadors que realitzaven la ecografia.

En gestacions múltiples, Orlandi i cols (2002) en una sèrie de 30 gestacions procedents de TRA (16 obtingudes per FIV i 14 per FIV-ICSI) i 150 gestacions espontànies van observar una reducció significativa (12%) de la TN en les gestacions procedents de FIV respecte al grup control. Maymon i cols (2005) en canvi, no van trobar diferències entre 70 gestacions gemel·lars espontànies i 178 procedents de TRA (50 induccions d'ovulació i 128 FIV). Hui i cols (2006) tampoc van obtenir diferències entre els fetus procedents de 19 gestacions gemel·lars espontànies, 27 gestacions gemel·lars FIV i 3319 fetus únics (TN d'1.02 MoM, 1.07 MoM i 1.0 MoM respectivament)

8. Cribratge de trisomia 18 en les gestacions gemel·lars

Un benefici suplementari de l'aplicació del cribratge bioquímico-ecogràfic del primer trimestre en les gestacions úniques, és l'elevada efectivitat per a la detecció d'altres aneuploïdies, sobretot la trisomia 18 o la trisomia 13. Aquestes

aneuploïdies són però, ecogràficament més identificables ja que a més d'una TN augmentada presenten en general malformacions diverses. Un estudi ampli recent, mostrava una taxa de detecció del 82% dels casos de trisomia 18 per un 3% de falsos positius amb la utilització de l'algoritme de trisomia 21 que augmentava fins al 97% utilitzant un algoritme específic, que tenia en compte els valors extremadament baixos de f β -hCG característics de la trisomia 18 (Kagan et al., 2008b).

No hi sèries publicades a la literatura sobre gestacions gemel·lars amb fetus afectes de trisomia 18, ja que només hi ha casos puntuals o sèries de 3 casos com a màxim (Bersinger et al., 2003). Tampoc hi ha dades sobre la distribució dels marcadors bioquímics, ni sobre l'efectivitat del cribratge bioquímic de segon trimestre o del Test Combinat. Tenint en compte que la TN es troba per sobre del percentil 95 en 75% dels fetus amb trisomia 18 (Nicolaidis, 1999), s'ha de considerar que aquesta dada és extrapolable a les gestacions gemel·lars i multifetals i per tant el cribratge ecogràfic de primer trimestre seria el mètode d'elecció per a la detecció de la trisomia 18.

9. Valor dels altres marcadors ecogràfics d'aneuploïdia de primer trimestre en la gestació múltiple: l'os nasal i el ductus venós

9.1. Valoració de l'os nasal en les gestacions úniques

Estudis ecogràfics realitzats entre les 15 i les 24 setmanes van demostrar que aproximadament 65% de fetus amb trisomia 21 presentaven un os nasal hipoplàsic o absent (Bromley et al., 2002; Cicero et al., 2003). Amb una tècnica ecogràfica adequada que requereix un entrenament específic per obtenir un tall sagital exacte del perfil fetal, l'os nasal també pot ser visualitzat en l'ecografia de les 11-13⁶ setmanes (Foto 4).

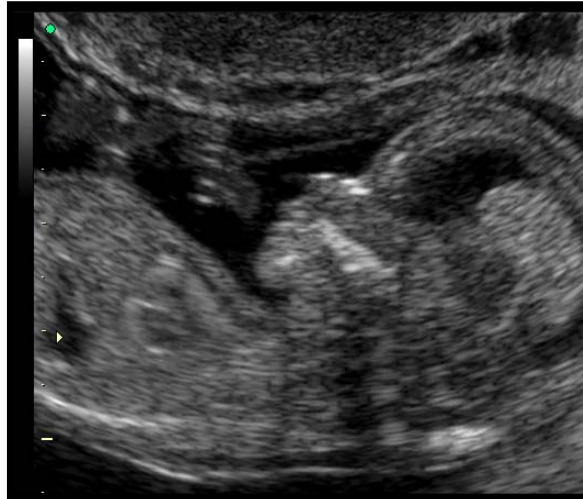


Foto 4: Os nasal a les 11-13^e setmanes. Font: ICGON

En un primer estudi sobre 701 fetus, inclosos 59 amb síndrome de Down, Cicero i cols (2001) van obtenir un pla correcte per a la visualització de l'os nasal en tots els casos i el van trobar absent en 73% dels fetus amb síndrome de Down i només en 0.5% dels fetus euploides. Els autors van pensar que la inclusió de la mesura de l'os nasal en l'ecografia de primer trimestre podria incrementar la detecció de trisomia 21 de 75% a 85%, tot disminuint els falsos positius de 5% a 1%.

En un estudi posterior del mateix grup sobre 5918 gestacions que incloïa 120 gestacions múltiples (112 gemel·lars, 7 triples i 1 quàdruple) van obtenir una correcte valoració de l'os nasal en el 98.9% dels casos, i van trobar un os nasal absent en 2.5% dels fetus euploides, 68.8% dels fetus amb trisomia 21 i 32% dels fetus amb altres aneuploïdies. En comparar gestacions múltiples i úniques no van trobar diferències significatives (os nasal absent en 2.4% de les gestacions euploides úniques vs. 3% de les múltiples). Els autors van observar també que l'absència d'os nasal fetal era significativament més freqüent en les gestants d'ètnia afro-caribenya que en les caucàsiques i que l'absència d'os nasal presentava una correlació positiva amb la mesura de la TN i una correlació negativa amb la mesura de la LCC. Els autors van concloure que per un 5% de falsos positius l'os nasal podia incrementar la detecció de la TN d'un 75% a un 93% i la del Test Combinat d'un 90% a un 97% (Cicero et al., 2004).

Aquests mateixos autors van combinar dades a partir de 8 estudis de primer trimestre en l'àrea d'influència de la Fetal Medicine Foundation, que incloïen menys

gestants d'ètnia afro-caribenya i amb un total de 13 733 fetus estudiats, van concloure que el perfil fetal havia pogut ésser examinat en el 97.2% dels casos i que l'os nasal s'havia trobat absent en 1.3% dels fetus amb cariotip normal i en 67% dels fetus amb trisomia 21 (Cicero et al., 2004).

Posteriorment van examinar una segona estratègia que incorporava la valoració de l'os nasal únicament en aquelles gestants que havien obtingut un risc intermedi amb el cribratge combinat (risc entre 1/101 i 1/1000). Fent la valoració de l'os nasal aproximadament en un 10% de les gestants, podien obtenir una detecció de trisomia 21 del 90%, amb una disminució dels falsos positius del 5% al 2.5%. Finalment, el mateix grup, en un estudi molt recent i molt ampli sobre 20 000 fetus van concloure que la incorporació de la valoració de l'os nasal en l'ecografia de primer trimestre tant aplicat de forma universal, com de forma contingent únicament en el 15% de gestants amb un resultat de risc intermedi (entre 1/51 i 1/1000), podia reduir els falsos positius a un 2.4%, sense modificar la detecció de trisomia 21 obtinguda amb l'aplicació del Test Combinat (93%) (Cicero et al., 2006; Kagan et al., 2009).

No obstant, la utilitat de l'os nasal no ha estat acceptada unànimement ja que l'estudi FASTER als Estats Units sobre 6324 fetus va mostrar que l'estudi de l'os nasal només era factible en el 76% dels casos i no van trobar cap cas de trisomia 21 amb absència d'os nasal (Malone et al., 2004). Altres autors, també han observat que la valoració de l'os nasal en l'ecografia de les 11-13⁶ setmanes no és gaire reproduïble en gestacions de baix risc, amb una variació inter i intraobservador del 20% i van concloure que la seva implementació en el cribratge gestacional era poc factible (Senat et al., 2003). Una recent metanàlisi sobre el valor de l'os nasal en la detecció de trisomia 21 que recull 15 articles i 67 448 fetus, alguns amb resultats favorable i altres no tant, conclou que la taxa de detecció és només del 48 % (Borrell et al., 2009a).

9.2 Valoració de l'os nasal en les gestacions múltiples

Hi ha pocs estudis que hagin valorat específicament l'aplicació de l'os nasal en el cribratge d'aneuploïdia de primer trimestre en les gestacions múltiples. L'estudi de

Cicero i cols del 2004 esmentat anteriorment, no va trobar diferències en el percentatge de fetus euploides amb os nasal absent, però no referia cap resultat en bessons afectes de trisomia 21. Posteriorment Cleary-Goldman i cols (2008) en un estudi retrospectiu sobre 2094 gestacions gemel·lars de primer trimestre van obtenir menys fetus amb ós nasal absent del que era esperable (0.4%). Fent una modelació estadística, van calcular que l'implementació de l'ós nasal permetria incrementar la sensibilitat del Test Combinat d'un 79% a un 89%, per un 5% de falsos positius.

Sepulveda i cols (2009) han publicat l'únic estudi d'aplicació clínica de l'ós nasal en gestacions múltiples. Sobre 215 gestacions (206 gemel·lars, 8 triples i 1 quàdruple) van obtenir una correcta valoració de l'ós en el 95.7% dels fetus i la seva absència en 4 fetus, 3 dels quals presentaven una anomalia cromosòmica (2 fetus amb trisomia 21 i un amb trisomia 18), però 3 fetus aneuploides mostraven un os nasal normal (1 fetus amb trisomia 21 i dos bessons monocorials, un amb una síndrome de Turner en forma pura i l'altre en mosaic (45,X/46,XX)). Així, l'absència d'ós nasal només havia detectat el 50% dels casos d'aneuploidia, però considerant únicament la trisomia 21, n'havia detectat el 67%. Els autors conclouien que l'utilització de l'ós nasal pel cribratge d'aneuploidia en les gestacions múltiples presenta una menor sensibilitat que en les gestacions úniques i que l'obtenció del tall ecogràfic adequat de la cara fetal és més difícil.

9.3 Ductus venós i anomalies congènites en les gestacions úniques

El ductus venós (DV) és un petit vas fetal que projecta sang oxigenada des de la vena umbilical fins al cor i que degut al seu elevat flux es pot identificar ecogràficament mitjançant el Doppler color a partir de les 9-10 setmanes de gestació amb el fetus situat en posició sagital. Aplicant el Doppler pulsat s'obtenen les ones de velocitat del flux que mostren un patró bifàsic amb pics de velocitat en la sístole ventricular i en l'inici de la diàstole, i la velocitat més baixa es registra en el moment de la contracció atrial (ona A).Foto 5

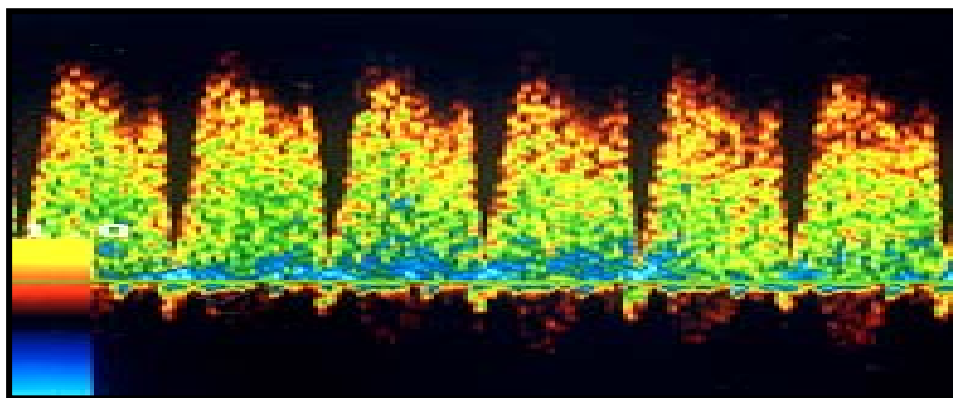


Foto 5: Doppler del ductus venós en un fetus de 11-13^è. Patró bifàsic i ona A Font: ICGON

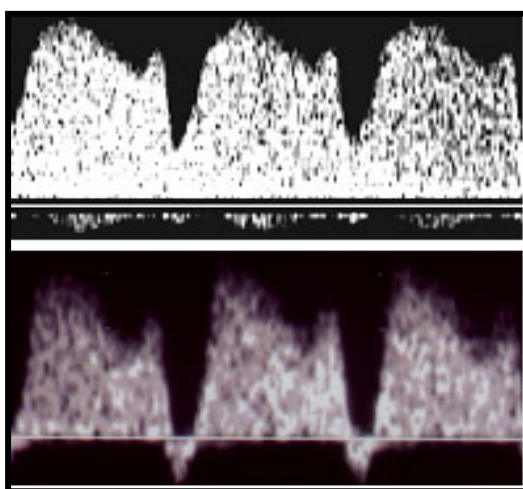


Foto 6: Ductus venós amb ona A present i reversa Font: ICGON

Velocitats reverses durant la contracció atrial van ser descrites per primera vegada en la segona meitat de la gestació en dos fetus amb cardiopatia (Kiserud et al., 1991). Estudis posteriors han demostrat que un DV revers és un bon marcador de disfunció cardíaca i també d'acidèmia fetal en els casos de restricció de creixement intrauterí. En el primer trimestre, un flux revers en l'ona A (Foto 6) és també un signe de compromís hemodinàmic fetal i de disfunció cardíaca i s'ha vist associat amb cardiopaties congènites, aneuploïdia i resultats obstètrics desfavorables, però també es troba present aproximadament en 3-4% dels fetus normals (Matias et al., 1998; Bilardo et al., 2001; Borrell et al., 2003, 2009a; Maiz et al., 2008a). Alguns autors, en comptes de fer una valoració qualitativa d'un DV patològic, valorant únicament la presència d'una ona A absent o reversa, realitzen una valoració quantitativa mitjançant l'índex de pulsatilitat venosa (superior al percentil 95 per

l'edat gestacional), i obtenen una millor detecció de trisomia 21 (Borrell et al; 1998, 2009b).

Diversos estudis en població seleccionada per una TN augmentada han trobat una associació significativa entre una velocitat absent-reversa en l'ona A del ductus venós i una TN augmentada, probablement degut a una coincidència amb defectes cardíacs associats o amb una disfunció cardíaca transitòria (Bilardo et al., 2001; Maiz et al., 2008a; Maiz et al., 2009a). També s'ha vist que el risc d'un resultat perinatal advers s'incrementa significativament quan un flux revers en la contracció atrial s'associa a una TN superior al percentil 95 (7% vs. 70%) (Maiz et al., 2008a). Els estudis realitzats en població no seleccionada han demostrat, no obstant, que la TN i l'índex de pulsatilitat del DV son paràmetres independents en els fetus normals (Borrell et al., 1998, 2005).

En un estudi sobre més de 10 000 gestacions úniques, es va valorar la contribució independent que aportava la presència d'un flux anòmal en el DV (ona A reversa) a les 11-13⁶ setmanes per a la predicció d'anomalies majors o de mort fetal. Els autors van trobar que una ona A reversa era significativament més prevalent en les gestacions que finalitzaven en avortament o mort fetal (10.8%), en les que presentaven una anomalia cromosòmica (62.1%) o una cardiopatia (25%) que en les que van tenir un resultat favorable (3.7%), però en canvi no era més freqüent en els fetus que presentaven altres tipus de malformacions. Els autors van concloure que una ona A reversa s'associa a un risc incrementat d'anomalies cromosòmiques, malformacions cardíques i mort fetal, però en 80% dels casos comporta un resultat favorable de la gestació (Maiz et al., 2008a).

Un altre estudi molt recent va valorar la utilitat de l'índex de pulsatilitat venosa del DV (IPDV), pel cribratge de trisomia 21 com a marcador aïllat a les 10-13 setmanes de gestació, i com a marcador associat al Test Combinat. L'estudi del DV va ser realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona en més de 7000 gestacions úniques euploides i 66 casos de trisomia 21. Els resultats obtinguts amb el DV van ser combinats mitjançant una modelació matemàtica, amb els resultats obtinguts amb el Test Combinat en l'estudi SURUSS (Serum Urine and Ultrasound Screening Study) (Wald et al., 2003c). L'IPDV com a marcador aïllat sense considerar tampoc l'edat materna, va detectar 62% dels casos de trisomia 21 per un 5% de

falsos positius. D'altra banda, calculat per una detecció del 90%, l'aplicació de l'IPDV va reduir els falsos positius del Test Combinat del 8.5% al 4.6%. Els autors van concloure que l'IPDV afegit al Test Combinat millora de forma substancial l'eficàcia del cribratge antenatal de trisomia 21. (Borrell et al., 2009b).

Un altre estudi del grup del Professor Nicolaidis va analitzar la utilitat del DV comparant dues estratègies: la valoració del DV en totes les gestacions conjuntament amb el Test Combinat i la valoració del DV només com a segona estratègia, en aquelles gestacions amb un resultat de risc intermedi amb el Test Combinat (entre 1/51 i 1/1000). Sobre més de 19 500 gestacions úniques euploides, 122 amb trisomia 21, 36 amb trisomia 18, 20 amb trisomia 13 i 8 amb síndrome de Turner analitzades, van trobar que l'ona A era reversa en 3.2% dels fetus euploides i en 66.4%, 58.3%, 55% i 75% dels fetus amb trisomia 21, 18, 13 i síndrome de Turner respectivament. Fent una modelació estadística, van calcular que la valoració del DV en totes les gestacions, incrementaria la detecció de trisomia 21 del Test Combinat del 91% al 96%, per un 3% de falsos positius. Utilitzant el DV de forma contingent, només en el 15% de gestants amb un risc intermedi, també s'obtidria un 96% de detecció, per un 2.6% de falsos positius Coincidint amb els resultats de Borrell i cols (2009b), la valoració del DV millorava l'eficiència del cribratge d'aneuploïdia. D'altra banda, la utilització del DV de forma contingent faria més pràctica la seva aplicació, però podria disminuir la identificació dels fetus amb baix risc d'aneuploïdia però amb risc de defectes cardíacs i de mort fetal (Maiz et al., 2009a).

L'examen Doppler del DV requereix una certa habilitat per part dels ecografistes i un estudi va mostrar que es requeria una mitjana de 80 procediments per aconseguir el nivell de capacitació adequat (Maiz et al., 2008b). Borrell i cols (2007) van valorar la variabilitat interobservador de la mesura del DV i van trobar una bona fiabilitat en la valoració de l'índex de pulsatilitat venosa (0.74), però la fiabilitat en la valoració de l'ona A era només moderada (0.50)

9.4 Ductus venós anòmal en les gestacions múltiples de primer trimestre

El DV ha estat estudiat en profunditat en el segon i tercer trimestre en les gestacions monocorials complicades amb una STFF. Una ona A reversa en el DV del fetus receptor indica una greu afectació hemodinàmica i una miocardiopatia important produïda per sobrecàrrega cardíaca i s'utilitza com a marcador de severitat del procés (estadi III de Quintero) (Quintero et al., 1999).

Prenent en consideració que una TN augmentada s'havia relacionat amb un risc incrementat de STFF en les gestacions monocorials de primer trimestre, a causa d'una possible disfunció cardíaca fetal, Matias i cols (2000) van ser els primers a analitzar la relació entre el DV i l'aparició d'una STFF posterior. En 11 gestacions monocorials de 11-14 setmanes, una STFF va aparèixer únicament en les dues gestacions on els fetus presentaven concomitantment una discrepància en la mesura de la TN amb un flux anòmal en el DV del fetus amb la TN augmentada. No es va desenvolupar una STFF sense coincidència d'aquests dos marcadors de primer trimestre. Posteriorment en un estudi molt recent, aquests mateixos autors van valorar 99 gestacions monocorials de primer trimestre i van trobar que un DV anòmal s'associava a un risc relatiu de STFF posterior de 11.86, i quan coincidia també amb una TN discordant (>0.6 mm), el risc relatiu s'incrementava fins a 21 (Matias et al., 2010).

Un estudi de la Fetal Medicine Foundation (Maiz i cols., 2009b) ha analitzat la contribució del DV en la predicció de resultats perinatals adversos, tant en les gestacions monocorials com dicorials. En 695 gestacions estudiades (516 dicorials i 179 monocorials), van analitzar el valor d'una ona A absent en la predicció de les diverses complicacions. En primer lloc, un DV revers en al menys un dels fetus era significativament més freqüent en les gestacions monocorials que en les dicorials (18.4% vs. 8.3%) i en les gestacions monocorials s'associava a un pitjor resultat perinatal (58% vs. 23%). En segon lloc, era més freqüent en les gestacions complicades amb un avortament (28.6%) o amb una anomalia cromosòmica (70%), que en les gestacions que van acabar amb dos nadons sans (7.7%). Finalment, un DV revers era també significativament més freqüent en les gestacions monocorials que van desenvolupar una STFF que en les que van acabar

amb dos nadons sans (38.5% vs. 10.9%). En fer un anàlisi de regressió univariable per veure quins factors contribuïen en l'aparició d'una ona A reversa, van trobar que a més de la corionicitat (OR 1.93) influïen també la discordància de la LCC (OR 1.1), la discordància de la TN (OR 1.03), l'aneuploidia fetal (OR 11.72) i la STFF (OR 3.67). L'anàlisi de regressió logística va demostrar que la presència d'un DV revers era l'únic factor que influïa en l'aparició de STFF, i a diferència de Matias i cols (2000)., van trobar que la TN discordant no hi tenia una contribució important. Els autors van concloure que tal com s'esdevé en les gestacions úniques, una ona A reversa a les 11-13⁶ setmanes s'associa amb un risc incrementat d'aneuploidies i pèrdua gestacional, i en les gestacions monocorials també de STFF.

Finalment hi ha un estudi, que per establir els valors de referència en les gestacions múltiples, va comparar diversos paràmetres de les ones de flux del DV a les 10-14 setmanes en 119 gestacions multicorials, 14 monocorials i 607 gestacions úniques, totes amb un resultat normal. Van valorar l'índex de pulsatilitat venosa i els pics de velocitat de la sístole ventricular, de la diàstole i de la contracció atrial (ona A) i van calcular les medianes per cada setmana gestacional. No van trobar diferències significatives entre gestacions gemel·lars i úniques en cap dels paràmetres analitzats i van trobar que hi havia una ona A absent o reversa en 2.9% dels fetus normals procedents de les gestacions úniques i de les multicorials (Germer et al., 2002).

10. Defectes estructurals en les gestacions múltiples. Diagnòstic en el primer trimestre

En les gestacions úniques, la prevalença estimada de malformacions estructurals al naixement és de 1.3% (Wald et al., 2000). En les gestacions múltiples les anomalies estructurals són més freqüents i un estudi multicèntric recent en països escandinaus va establir en un 2.6% les anomalies estructurals severes (Sperling et al., 2007). En les gestacions dizigòtiques, hi ha un increment global de les malformacions bàsicament degut al risc inherent de cada fetus i el risc gestacional

s'ha de multiplicar per dos, però també hi ha certes anomalies esquelètiques més freqüents, atribuïbles a factors posicionals intraúter (Petrikovsky, 1999).

En canvi, en les gestacions monozigòtiques, el risc de malformacions és de 1.5 a 2.5 vegades superior per cada un dels fetus (Myriantopoulos, 1978; Corney et al., 1983; Chen et al., 1992; Sperling et al., 2007) (Taula 8). Això és degut a anomalies específiques de la monozigositat com les divisions asimètriques (bessons siamesos) o els factors hemodinàmics propis de les placentes monocorials (seqüència TRAP), però també és degut a un risc incrementat de qualsevol tipus de defecte, sobretot cardíacs i de la línia mitjana (defectes de tub neural, llavi fes, holoprosencefàlia, defectes de paret abdominal). L'aparició d'aquests defectes podria estar relacionada amb els mateixos factors responsables de la divisió zigòtica i a una alteració en la blastogènesi (Schinzel et al., 1979; Petrikovsky, 1999).

Les malformacions són discordants en 90% de les gestacions dizigòtiques i en 80% de les monozigòtiques. En el primer cas les diferències són atribuïbles sobretot a factors genètics, mentre que en les gestacions monozigòtiques les diferències semblen ser degudes al propi procés de divisió, a efectes hemodinàmics o ambientals intrauterins diferents per cada bessó o a variacions de l'expressió gènica (mutacions post-zigòtiques) (Nicolaidis, 1999; Gringas and Chen, 2001).

Referència	Descripció	Nombre casos	Incidència malf majors	RR	95% IC
Chen et al., 1992	4 hospitals (Taipei.1985-1989)	482MZ/252DZ	MZ : 26/964 (2.7%) DZ : 5/504 (1%)	2.7	1.1-7.0
Myriantopoulos, 1978	NCCP Estudi cohort (12 institucions USA). Seguiment fins 7 a	273MZ/617DZ	MZ: 40/373 (11%) DZ: 48/617 (7.8%)	1.4	0.9-2.0
Corney et al., 1983	Estudi retrospectiu (Aberdeen)	380MZ/712DZ	MZ : 20/380 (5.3%) DZ : 26/712 (3.7%)	1.4	0.8-2.5
Sperling et al., 2007	Estudi prospectiu (Escandinàvia)	190MZ/741DZ	MZ : 6/190 (3.2%) DZ : 16/741 (2.2%)	2	0.6-3.7

Taula 8: Taxa de malformacions congènites en gestacions múltiples monozigòtiques (MZ) i dizigòtiques (DZ) (amb zigositat comprovada) (Font: Sperling et al., 2007) NCCP: National Collaborative Perinatal Project; RR: risc relatiu

L'ecografia de les 11-13⁶ setmanes, a més de permetre el càlcul de risc d'aneuploidia mitjançant la mesura de la TN i la valoració d'altres marcadors com l'os nasal o el ductus venós, ha permès amb la millora de la resolució dels ecògrafs, estudiar l'anatomia fetal i diagnosticar o sospitar una proporció creixent de defectes estructurals durant el primer trimestre. En un estudi multicèntric en gestacions úniques no seleccionades, es va indicar de forma randomitzada una ecografia anatòmica a les 12-14 setmanes o a les 15-22 setmanes i es va comparar la detecció de defectes estructurals entre els dos grups. Les diferències obtingudes no van ser significatives, amb un 38% de detecció en el primer trimestre i un 47% en el segon. En el primer trimestre van poder ser diagnosticades el 69% de les anomalies letals (Saltvedt et al., 2006). Hi ha un estudi en gestants de risc amb l'ecografia de primer trimestre realitzada en un centre de referència, que sobre 3094 fetus es va obtenir una detecció de malformacions majors extremadament elevada, del 84% (Becker & Wegner, 2006). Aquestes diferències tan marcades en les taxes de detecció són explicables pel fet que hi ha sèries que inclouen les TN augmentades com a malformacions i les anomenen "higromes quístics de primer trimestre" (Borrell, 2009c). Una metanàlisi recent sobre la detecció de malformacions en primer trimestre que recull els resultats de 8 centres de diferents llocs del món amb més de 1000 casos en cada un i un total de 36 237 fetus estudiats, conclou que la detecció en el primer trimestre és del 29% (Borrell et al., 2010."in press")

En relació a l'ecografia precoç en bessons per al diagnòstic de defectes estructurals, hi ha un estudi multicèntric que va obtenir una detecció del 29% però alguns diagnòstics es van fer a les 19 setmanes (Sperling et al., 2007). Degut al risc incrementat de cardiopaties en les gestacions monozigòtiques, molts experts recomanen realitzar una ecocardiografia fetal a totes les gestacions monocorials (Bahtiyar et al., 2007; Campbell et al., 2009). Un estudi sobre l'efectivitat de l'ecocardiografia en gestacions gemel·lars de segon trimestre (711 fetus i 330 gestacions) realitzades en un centre de referència, va obtenir una sensibilitat del 88.8% i una especificitat del 99.8%, resultats comparables als obtinguts en gestacions úniques (Paladini et al., 2005).

11. TN augmentada amb cariotip normal

11.1 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions úniques. Intervals de referència de la TN en el nostre centre.

Una TN augmentada a les 11-13⁶ setmanes de gestació pot ser una expressió fenotípica d'anomalia cromosòmica, però en absència d'aneuploïdia la mesura de la TN també és rellevant perquè s'associa amb un risc incrementat de resultats perinatals adversos que poden ser causats per múltiples factors com una cardiopatia i altres malformacions fetals, displàsies òssies, problemes metabòlics i síndromes gèniques (Bilardo et al., 1998; Souka et al., 1998). Una TN es considera augmentada quan es troba per sobre del percentil 95 en funció de la LCC però un cop descartada l'aneuploïdia, el risc de resultat advers no augmenta significativament fins que la TN es troba per sobre de 3.5 mm o del percentil 99 (Souka et al., 2005). Aquest fet queda reflectit en la taula 9, que és el resum de 4 estudis, i on també es mostra la relació entre el gruix de la TN i la prevalença de defectes cromosòmics, d'avortament o mort fetal, d'anomalies fetals majors i del naixement d'un nadó viu i sa (Souka et al., 2005).

TN	Defectes cromosòmics	Mort fetal	Malformacions majors	Nadons vius i sans
<percentil 95	0.2%	1.3%	1.6%	97%
Percentil 95-99	3.7%	1.3%	2.5%	93%
3.5-4.4 mm	21.1%	2.7%	10.0%	70%
4.5-5.4 mm	33.3%	3.4%	18.5%	50%
5.5-6.4 mm	50.5%	10.1%	24.2%	30%
>6.5 mm	64.5%	19.0%	46.2%	15%

Taula 9: Relació entre el gruix de la TN i la prevalença de defectes cromosòmics, avortament o mort fetal i malformacions majors Font: Souka et al., 2005

Per aquests autors, una TN de 3.5 mm a les 11-13⁶ setmanes representa el percentil 99 independentment de l'edat gestacional. En el nostre centre es van calcular els intervals de referència per la LCC i es va trobar que una TN de 3.5 mm no corresponia sempre al percentil 99. Així per una LCC de 45 mm el percentil 99 és 2.27 mm i per una LCC de 84 mm, 3.78 mm, tal com es mostra a la taula 10 (Borrell et al., 2006).

CRL (mm)	Percentil								
	1	2.5	5	10	50 (Mediana)	90	95	97.5	99
45	0.49	0.58	0.67	0.78	1.18	1.70	1.88	2.05	2.27
46	0.51	0.61	0.70	0.80	1.22	1.74	1.92	2.10	2.32
47	0.53	0.64	0.72	0.83	1.25	1.78	1.97	2.14	2.38
48	0.56	0.66	0.75	0.86	1.28	1.82	2.01	2.19	2.43
49	0.58	0.68	0.77	0.89	1.32	1.86	2.05	2.24	2.47
50	0.60	0.70	0.80	0.91	1.35	1.90	2.09	2.28	2.52
51	0.62	0.73	0.82	0.93	1.38	1.94	2.13	2.32	2.57
52	0.64	0.75	0.84	0.96	1.41	1.97	2.17	2.37	2.61
53	0.66	0.76	0.86	0.98	1.43	2.01	2.21	2.41	2.66
54	0.67	0.78	0.88	1.00	1.46	2.05	2.25	2.45	2.70
55	0.69	0.80	0.90	1.02	1.49	2.08	2.29	2.49	2.75
56	0.70	0.82	0.92	1.04	1.52	2.11	2.33	2.53	2.79
57	0.72	0.84	0.94	1.06	1.54	2.15	2.36	2.57	2.83
58	0.73	0.85	0.96	1.08	1.57	2.18	2.40	2.60	2.87
59	0.75	0.87	0.97	1.10	1.59	2.21	2.43	2.64	2.91
60	0.76	0.88	0.99	1.12	1.61	2.24	2.47	2.68	2.95
61	0.77	0.89	1.00	1.13	1.64	2.28	2.50	2.71	2.99
62	0.79	0.91	1.02	1.15	1.66	2.31	2.53	2.75	3.03
63	0.80	0.92	1.03	1.16	1.68	2.33	2.56	2.78	3.07
64	0.81	0.93	1.05	1.18	1.70	2.36	2.60	2.82	3.11
65	0.82	0.94	1.06	1.19	1.72	2.39	2.63	2.85	3.15
66	0.83	0.96	1.07	1.21	1.74	2.42	2.66	2.89	3.18
67	0.84	0.97	1.08	1.22	1.76	2.45	2.69	2.92	3.22
68	0.85	0.98	1.10	1.24	1.78	2.48	2.72	2.95	3.26
69	0.85	0.99	1.11	1.25	1.80	2.50	2.75	2.98	3.29
70	0.86	1.00	1.12	1.26	1.82	2.53	2.78	3.02	3.33
71	0.87	1.01	1.13	1.27	1.84	2.56	2.81	3.05	3.36
72	0.88	1.02	1.14	1.29	1.86	2.58	2.84	3.08	3.40
73	0.89	1.02	1.15	1.30	1.87	2.61	2.86	3.11	3.43
74	0.89	1.03	1.16	1.31	1.89	2.63	2.89	3.14	3.46
75	0.90	1.04	1.17	1.32	1.91	2.66	2.92	3.17	3.50
76	0.90	1.05	1.18	1.33	1.93	2.68	2.95	3.20	3.53
77	0.91	1.05	1.18	1.34	1.94	2.70	2.97	3.23	3.56
78	0.92	1.06	1.19	1.35	1.96	2.73	3.00	3.26	3.60
79	0.92	1.07	1.20	1.36	1.97	2.75	3.02	3.29	3.63
80	0.92	1.07	1.21	1.37	1.99	2.77	3.05	3.32	3.66
81	0.93	1.08	1.21	1.38	2.00	2.80	3.08	3.34	3.69
82	0.93	1.09	1.22	1.38	2.02	2.82	3.10	3.37	3.72
83	0.94	1.09	1.23	1.39	2.03	2.84	3.13	3.40	3.75
84	0.94	1.10	1.23	1.40	2.05	2.86	3.15	3.43	3.78

Taula 10: Percentils de la translucència nugal en funció de la LCC (Font: Borrell et al.,2006)

Entre les malformacions que s'han trobat associades amb una TN augmentada, els defectes cardíacs són els més prevalents, sense cap predominança per cap tipus de cardiopatia. En 6 estudis que incloïen un total de 3448 fetus amb una TN augmentada i cariotip normal, la prevalença de cardiopatia congènita va ser de 39/1000 (en comptes de 8-9/1000 que és el risc de la població general) i aquesta prevalença s'anava incrementant a mesura que augmentava la TN, de 17/1000 entre 2.5 i 3.4 mm fins 78/1000 quan era superior a 3.5 mm (Souka et al., 2005).

Diversos estudis han reportat la utilitat de la TN per detectar defectes cardíacs i els resultats trobats han sigut variables en funció de la definició del punt de tall (percentil 95 o 99), de l'edat gestacional (entre 11 i 14 setmanes), de la població d'estudi (baix risc o risc elevat) i de la definició de cardiopatia congènita (cardiopatia major o qualsevol tipus de defecte), amb xifres de detecció que oscil·laven entre 3.1 i un 56% (Clur et al., 2008). Una meta-anàlisi sobre el cribatge de cardiopatia a partir de la mesura de TN, va reportar una detecció del 37% quan el punt de tall es situava en el percentil 95 i del 31% quan es situava en el percentil 99 (Makrydimas et al., 2003).

Considerant que les experiències reportades d'ecografia de les 20 setmanes mostren una detecció de només entre 19 i 45% de les cardiopaties congènites (Garne et al., 2001) i que en canvi una ecocardiografia realitzada en un centre especialitzat detecta la majoria d'aquests defectes, fins i tot abans de les 16 setmanes (Comas et al., 2002; Rasiah et al., 2006), una TN augmentada especialment per sobre del percentil 99, constitueix avui en dia una indicació clara d'ecocardiografia fetal (Lee et al., 2008. ISUOG Consensus Statement).

El llistat d'anomalies estructurals i síndromes gèniques que s'han trobat presents en alguns fetus amb TN augmentada i cariotip normal és molt extens, però una veritable associació i una prevalença substancialment incrementada respecte a la població general només ha pogut ésser identificada per algunes d'aquestes anomalies: hèrnia diafragmàtica (40%), omfalocel (40%), megabufeta (30%), "body stalk anomaly" (84%), defectes esquelètics i entre les síndromes genètiques, la hiperplàsia suprarenal congènita, les aquinèsies fetals, la síndrome de Noonan i de Smith-Lemli-Opitz i l'atròfia muscular espinal (Souka et al., 1998; 2001; 2005).

La fisiopatologia d'una TN augmentada és complexa i poc coneguda, però degut a que s'associa a condicions molt heterogènies sembla ser d'origen multifactorial. Els possibles mecanismes fisiopatològics inclouen: disfunció cardíaca associada amb defectes estructurals de cor i grans vasos; congestió venosa del coll i del cap associada amb constricció del cos fetal, com en els casos de ruptura amniòtica ("body stalk anomaly"), o de compressió mediastínica superior (hèrnia diafragmàtica) o de tòrax estret (displàsies esquelètiques); composició alterada de la matriu extracel·lular i del col·lagen (trisomia 21, malalties metabòliques); dificultat en el drenatge limfàtic degut a un desenvolupament anòmal o retardat del sistema limfàtic (síndrome de Turner i de Noonan) o per disminució dels moviments fetals (malalties neuromusculars); anèmia fetal (α -talassèmia, anèmia de Fanconi) i hipoproteinèmia (síndrome nefròtic congènit) (Souka et al., 2005).

11.2 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions dicorials

El significat d'una TN augmentada amb cariotip normal en un o ambdós fetus procedents d'una gestació múltiple és menys conegut. No hi ha cap estudi específic de TN augmentada amb cariotip normal en gestacions gemel·lars dicorials, però cal suposar que el mecanisme fisiopatològic del procés i la patologia associada amb un risc incrementat de malformacions, defectes genètics i mort fetal, és el mateix que en les gestacions úniques.

11.3 TN augmentada amb cariotip normal en les gestacions monocorials. Predicció de resultats adversos i de la síndrome de transfusió fetofetal (STFF)

En les gestacions monocorials, degut als seus patrons vasculars específics caracteritzats per l'existència d'anastomosis vasculars entre les dues circulacions fetoplacentàries, una TN augmentada pot estar produïda per un desbalanç hemodinàmic entre les dues circulacions fetals, mecanisme fisiopatològic exclusiu d'aquest tipus de gestacions (Sebire et al., 1996, 1997b). De fet, diversos estudis han confirmat que una TN superior al percentil 95 amb cariotip normal és més prevalent en els fetus procedents de gestacions monocorials que en els que

provenen d'una gestació dicorial o en els fetus únics. (Sebire et al., 1996; Monni et al., 2000; Sepúlveda et al., 2009).

Els primers estudis van suggerir que aquest increment de la TN en les gestacions monocorials podia ser una manifestació precoç de desequilibri hemodinàmic associat amb una STFF severa posterior. Els autors van postular que la TN incrementada podria ser una manifestació d'insuficiència cardíaca congestiva transitòria en el fetus receptor (Sebire et al., 1996,1997b). Aquests mateixos autors en una sèrie de 287 gestacions monocorials van trobar que en els 43 casos que van desenvolupar una STFF hi havia una major prevalença de TN superior al percentil 95 en el primer trimestre (17.4% vs. 6.6% dels fetus i 28% vs. 10.2% de les gestacions). La raó de probabilitat o "likelihood ratio" era de 3.5 (Sebire et al., 2000).

Altres estudis no obstant, no han confirmat aquesta hipòtesi. Sperling i cols., (2007) no van evidenciar cap cas de TN superior al percentil 95 en les 17 de 74 gestacions monocorials (23%) que van desenvolupar una STFF. El Kateb i cols., (2007) sobre 103 gestacions monocorials valorades prospectivament i 236 retrospectivament, tampoc van trobar una associació significativa entre TN superior al percentil 95 i STFF, però en canvi sí que van trobar una relació significativa entre discordança de LCC en el primer trimestre i STFF posterior. Casasbuenas i cols (2008) en un estudi prospectiu de 30 gestacions monocorials, tampoc van trobar una correlació significativa entre TN i subseqüent aparició de STFF.

En un estudi posterior del mateix grup del Professor Nicolaidis (Kagan et al., 2007) que incloïa 512 gestacions monocorials amb 58 casos de STFF (11.3%), van evidenciar que el factor que era realment predictiu d'una STFF severa no era una TN augmentada, sinó una discordança en la mesura de la TN superior al 20%. Van trobar aquesta discordança en 20% de les gestacions amb bon pronòstic, 51% de les gestacions amb STFF posterior i 64% de les que van acabar amb mort d'un o ambdós fetus entre les 13-18 setmanes. Els autors van concloure que amb una discordança de la TN superior al 20%, el risc de STFF severa o mort fetal precoç era superior al 30%, mentre que quan la discordança era inferior al 20%, el risc d'aparició d'aquestes complicacions no arribava al 10%. Aquest resultat no obstant,

no va poder ser confirmat per aquests mateixos autors en l'estudi posterior citat prèviament, sobre 179 gestacions monocorials amb 26 casos de STFF (Maiz et al., 2009b). Quan els autors van valorar la contribució del DV per a la predicció de resultats adversos, la discordança de TNs no afegia cap millora al model (mitjana de la TN 19.6% vs 16.7%) Casasbuenas i cols., (2008) tampoc no van trobar més casos de STFF entre les gestacions que havien presentat una discordança de la TN superior al 20% en el primer trimestre.

12. Creixement fetal discordant en les gestacions gemel·lars de primer trimestre

12.1 Creixement fetal de primer trimestre i datació en les gestacions múltiples

En les gestacions gemel·lars s'ha pogut constatar que ja en el primer trimestre, el creixement fetal no és uniforme i gairebé sempre existeix una certa discrepància en la longitud cefalocaudal (LCC) entre els bessons. Diversos estudis han demostrat que la mitjana de la discrepància de la LCC en bessons sans entre les 10 i les 14 setmanes és aproximadament de 3 mm o del 4.2% o de 1-2 dies i no s'han trobat diferències significatives en funció de la corionicitat (Sebire et al., 1998; Kalish et al., 2003; Salomon et al., 2005; Tai & Grobman, 2007; Bhide et al., 2009).

És conegut, que una restricció de creixement en el primer trimestre s'associa a anomalies cromosòmiques, a altres defectes congènits severs i a pèrdua gestacional. En les gestacions gemel·lars s'ha vist que una discordança de creixement important s'associa amb un risc incrementat d'anomalies congènites en l'embrió més petit (Drugan et al., 1992; Weissman et al., 1994). Per aquest motiu, la majoria d'autors recomanen datar la gestació a partir de la LCC del fetus més gran perquè consideren que és possible una restricció precoç en el creixement però no un creixement augmentat (Sebire et al., 1998; Protocol de Diagnòstic Prenatal, Generalitat de Catalunya 2008). No obstant, hi ha un estudi prospectiu sobre 47

gestacions gemel·lars amb bessons sans procedents de RMA, que va observar que la LCC del bessó més petit s'ajustava millor a l'edat gestacional real (Salomon et al., 2005). Finalment Bhide i cols (2009), en un estudi molt recent, on la discrepància de LCC tenia un valor limitat per la predicció de resultats adversos, van proposar que la datació de la gestació es realitzés a partir de la LCC mitjana, però actualment aquesta proposta no s'aplica de manera general en la pràctica clínica.

12.2 Creixement discordant de primer trimestre i resultats obstètrics desfavorables

La majoria d'estudis en bessons de primer trimestre han trobat una associació significativa entre creixement discordant i resultats obstètrics desfavorables, però el punt de tall per considerar la discrepància patològica i el tipus de morbiditat associada, és variable. Kalish i cols. (2004) en un estudi sobre 159 gestacions dicorials van trobar que una discordança superior al 10% (percentil 90 de la discordança) s'associava a un augment significatiu d'anomalies cromosòmiques i de defectes estructurals en el fetus petit (22.2% vs 2.8%). Bartha i cols (2005) comparant els resultats perinatals entre 19 gestacions gemel·lars amb creixement discordant, (considerat com a discrepància de la LCC >1 Desviació Standard (8.8% de les gestacions)) i 41 gestacions amb un creixement concordant, van concloure que els bessons "discrepants" no presentaven un risc incrementat de defectes congènits quan l'anatomia fetal era normal. Salomon i cols., (2005) en un estudi sobre 182 gestacions gemel·lars (162 dicorials i 30 monocorials) van trobar que els resultats desfavorables només eren evidents a partir de discordances de creixement molt marcades ($>$ percentil 95, 9.8 mm o del 14%).

Altres estudis han trobat que només hi havia una associació significativa entre creixement inicial discordant i resultats perinatals desfavorables, en funció del tipus de corionicitat. Així Sebire i cols (1998) van evidenciar que en les 20 gestacions dicorials amb anomalia cromosòmica discordant i en les 15 que van acabar amb avortament o mort fetal d'un dels fetus, la mitjana de la disparitat de la LCC era significativament més gran, que en les gestacions dicorials que van acabar amb els dos fetus vius. En canvi, en les 19 gestacions monocorials que van

acabar amb un resultat advers, no hi havia diferències significatives en la disparitat de la LCC. Els autors van atribuir la discrepància precoç de la mida fetal de les gestacions dicorials, a diferències genètiques. Bhide i cols., (2009) van trobar resultats oposats: en les 24 gestacions monocorials que van acabar amb pèrdua d'un o d'ambdós fetus, la discrepància de la LCC era significativament superior que en les 101 gestacions monocorials amb bon resultat. En canvi, en les gestacions dicorials no van trobar cap diferència de creixement inicial entre les 15 que van acabar amb pèrdua fetal i les 367 que van tenir un bon resultat. Malgrat tot, els autors van concloure que la sensibilitat d'un creixement precoç discordant per predir una pèrdua gestacional era baixa, també en les gestacions monocorials. (16.7% per una discrepància superior al percentil 95 (o del 12%)) (Taula 11).

12.3 Creixement discordant de primer trimestre com a predictor de STFF en les gestacions monocorials

Sebire i cols., (1997b) van trobar que la disparitat de la mida fetal en les gestacions monocorials de primer trimestre no representava un factor de risc per al desenvolupament posterior d'una STFF. Altres estudis en canvi, sí que van trobar aquesta associació. Kagan i cols., (2007), del mateix grup de Nicolaides i en un estudi prospectiu posterior ja esmentat prèviament, sobre 58 gestacions que van desenvolupar una STFF, van trobar que en aquestes gestacions la discordança de la LCC era significativament més gran, comparat amb les 412 gestacions que no van presentar aquesta complicació. De tota manera, amb una anàlisi de regressió van evidenciar que la inclusió d'aquest paràmetre no millorava la predicció de STFF respecte a la utilització d'una TN discordant superior al 20% únicament. El Kateb i cols., (2007), en una sèrie retrospectiva de 100 casos de STFF referits per tractament amb làser, van trobar que una disparitat de la mida fetal superior al 10% a les 11-14 setmanes representava un factor de risc significatiu per l'aparició de STFF abans de les 20 setmanes (88% vs.. 12%). Finalment Tai i Grobman. (2007) en una sèrie més petita de 43 gestacions monocorials amb 6 casos de STFF, van trobar també que una discordança de la LCC superior al 11% (> percentil 85) s'associava de forma significativa amb l'aparició de STFF (en 3 de 7 casos discordants vs. 3 de 36 no discordants).

12.4 Creixement discordant de primer trimestre com a predictor de pes fetal discordant al naixement

Diversos d'estudis de creixement fetal en gestacions gemel·lars han trobat una associació significativa entre una discrepància de mida en el primer trimestre de la gestació amb un pes discordant al naixement, però altres estudis no han pogut confirmar. En les gestacions dizigòtiques, un creixement discordant des de el primer trimestre pot estar condicionat per diferències genètiques, en canvi en les gestacions monozigòtiques, pot ser degut a diferències nutricionals secundàries a un desequilibri hemodinàmic precoç. En les gestacions dicorials, les diferències de creixement poden ser degudes també a diferències de la funció placentària, però en aquests casos la restricció de creixement d'un dels fetus sol aparèixer més tardanament.

Sebire i cols (1998), en l'estudi sobre discrepància de mida fetal de primer trimestre esmentat prèviament, no van trobar cap relació entre una LCC discordant en el primer trimestre i un pes discordant al naixement en gestacions dicorials ni tampoc en monocorials. Salomon i cols. (2005) tampoc van trobar cap correlació entre les diferències de la LCC en el primer trimestre i les diferències ponderals al naixement.

En canvi, Kalish i cols. (2003), en un estudi sobre 130 gestacions gemel·lars dicorials van trobar una correlació positiva entre una LCC discrepant a les 11-14 setmanes (> 3 dies) i un pes discordant al naixement ($> 20\%$). Bartha i cols (2005) van trobar també que la taxa de restricció de creixement intrauterí i la taxa de discordança ponderal al final de la gestació ($> 25\%$), eren significativament més elevades en el grup de gestacions amb una LCC discordant en el primer trimestre (> 1 DE) que en el grup control. Tai i Grobman (2007) van trobar que hi havia una associació significativa entre una diferència de LCC superior al percentil 85 en el primer trimestre i una diferència ponderal superior al 20% al naixement. Finalment en l'estudi de Bhide i cols (2009) també es va trobar una associació significativa entre discordança de LCC i pes al naixement, però només en les gestacions dicorials. Els autors atribueixen l'absència d'aquesta correlació en les gestacions monocorials a l'escàs nombre de casos. De la mateixa manera que en la predicció

de la pèrdua gestacional, aquest estudi va trobar que la sensibilitat de la discrepància de la LCC per predir una discordança del pes al naixement era baixa (26.9 i 7.7% per una discrepància de LCC en el percentil 90 i 95 respectivament). (Taula 11)

Percentil	Discrepància LCC (%)			Sensibilitat per pèrdua fetal (%)			Sensibilitat per discordança pes fetal (%)		
	Tots	MC	DC	Tots	MC	DC	Tots	MC	DC
50 (mitjana)	3.3	3.6	3.0	66.7	66.7	66.7	69.2	70.0	71.9
75	6.8	7.2	6.4	41.0	41.7	46.7	48.1	55.0	43.8
90	10.4	11.4	10.1	20.5	20.8	13.3	26.9	25.0	21.9
95	12.2	12.1	12.3	15.4	16.7	13.3	7.7	10.0	6.3
97.5	15.9	14.6	16.0	12.8	16.7	13.3	3.8	0	6.3
99	19.3	48.7	17.8	7.7	4.2	6.7	1.9	0	3.1

TAULA 11: Percentils poblacionals per la discrepància de la LCC entre bessons, i sensibilitat per a la predicció de pèrdues fetals i de discordança severa del pes al naixement per tots els bessons, monocorials (MC) i dicorials (DC) Estudi retrospectiu en 507 gestacions gemel·lars (382 DC i 125 MC) (Font: Bhide et al., 2009).

13- Plantejament general i justificació de la temàtica de la tesi:

Les gestacions gemel·lars presenten un risc augmentat d'aneuploïdia i d'altres defectes congènits i per aquesta raó els mètodes de cribratge de primer trimestre per detectar aquestes anomalies tenen una gran importància, però alhora una major complexitat. La mesura de la TN a les 11-13⁶ setmanes és un bon marcador d'aneuploïdia fetal, així com també d'altres defectes congènits i de mort perinatal, en fetus euploides.

Hi ha pocs estudis clínics publicats sobre l'efectivitat del Test Combinat en gestacions gemel·lars, i sobre la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre, tant en fetus amb cariotip normal com en fetus aneuploïdes i sobre les possibles diferències d'aquests marcadors entre gestacions dicorials i monocorials,

o entre gestacions espontànies i les que procedeixen de reproducció mèdicament assistida (RMA).

En gestacions gemel·lars monocorials, es va trobar que una TN augmentada en un o ambdós fetus amb cariotip normal, es relacionava sobretot amb l'aparició posterior de la síndrome de transfusió feto-fetal severa (STFF) encara que estudis posteriors no ho confirmen. No hi ha estudis publicats del valor pronòstic d'una TN augmentada amb cariotip normal en bessons dicorials.

II. HIPÒTESI DE TREBALL

Aquesta tesi es planteja d'acord amb les següents hipòtesis:

- 1) En gestacions gemel·lars, la utilització combinada de la bioquímica amb l'ecografia seria un mètode més efectiu de cribratge d'aneuploïdia que la utilització exclusiva de la TN: podria disminuir els falsos positius i per tant procediments invasius innecessaris, mantenint la sensibilitat i la possibilitat d'un càlcul de risc individual per cada fetus.
- 2) Existeix una possible diferència en la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre entre gestacions monocorials i dicorials i entre gestacions gemel·lars espontànies i gestacions procedents de RMA.
- 3) En gestacions gemel·lars monocorials euploides, la TN es pot trobar més engruixida que en les gestacions gemel·lars dicorials degut a possibles fenòmens relacionats amb una STFF incipient, que contribuiria a incrementar els falsos positius del cribratge d'aneuploïdia.
- 4) Una TN extrema (>percentil 99) en un o ambdós bessons que presentin un cariotip normal, està associada a defectes congènits i a resultats perinatals desfavorables, tant en les gestacions dicorials com monocorials.

III. OBJECTIUS

1. Comparar l'efectivitat del cribratge combinat bioquímic-ecogràfic amb el cribratge exclusivament ecogràfic mitjançant la mesura de la TN, en la detecció prenatal de trisomia 21, en un total de 100 gestacions gemel·lars de primer trimestre. Avaluació dels resultats en un estudi ampliat amb 161 gestacions. **(estudi 1 i annex)**.
2. Determinar la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre (β -hCG i PAPP-A) en gestacions gemel·lars euploides i comparar-la amb la de les altres sèries de la literatura. Avaluació l'efectivitat del cribratge combinat utilitzant els factors de correcció per gestació gemel·lar obtinguts a partir de la distribució dels marcadors bioquímics de la nostra població gestant, substituint els factors de correcció establerts a la literatura **(estudi 1 i annex)**.
3. Comparar la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre entre gestacions monocorials i dicorials, i entre gestacions espontànies i gestacions obtingudes a partir de reproducció mèdicament assistida **(estudi 1 i annex)**.
4. Comparar els valors de la TN entre fetus procedents de gestacions monocorials i dicorials, i entre fetus procedents de gestacions espontànies i fetus procedents de reproducció mèdicament assistida **(estudi 1 i annex)**.
5. Comparar la freqüència de fetus euploides amb una TN superior al percentil 99 en gestacions monocorials, dicorials i gestacions úniques **(estudi 2)**.
6. Descriure els resultats perinatals de les gestacions gemel·lars monocorials i dicorials que presenten un o ambdós fetus amb una TN superior al percentil 99 i cariotip normal **(estudi 2)**.
7. Avaluació l'associació entre la mesura de la TN en el primer trimestre i l'aparició de STFF en les gestacions monocorials **(estudi 2)**.

IV. TREBALLS REALITZATS: MÈTODES I RESULTATS

1. Metodologia de l'estudi

El disseny de l'estudi, la població d'estudi i la metodologia utilitzada queden descrits en els apartats de "Material i Mètodes" de cada un dels articles que componen aquesta Tesi Doctoral.

Aquests articles estan inclosos en les pàgines següents tal com han estat publicats a la literatura científica.

2. Resultats globals

El primer estudi incloïa 100 gestacions gemel·lars consecutives de primer trimestre amb seguiment complet, avaluades durant un període de 2 anys i mig. De manera similar, tant la mesura de la TN associada a l'edat materna, com l'aplicació del Test Combinat, van permetre detectar les dues gestacions i els tres fetus afectes de trisomia 21. No obstant, la taxa de falsos positius obtinguda amb el Test Combinat va ser substancialment inferior a la de la mesura aïllada de la TN. Aquesta taxa va ser del 5.1% de les gestacions (95% IC, 0.7-9.5) i 3.6% dels fetus (95% IC, 1.0-6.1) amb el Test Combinat vs. 14.3% (95% IC, 7.4-21.2) i 8.6% (95% IC, 4.7-12.6) amb la TN, malgrat que les diferències no eren estadísticament significatives.

Un cop descartades les gestacions amb trisomia 21, la mediana de la f β -hCG expressada en MoMs era de 1.57 i la mediana de la PAPP-A de 1.96. No es van trobar diferències en aquests dos marcadors bioquímics ni tampoc en la TN, entre les gestacions espontànies (n=42) i les gestacions obtingudes per RMA (n=56). Tampoc no es van trobar diferències en els marcadors bioquímics entre les gestacions dicorials (n=87) i monocorials (n=11) però la TN va ser significativament inferior en les gestacions monocorials, amb una mediana de 0.87 MoMs i 1.0 respectivament (p=0.009).

Quan vam aplicar com a factor de correcció pel càlcul de risc de trisomia 21, les pròpies medianes dels marcadors bioquímics obtingudes en aquesta mateixa sèrie en comptes dels factors de correcció establerts per Spencer (2000), les dues gestacions i els tres fetus afectes de trisomia 21 van poder ser identificats, però es va obtenir un lleuger increment dels falsos positius, tot i que encara eren inferiors als de la TN (8.2% de les gestacions i 5.5% dels fetus)

En l'annex a l'estudi 1 ampliat amb 161 gestacions gemel·lars de primer trimestre amb seguiment complet, estudiades durant un període de 3 anys i 7 mesos, el Test Combinat també va permetre la detecció de les 3 gestacions i 4 fetus afectes de trisomia 21, així com d'un fetus afecte de síndrome de Turner. No es va detectar una gestació amb ambdós fetus afectes de síndrome de Klinefelter. Els falsos positius obtinguts van ser de 6.4% de les gestacions i 3.5% dels fetus.

La mediana de la f β -hCG obtinguda en les gestacions euploides va ser de 1.72 MoMs i la de la PAPP-A de 2.01 MoMs. Quan es va comparar el valor d'aquests marcadors en funció de la corionicitat (n=133 gestacions dicorials i 23 monocorials) es va evidenciar que tant la mediana de la f β -hCG com la mediana de la PAPP-A eren significativament superiors en les gestacions dicorials [1.86 MoMs vs. 1.44 (p=0.01) i 2.04 MoMs vs. 1.59 (p=0.02) respectivament]. Quan es va comparar el valor dels marcadors entre les gestacions espontànies (n=58) i les gestacions obtingudes per RMA (n=98), es va evidenciar que la mediana de la PAPP-A era significativament menor en les gestacions procedents de RMA (2.34 MoMs vs. 1.91; p=0.01). En canvi, la f β -hCG mostrava valors més elevats en les gestacions procedents de RMA, però sense assolir una diferència significativa. En relació a la mesura de la TN, no es van trobar diferències entre els diversos tipus de corionicitat ni de reproducció.

En la valoració del paper individual de cada un dels marcadors en les tres gestacions afectes de trisomia 21, cal remarcar que la TN era en tots 3 casos superior al percentil 95 (> 1.75 MoMs). La distribució de la PAPP-A presentava valors baixos en dues gestacions (0.46 i 1.48 MoMs) però un valor elevat en l'altra. La f β -hCG es trobava molt elevada en una de les gestacions (4.18 MoMs) però presentava valors pròxims a la normalitat en les altres dues (1.74 i 1.95 MoMs).

En el segon estudi es va valorar la TN en 206 gestacions gemel·lars consecutives (412 fetus), 166 dicorials i 40 monocorials, durant un període de 4 anys. En 12 d'aquestes gestacions un dels fetus presentava una TN superior al percentil 99. En quatre casos l'estudi citogenètic va diagnosticar una aneuploïdia, dos en fetus amb una TN superior al percentil 99 (síndrome de Down i síndrome de Turner) i dos en fetus amb una TN inferior al percentil 99 (síndrome de Down i síndrome de Klinefelter) i van ser exclosos . Així, sobre un total de 202 gestacions gemel·lars amb cariotip normal, 10 gestacions (5 dicorials i 5 monocorials) presentaven un dels fetus amb una TN superior al percentil 99 (4.95%). En aquestes 10 gestacions l'altre bessó presentava una TN inferior al percentil 99, però en un cas es trobava moderadament incrementada (entre el percentil 95 i el 99). La prevalença d'una TN superior al percentil 99 amb cariotip normal era per tant en els bessons dicorials de l'1.5% (5/324 fetus; 95% IC, 0.2-2.9%) i en els bessons monocorials del 6.25% (5/80 fetus; 95% IC, 0.9-11.6%). En les gestacions úniques durant aquest mateix període de temps, la prevalença d'una TN superior al percentil 99 amb cariotip normal va ser del 2.6% (171/6666 fetus; 95% IC, 2.2-2.9%).

Els resultats perinatals d'aquestes 10 gestacions amb un dels fetus amb una TN superior al percentil 99 i cariotip normal no van diferir entre les 5 gestacions dicorials i les 5 monocorials. Van haver-hi 6 casos de defectes estructurals (3 en les gestacions dicorials i 3 en les monocorials), totes diagnosticades abans de les 22 setmanes. Van haver-hi també dues morts fetals intraúter (una a les 17 setmanes en una gestació dicorial i una a les 35 setmanes en una gestació monocorial). Únicament en dues gestacions (una dicorial i una monocorial) el resultat va ser favorable amb un seguiment pediàtric normal fins als 2 anys de vida.

Es va observar una discordança en la LCC superior al 10% en 4 d'aquestes gestacions i totes 4 van presentar un resultat perinatal desfavorable; en tres casos el fetus més petit era el que presentava la TN augmentada i en l'altre, el fetus petit tenia una TN normal però presentava una exencefàlia. La mitjana de les TN dels fetus amb una TN augmentada va ser de 5.2 mm (4.1-7.1) en els monocorials i de 3.8 mm (3.1-5.0) en els dicorials, diferència sense significació estadística. En les 10 gestacions, la discordança entre les dues TN era superior al 20%.

En 4 de les 40 gestacions monocorials (10%) va aparèixer una STFF, però en cap cas la TN fetal era superior al percentil 99 ni tampoc al percentil 95.

3. Treballs realitzats

ESTUDI 1.

“First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement?”

Anna Goncé, Antoni Borrell, Albert Fortuny, Elena Casals, M Angeles Martínez, Imma Mercadé, Vicenç Cararach, Joan Antoni Vanrell

Prenat Diagn 2005; 25: 1156-61 (December 2005)

PRENATAL DIAGNOSIS

Prenat Diagn 2005; 25: 1156–1161.

Published online 18 October 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/pd.1304

First-trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement?

Anna Gonc ^{1*}, Antoni Borrell¹, Albert Fortuny¹, Elena Casals², M. Angels Mart nez¹, Imma Mercad ², Vicenç Cararach¹ and Joan Antoni Vanrell¹

¹*Prenatal Diagnosis Unit, Institute of Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic, University of Barcelona Medical School, Barcelona, Catalonia, Spain*

²*Department of Biochemistry, Biomedical Diagnosis Center, University of Barcelona Medical School, Barcelona, Catalonia, Spain*

Objective To evaluate the effectiveness of the addition of first-trimester biochemistry to fetal nuchal translucency (NT) measurement in the Combined Test when screening for trisomy 21 in twin pregnancies.

Methods Maternal serum free β -hCG and PAPP-A were determined at 8 to 12 weeks and fetal NT was measured at 11 to 14 weeks. The individual risks were estimated for each of the fetuses using both NT screening alone and the Combined Test. An invasive diagnostic procedure was offered when the risk was 1:250 or over in either one of the fetuses. In the first period, only the results of NT screening were clinically applied. After previous analysis, the Combined Test was introduced into clinical practice.

Results In the two-and-a-half-year study period, a complete follow-up was obtained in 100 twin pregnancies. Three fetuses (two pregnancies) with trisomy 21 were detected by both methods. The false-positive rate achieved by NT screening (14.3% of pregnancies and 8.6% of fetuses) was substantially reduced when first-trimester biochemistry was added in the Combined Test (5.1% of pregnancies and 3.6% of fetuses).

Conclusion The Combined Test appears to maintain the detection rate achieved by NT screening for trisomy 21 in twin pregnancies, but false-positive rates and invasive diagnostic procedures are reduced. Copyright   2005 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: twins; first-trimester screening; trisomy 21; nuchal translucency; Combined Test

INTRODUCTION

The incidence of twin pregnancy is increasing mainly as a result of the widespread use of assisted reproduction technologies and because of the increase in maternal age. In Catalonia, the incidence of multiple pregnancies in the year 2000 was 3.7%. In multiple pregnancies, there is a higher risk for chromosomal abnormality due to more advanced maternal age (Neveux *et al.*, 1996), and invasive procedures are more challenging. Furthermore, women who conceive after assisted reproduction technologies are commonly more reluctant to accept invasive testing. For this reason, aneuploidy screening tests should be as accurate as possible.

In chromosomally normal twin pregnancies, the median values for maternal serum second-trimester markers were found to be about twice those for singleton pregnancies (Wald *et al.*, 1991). Using a correction for twins, second-trimester double-marker screening (alpha-fetoprotein (AFP) and β -hCG) may detect around 50% of affected fetuses for a 5% false-positive rate (Spencer *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 2003), although the value of this 'pseudo-risk' approach has been challenged (O'Brien *et al.*, 1997) and in the 'screen-positive'

results, it is impossible to determine which fetus is affected. Consequently, second-trimester biochemical screening has not been widely accepted (Spencer, 2000; Niemimaa *et al.*, 2002).

On the other hand, first-trimester ultrasound nuchal translucency (NT) measurement in twin pregnancies has allowed the estimation of a specific risk for trisomy 21 in each fetus with a similar sensitivity to that found in singletons (75–80%) but with a slight increase in the false-positive rate (Sebire *et al.*, 1996).

Scarce data are available to assess the benefit achieved by the combination of fetal NT and first-trimester maternal serum markers in twin pregnancy trisomy 21 screening. The largest prospective study including 206 twin pregnancies and four trisomy 21 fetuses detected 75% of cases, with a 9% false-positive rate of pregnancies and 6.9% of fetuses (Spencer and Nicolaides, 2003b). In our center, when we applied the Combined Test to singleton pregnancies (Borrell *et al.*, 2004), NT screening for twin pregnancies was maintained in clinical practice for interventional purposes, although the Combined Test was also done only for further analysis. After a preliminary analysis of the data in 2003, we switched to the Combined Test as the clinically applied method for twins. The performance of both methods applied to the whole series of twin pregnancies is analyzed in the present study.

*Correspondence to: Anna Gonc , Prenatal Diagnosis Unit, Institute of Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic—Seu Maternitat, Sabino de Arana 1. Barcelona 08028, Catalonia, Spain. E-mail: 23446agm@comb.es

MATERIALS AND METHODS

From July 2001 to December 2003, 103 pregnant women attending our department for prenatal care or referred for first-trimester aneuploidy screening were enrolled in the study. A twin pregnancy with both fetuses alive at 11 to 14 weeks scan had been diagnosed in all. In the first 22 months of the study, the risk was estimated by NT combined with maternal age for clinical purposes. Risk with the Combined Test (NT combined with free β -hCG and PAPP-A and maternal age) was calculated only retrospectively, when the follow-up of the pregnancies was completed. In the last eight months and after analysis of the results, the Combined Test became the only clinical method to be applied. This protocol was approved by the Research Ethics Committee of our hospital.

As performed in singleton pregnancies and as has been previously described (Casals *et al.*, 1999; Borrell *et al.*, 2004), at 8 to 12 menstrual weeks, maternal blood was obtained for free β -hCG and PAPP-A assay in fresh samples in all pregnant women (Delfia, PerkinElmer). Serum samples were analyzed immediately, but in the first period, biochemistry was used only retrospectively for risk assessment. An ultrasound examination was performed between 11 and 14 weeks. The crown-rump length was measured and NT thickness was assessed in each twin using the FMF guidelines (Nicolaidis *et al.*, 1994). Chorionicity was determined and was considered monochorionic in the presence of a single placenta and the absence of lambda sign and was considered dichorionic when the placentas were not adjacent or were with a single placenta plate and the lambda sign was present (Sepulveda *et al.*, 1996). The larger of the two CRL measurements was used to estimate the overall gestational age of the pregnancy. Values obtained for free β -hCG, PAPP-A and NT were converted into multiples of the median (MoM) for the corresponding gestational age after correction for the presence of twins as established by Spencer (2000).

In all pregnancies, specific risks of trisomy 21 were estimated using the Delfia software (Delfia, Wallac, PerkinElmer) by two screening methods: (1) NT thickness and (2) the Combined Test. In dichorionic twin pregnancies, taken as dizygotic, each fetus was considered to have an individual risk (one pregnancy with two risks) (Sebire *et al.*, 1996; Spencer, 2000; Spencer and Nicolaidis, 2003b). Each risk was calculated by the individual NT and the background risk corresponding to singletons. In the Combined Test, the biochemistry values were adjusted using the factors described by Spencer (2000). In monochorionic pregnancies (always monozygotic and presumably with the same risk in both fetuses) one single risk for pregnancy was calculated on the basis of the NT of the fetus with the largest measurement. For the Combined Test, the single risk was estimated taking into account the largest NT measurement and biochemistry, after twin correction. The screening results were available on the same day of the scan and were discussed with the women by the obstetrician or the clinical geneticist. Chorionic villus sampling (CVS) or amniocentesis for fetal karyotyping were offered if the estimated risk

for trisomy 21 in either fetus at term was 1:250 or greater. As previously stated, during the first period of the study (70 cases), the invasive diagnostic procedure was only offered after the results of the NT screening, with nondisclosure of the Combined Test. In the second period, the Combined Test was implemented as the clinical interventional method (30 cases). An invasive procedure was also offered irrespective of the results obtained in either screening method, when maternal age was 35 years or more, because it was considered that the background risk was similar to that observed in women over 38 years of age carrying a singleton pregnancy (Meyers *et al.*, 1997).

To confirm the validity of these results, the Combined Test risks were recalculated using the correction for free β -hCG and PAPP-A values, derived from the distribution of these markers in the unaffected pregnancies included in the present series.

Data regarding perinatal outcome were ascertained from delivery room records or by phone enquiry if the pregnancy was not followed and delivered in our center. Cases lacking follow-up were excluded from further analysis. False-positive rates (FPR) were compared with the use of 95% confidence intervals (CIs). In the comparison of marker values, expressed as multiples of the median (MoM), statistical significance was determined by the Mann-Whitney U test. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Among the 103 twin pregnancies, two were excluded because of loss of follow-up. In one pregnancy, the diagnostic procedure was cancelled on the death of the fetus at risk, with an exomphalos being observed. This pregnancy was also excluded. In the remaining 100 twin pregnancies, the mean maternal age was 33.3 years (range 23–42) with 36 (36%) over age 34. Fifty-six of the pregnancies (56%) were the result of assisted reproduction technologies and 12 (12%) were monochorionic. The median gestational age at the time of biochemistry sampling was 11.0 weeks (range 7.3–13.5) and 12.5 weeks at the time of ultrasound examination for NT measurement (range 10.3–14.2).

An invasive diagnostic procedure was performed in 25 women: CVS in 15 and amniocentesis in 10. Of these, 10 of the procedures were carried out because of a positive screening result (based on NT screening in the first period and on the Combined Test in the second period), 10 because of advanced maternal age in spite of a low-risk result, 3 because of parental anxiety and 2 because of other reasons (one family carrier of a balanced chromosomal translocation and one pregnancy with both fetuses presenting choroid plexus cysts). Two women declined the invasive procedure despite a positive screening result. One pregnancy loss was observed seven weeks after amniocentesis in a set of chromosomally normal twins.

Among the study population, three fetuses with trisomy 21 were detected: one monochorionic pregnancy

Table 1—Details of the high-risk pregnancies using either NT screening or the combined test

Case	Maternal age	Chorionicity	NT MoM1	NT MoM2	NT risk1	NT risk2	fb-hCG MoM	PAPP-A MoM	Combined risk1	Combined risk2	Outcome 1	Outcome 2
1	37	MC-DA	8.75	1.75	1/10*	1/10*	0.83	0.25	1/10*	1/10*	T21*	T21*
2	36	DC-DA	0.98	1.95	1/1500	1/30*	0.93	0.80	1/4800	1/100*	Normal	T21*
3	33	DC-DA	1.78	0.94	1/110*	1/3100	1.42	0.73	1/170*	1/4700	46XX	46XX
4	39	MC-DA	1.43	1.04	1/140*	1/140*	2.88	2.42	1/140*	1/140*	46XX	46XX
5	43	DC-DA	0.92	0.31	1/130*	1/290	3.12	0.85	1/40*	1/80*	Normal	Normal
6	31	DC-DA	0.96	2.05	1/4300	1/40*	0.51	0.45	1/10000	1/180*	46XY	46XY
7	31	DC-DA	1.70	1.70	1/210*	1/210*	0.37	0.87	1/6300	1/6300	Normal	Normal
8	34	DC-DA	0.62	1.55	1/2600	1/250*	0.55	0.94	1/10000	1/3000	46XX	46XX
9	27	DC-DA	1.21	1.87	1/2600	1/140*	1.15	0.60	1/5200	1/320	46XX	46XX
10	36	DC-DA	1.70	1.03	1/90*	1/1300	0.53	2.56	1/1700	1/10000	46XY	46XY
11	40	DC-DA	1.40	1.09	1/120*	1/400	0.71	1.36	1/1500	1/4700	46XY	46XX
12	37	DC-DA	0.93	1.51	1/1400	1/160*	0.77	1.63	1/6900	1/950	46XX	46XX
13	37	DC-DA	1.27	1.47	1/440	1/190*	0.82	0.52	1/800	1/360	Normal	Normal
14	31	DC-DA	1.78	1.23	1/150*	1/1700	0.67	0.55	1/580	1/5600	Normal	Normal
15	32	DC-DA	1.78	1.78	1/130*	1/130*	0.92	0.77	1/530	1/530	Normal	Normal
16	40	DC-DA	0.93	1.39	1/640	1/130*	0.62	1.65	1/10000	1/4100	46XX	46XY
17	39	DC-DA	1.00	1.13	1/680	1/460	1.48	0.48	1/330	1/230*	Normal	Normal

* fetuses with a risk $\geq 1/250$

Table 2—Detection rate for trisomy 21 and false-positive rate (FPR) considering pregnancies or fetuses by means of two screening methods

Screening method	Detection of pregnancies	Detection of fetuses	FPR pregnancies	FPR fetuses
NT + maternal age	2/2	3/3	14.3% (14/98) (95%CI: 7.4–21.2)	8.6% (17/197) (95% CI: 4.7–12.6)
NT + f β -hCG + PAPP-A + maternal age	2/2	3/3	5.1% (5/98) (95% CI: 0.7–9.5)	3.6% (7/197) (95% CI: 1.0–6.1)

with both fetuses affected and one dichorionic pregnancy with a single fetus affected. No other aneuploidies were recorded.

The three trisomy 21 fetuses observed in the series were prenatally diagnosed. The woman carrying the monochorionic pregnancy opted for termination and in the dichorionic pregnancy, selective termination with potassium chloride was performed at 13 weeks with a favorable outcome of the surviving twin.

Table 1 provides the results in all the high-risk pregnancies identified comparing both methods of screening in the whole study population. Table 2 shows trisomy 21 detection and FPR when considering either pregnancies or fetuses, and comparing both methods of screening. With the Combined Test, the false-positive rate was substantially reduced from 14.3% of pregnancies (14/98) (95% CI 7.4–21.2) to 5.1% (5/98) (95% CI 0.7–9.5) and from 8.6% of fetuses (17/197) (95% CI 4.7–12.6) to 3.6% (7/197) (95% CI 1.0–6.1) with the same detection rate (100%), although the difference was not statistically significant.

On exclusion of the cases with trisomy 21, the median for free β -hCG expressed in MoM was 1.57 with a mean \log_{10} of 0.073 and a \log_{10} standard deviation of 0.2614. The median for PAPP-A before correction for twin pregnancy was 1.96 with a mean \log_{10} of 0.0003 and a \log_{10} standard deviation of 0.2465. No significant differences were found in either serum analytes or in NT measurement between the spontaneous and

the assisted conceptions for the chromosomally normal pregnancies (Table 3). Similarly, no significant differences were observed in serum markers on comparing the 87 dichorionic and 11 monochorionic chromosomally normal twin pregnancies, although NT levels were significantly lower in the fetuses of monochorionic than dichorionic pregnancies, with a median MoM of 0.87 and 1.0, respectively ($P = 0.009$) (Table 4).

When our own median MoM values for biochemical markers were used for the correction for twins in the risk calculation of the Combined Test, both affected pregnancies were also identified, but an increase in the false-positive rate was observed when compared with the use of Spencer (2000) correction: 8.2% (8/98) vs 5.1% of pregnancies and 5.5% (11/197) vs 3.6% of fetuses.

Table 3—Median marker values observed in spontaneously vs assisted conceived chromosomally normal twin pregnancies

	Spontaneous conception (n = 42)	Assisted conception (n = 56)	Significance P-value
Median f β -hCG MoM	1.51	1.63	0.7
Median PAPP-A MoM	1.99	1.92	0.5
Median NT MoM (fetuses)	1.02 (84 fetuses)	0.96 (112 fetuses)	0.5

Table 4—Median markers values observed in dichorionic vs mono chorionic chromosomally normal twin pregnancies

	Dichorionic pregnancies (n = 87)	Mono chorionic pregnancies (n = 11)	Significance P-value
Median f	1.54	1.67	0.8
β -hCG MoM			
Median	1.92	2.17	0.07
PAPP-A MoM			
Median NT	1.0	0.87	0.009
MoM (fetuses)	(174 fetuses)	(22 fetuses)	

DISCUSSION

Risk for aneuploidy is a matter of concern in twin pregnancies, because the rate of twin pregnancy increases with maternal age, and assisted reproduction technologies are also more common over the age of 34, as in our series, with 36% of the women exceeding this age. In dizygotic pregnancies, the risk for aneuploidy has been considered to be twofold, and age-specific risk for the pregnancy is higher than in singletons (Rodis *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 1997; Odibo *et al.*, 2003), with the consequence of a high uptake of invasive procedures when maternal age alone is considered for offering fetal karyotyping, as has occurred in the present series. However, some epidemiological observations have reported a lower rate of trisomy 21 in twins compared to singletons (Cuckle, 1998; Maymon *et al.*, 1999; Jamar *et al.*, 2003). Recently, the International Down Syndrome Screening Group recommended that maternal age alone should not be considered as an indication for invasive diagnostic procedures in singleton pregnancies (Ferguson Smith *et al.*, 2004), making this issue particularly relevant in twin pregnancies with the need for two invasive samplings with increased complexity and risk of miscarriage.

Dizygotic twins account for at least 70% of the multiple pregnancies with each fetus carrying an independent risk for trisomy 21. However, neither first- nor second-trimester maternal serum markers, can identify the fetus at risk. The detection rate achieved by second-trimester biochemistry is lower than in singletons (51% at a 5% false-positive rate) because the unaffected co-twin can mask the abnormal serum values of the affected twin (Muller *et al.*, 2003).

First-trimester ultrasound NT measurement associated with maternal age has the additional advantage of allowing calculation of the specific risk for each twin. In higher-order multiple pregnancies in which biochemistry is not feasible, NT screening can also identify the fetus at risk. In our series, NT screening identified the three fetuses affected. Adhering to strict guidelines for the ultrasound technique, the sensitivity of NT screening is similar to that obtained in singletons but the false-positive rate may reach 7.3% of fetuses for a 75% detection rate, probably due to a higher prevalence of increased NT in fetuses from mono chorionic pregnancies (8.4%) (Sebire *et al.*, 1996). However, other series found no differences in NT measurements between twins and singletons (Mashiach *et al.*, 2004) or between mono chorionic and dichorionic twin pregnancies (Maymon

et al., 2001). The prevalence of increased NT in the mono chorionic pregnancies that developed severe twin-to-twin transfusion syndrome (TTTS) was shown to be significantly higher than in the non-TTTS group (Sebire *et al.*, 2000). In our series, the false-positive rate using NT screening was 8.6% of fetuses and 14.3% of pregnancies. Surprisingly, the median NT MoM in mono chorionic pregnancies on exclusion of chromosomally abnormal fetuses was significantly lower (0.87) than in dichorionic pregnancies (1.0). At follow-up, TTTS was not identified in any of the 11 mono chorionic pregnancies, but the number of cases was too small to draw to any conclusion. The estimation of two different risks applied to each of the fetuses in mono chorionic pregnancies is not useful since, in most cases, both should be concordant as affected or unaffected. There is some controversy regarding the most appropriate approach to calculate pregnancy risk by using the largest, the smallest or the average of the two NT measurements (Sebire and Nicolaides, 2004). We used the largest NT in order to avoid a decrease in the detection rate. In the mono chorionic-affected pregnancy, both NT measurements combined with maternal age resulted in an increased risk estimation (8.75 and 1.75 MoM in a 37-year-old gravida), but the lowest NT was below the 95th percentile (2.6 mm at 12 weeks of gestation). There was only one mono chorionic pregnancy with discordant NT (1.43 and 1.04 MoM) in which the use of the lowest NT would lead to a low-risk pregnancy estimation.

In singleton pregnancies, the addition of first-trimester biochemistry to NT assessment has been found to increase the detection rate of trisomy 21, between 80 and 92%, while maintaining the 5–10% false-positive rate (Krantz *et al.*, 2000; Bindra *et al.*, 2002; Wapner *et al.*, 2003; Spencer and Nicolaides, 2003a). Our group has reported the use of a two-step approach for the Combined Test (8–11 weeks for biochemistry and 11–14 weeks for NT) in a series of 2779 singleton pregnancies with a detection rate of 86% and a remarkably reduced false-positive rate (3.3%) (Borrell *et al.*, 2004). A study of 159 first-trimester chromosomally normal twin pregnancies using statistical modelling techniques predicted that the addition of maternal biochemistry could increase the detection rate by 5% without losing any of the benefits of ultrasound screening (Spencer, 2000). Subsequently, in a prospective study involving 206 twin pregnancies with four trisomy 21 fetuses, the same author reported a 75% detection rate for 9% of false positives of pregnancies (Spencer and Nicolaides, 2003b). In the present series, the addition of biochemistry at 8 to 11 weeks to NT measurement at 11 to 14 weeks maintained the identification of the affected fetuses, with a substantial reduction in the false-positive rate (from 14.3 to 5.1% of pregnancies). However, wide CIs were observed around the FPR owing to the small dataset. Other authors consider that the appropriate screening strategy for the Combined Test to be applied in twin pregnancies requires the calculation of a pregnancy-specific risk instead of fetus-specific risks (Wald *et al.*, 2003). Roughly, in mono chorionic twins, the methodology only differs in using the mean NT rather than the higher value. In dichorionic twins, a half background

risk (in relation to singleton gestations) is applied to each NT and then both risks are added and multiplied by the corresponding likelihood ratios for biochemistry. Since we considered separated risks for each of the fetuses (without addition) originating from the background risk derived from singletons, differences between those two approaches should be minimal.

The median free β -hCG and PAPP-A maternal serum levels in normal twins should be about twice those of singletons, but some degree of variability was found in the reported studies as shown in Table 5. In our series, PAPP-A (1.96 MoM) rose to nearly twice that of unaffected singletons, in the middle of the level range reported by others (Niemiimaa *et al.*, 2002; Orlandi *et al.*, 2002; Bersinger *et al.*, 2003; Spencer and Nicolaides, 2003b; Mashlach *et al.*, 2004). However, the free β -hCG distribution (1.57 MoM) was substantially lower than expected when compared with other studies, producing a lower FPR when the distribution from other groups was applied to correct for twins in our series. This deviation could be due to an earlier sampling for biochemical markers in our two-step screening approach in comparison with the others. A positive correlation for free β -hCG values in relation to gestational age has been reported by Orlandi *et al.* (2002), in a small series of *in vitro* fertilization twin pregnancies not observed in the spontaneously conceived twins. In our series, more than a half of the pregnancies were conceived with assisted reproduction techniques, but no differences in free β -hCG MoM levels were observed with spontaneously conceived twins (Table 3). Comparing dichorionic and monochorionic pregnancies, no differences were found in first-trimester serum markers (median free β -hCG MoM 1.54 vs 1.67 and median PAPP-A MoM 1.92 vs 2.17 respectively), in agreement with previous reports (Spencer, 2001; Niemiimaa *et al.*, 2002).

In the present series, the Combined Test appears to be a more accurate screening method for twin pregnancies than NT screening alone, as it maintains the detection rate and the possibility of identifying the fetus at risk of NT screening, while reducing the false positives with a consequent reduction in unnecessary invasive procedures. However, when our own correction for twins derived from free β -hCG and PAPP-A distribution is applied in this series, this reduction is less remarkable. Nonetheless, these results should be confirmed in a larger study.

Table 5—Median reported values for free β -hCG and PAPP-A in chromosomally normal twin pregnancies

Study	Twin pregnancies (n)	Median MoM free β -hCG	Median MoM PAPP-A
Spencer (2000)	159	2.10	1.86
Niemiimaa <i>et al.</i> (2002)	67	1.85	2.36
Orlandi <i>et al.</i> (2002)	30 (AR ^a)	1.72	1.61
Spencer <i>et al.</i> (2003)	206	2.15	1.93
Bersinger <i>et al.</i> (2003)	68	1.87	1.87
Mashlach <i>et al.</i> (2004)	93	2.18	2.38
Present Study	98	1.57	1.96

^a AR: assisted reproduction.

REFERENCES

- Bersinger NA, Noble P, Nicolaides KH. 2003. First-trimester maternal serum PAPP-A, SP1 and M-CSF levels in normal and trisomic twin pregnancies. *Prenat Diagn* 23: 157–162.
- Bindra R, Heart V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. 2002. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11–14 weeks: a prospective study of 15030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 20: 219–225.
- Borrell A, Casals E, Fortuny A, *et al.* 2004. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 24: 541–545.
- Casals E, Aibar C, Martínez JM, *et al.* 1999. First trimester biochemical markers for Down Syndrome. *Prenat Diagn* 19: 505–512.
- Cuckle H. 1998. Down's syndrome screening in twins. *J Med Screen* 5: 3–4.
- Ferguson Smith M, Arbuza S, Benn P, *et al.* 2004. *Down Syndrome Screening. A Position Statement from the Scientific Committee of the International Down Syndrome Screening Group.*
- Jamar M, Lemarchal C, Lemaire V, Koulischer L, Bours V. 2003. A low rate of trisomy 21 in twin-pregnancies: a cytogenetics retrospective study of 278 cases. *Genet Couns* 14(4): 395–400.
- Krantz DA, Hallahan TW, Orlandi F, Buchanan P, Larsen JW, Macri JN. 2000. First trimester Down Syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. *Obstet Gynecol* 96: 207–213.
- Mashlach R, Orr-Urtreger A, Yaron Y. 2004. A comparison between maternal serum free β -human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A levels in first-trimester twin and singleton pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 19: 174–177.
- Maymon R, Dreazen E, Rozinsky S, Bukovsky I, Weinraub Z, Herman A. 1999. Comparison of nuchal translucency measurement and second trimester triple serum screening in twins versus singleton pregnancies. *Prenat Diagn* 19: 727–731.
- Maymon R, Jauniaux E, Holmes A, Wiener YM, Dreazen E, Herman A. 2001. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome after assisted conception versus spontaneously conceived twins. *Human Reproduction* 16: 1999–2004.
- Meyers C, Adam R, Dungan J, Prenger V. 1997. Aneuploidy in twin gestations: when is maternal age advanced? *Obstet Gynecol* 89: 248–251.
- Muller F, Dreux S, Dupoizat H, *et al.* 2003. Second trimester Down Syndrome maternal serum screening in twin pregnancies: impact of chorionicity. *Prenat Diagn* 23: 331–335.
- Neveux L, Palomaki G, Knight G, Haddow J. 1996. Multiple marker screening for Down Syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 16: 29–34.
- Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. 1994. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 101: 782–786.
- Niemiimaa M, Suonpaa M, Heinonen S, Seppala M, Bloigu R, Ryyanen M. 2002. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A in twin pregnancies in the first trimester. *Prenat Diagn* 22: 183–185.
- O'Brien JE, Dvorin E, Yaron Y, *et al.* 1997. Differential increases in AFP, hCG, and uE3 in twin pregnancies: Impact on attempts to quantify Down Syndrome screening calculations. *Am J Med Genet* 73: 109–112.
- Odibo AO, Lawrence-Cleary K, Macones GA. 2003. Screening for aneuploidy in twins and higher-order multiples: Is first-trimester nuchal translucency the solution? *Obstet Gynecol Surv* 58(9): 609–614.
- Orlandi F, Rossi C, Allegra A, *et al.* 2002. First trimester screening with free β -hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn* 22: 718–721.
- Rodis JF, Egan JFX, Craffey A, Ciarleglio L, Greenstein RM, Scorza WE. 1990. Calculated risk of chromosomal abnormalities in twin gestations. *Obstet Gynecol* 76: 1037–1041.
- Sebire N, Nicolaides KH. 2004. Multiple pregnancy. In *The 11-13⁶ Weeks Scan*. Fetal Medicine Foundation: London; 95–112.
- Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. 1996. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal

- age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynecol* **103**: 999–1003.
- Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. 2000. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod* **15**(9): 2008–2010.
- Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. 1996. The lambda sign at 10–14 weeks gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* **7**: 421–423.
- Spencer K. 2000. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free B-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn* **20**: 91–95.
- Spencer K. 2001. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: does chorionicity impact on maternal serum free B-hCG or PAPP-A levels? *Prenat Diagn* **21**: 715–717.
- Spencer K, Nicolaides KH. 2003a. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in one-stop clinic: a review of three years prospective experience. *Br J Obstet Gynecol* **110**: 281–286.
- Spencer K, Nicolaides KH. 2003b. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *Br J Obstet Gynecol* **110**: 276–280.
- Spencer K, Salonen R, Muller F. 1994. Down's Syndrome screening in multiple pregnancies using alpha fetoprotein and free beta hCG. *Prenat Diagn* **14**: 537–542.
- Wald NJ, Rish S, Hackshaw AK. 2003. Combining nuchal translucency and serum markers in prenatal screening for Down Syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn* **23**: 588–592.
- Wald N, Cuckle H, Wu TS, George L. 1991. Maternal serum unconjugated oestriol and human chorionic gonadotrophin levels in twin pregnancies: implications for screening for Down's Syndrome. *Br J Obstet Gynecol* **98**: 905–908.
- Wapner R, Thom E, Simpson JL, et al. 2003. First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N Engl J Med* **349**: 1405–1413.

ANNEX A L'ESTUDI 1.

“ Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado”

Anna Goncé, Antoni Borrell, Elena Casals, Florencia Steinvarcel, Agustí Serés, Vicenç Cararach, Eduard Gratacós

Prog Obstet Ginecol 2008; 51 (10): 577-85

ARTÍCULOS ORIGINALES

Anna Goncè^a
 Antoni Borrell^b
 Elena Casals^b
 Florencia Steinvarcel^a
 Agustí Serés^c
 Vicenç Cararach^a
 Eduard Gratacós^a

^aDepartament de Medicina Maternofetal, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, Barcelona, España.

^bDepartament de Bioquímica, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Barcelona, España.

^cServei de Genètica, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

Correspondencia:

Dra. A. Goncè,
 Departament de Medicina Maternofetal, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia,
 Sabino de Arana, 1 08028 Barcelona, España
 Correo electrónico: agonce@clinic.ub.es

Fecha de recepción: 14/4/2008.

Aceptado para su publicación: 5/6/2008.

Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado

577

Trisomy 21 screening in twin pregnancies: results of the application of the combined test

RESUMEN

Objetivo: Descripción de la efectividad del test combinado en gestaciones gemelares. Descripción del valor de los marcadores bioquímicos y de la medición de la translucencia nucal (TN) en gestaciones con fetos euploides y en gestaciones con algún feto afectado. Comparación de los marcadores en función de la corionicidad y del tipo de fecundación, espontánea o asistida.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de 161 gestaciones gemelares. La determinación bioquímica (fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana [fβ-hCG] y proteína plasmática A asociada al embarazo [PAPP-A]) se realizó entre las 8 y las 12 semanas y la medición de la TN entre las 11 y las 14 semanas. Con la aplicación del test combinado se calculó el riesgo de trisomía 21 para cada feto. En gestaciones monocoriales se calculó un único riesgo con la TN mayor. Se recomendó un procedimiento invasivo cuando el riesgo era $\geq 1/250$ en uno o ambos fetos.

Resultados: El test combinado mostró una sensibilidad del 100% para la detección de trisomía 21 (3 gestaciones y 4 fetos) para una tasa de falsos positivos del 6,4% de las gestaciones y 3,5% de los fetos. La mediana de la fβ-hCG fue 1,72 MoM, la PAPP-A 2,01 MoM y la TN 1,05 MoM. En las gestaciones monocoriales la mediana de la fβ-hCG y de la PAPP-A fue significativamente menor que en las gestaciones dicoriales y la PAPP-A fue significativamente menor en las gestaciones procedentes de reproducción asistida. No se observaron diferencias en la medición de la TN en función de la corionicidad ni del tipo de fecundación.

Conclusiones: El test combinado en la gestación gemelar muestra una sensibilidad y una especificidad elevadas. Se observan algunas diferencias en el valor de los marcadores bioquímicos en función de la corionicidad y del antecedente de reproducción asistida, pero estas diferencias deberían confirmarse con un número mayor de casos.

578 PALABRAS CLAVE

Gestación gemelar. Test combinado. Cribado de síndrome de Down.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effectiveness of the Combined Test for trisomy 21 screening in twin pregnancies. To assess the performance of biochemical markers and nuchal translucency (NT) measurement in pregnancies with euploid fetuses and in twin pregnancies with one or two affected fetuses. To compare the value of markers according to chorionicity and the mode of conception.

Material and methods: Retrospective study including 161 twin pregnancies. Maternal serum $\text{f}\beta\text{-hCG}$ and PAPP-A were determined at 8 to 12 weeks and fetal NT was measured at 11 to 14 weeks. The individual risk of trisomy 21 was calculated in each fetus using the Combined Test. In monochorionic pregnancies, the single risk for the pregnancy was obtained with the largest NT. An invasive diagnostic procedure was offered when the risk was 1:250 or more in one or both of the fetuses.

Results: All trisomy 21 pregnancies were identified (three pregnancies and four fetuses) by the combined test for a false-positive rate of 6.4% of pregnancies and 3.5% of fetuses. The median $\text{f}\beta\text{-hCG}$ level, expressed in MoM, was 1.72 and the median PAPP-A level was 2.01. The median NT was 1.05 MoM. Both $\text{f}\beta\text{-hCG}$ and PAPP-A levels were significantly decreased in monochorionic pregnancies and PAPP-A was significantly decreased in pregnancies resulting from assisted reproduction. No significant differences were observed in NT measurement between monochorionic and dichorionic fetuses or between those conceived naturally or by assisted reproduction.

Conclusions: The combined test shows high sensitivity and specificity in screening for trisomy

21 in twin pregnancies. The differences obtained in the biochemical markers according to chorionicity or the mode of conception require confirmation in further studies with a larger number of cases.

KEY WORDS

Twin pregnancy. Combined Test. Down syndrome screening.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha asistido a un incremento importante de las gestaciones multifetales debido al incremento de la edad materna, que condiciona un mayor número de gestaciones dicigotas y, en mayor medida, a la difusión de las técnicas de reproducción asistida. La incidencia de gestaciones múltiples en el año 2000 en Cataluña fue de alrededor del 4% y, por tanto, aproximadamente 4 veces superior a lo esperado. El riesgo de aneuploidia se encuentra incrementado en las gestaciones múltiples¹, pero los procedimientos invasivos necesarios para obtener el diagnóstico citogenético comportan un mayor riesgo de pérdidas fetales². Es, por tanto, especialmente importante que las pruebas de cribado sean lo más sensibles y específicas posible en este tipo de gestaciones.

Los marcadores bioquímicos del segundo trimestre asociados a la edad materna permiten el cálculo de un seudorriesgo para la gestación que alberga dos fetos, pero tienen una validez limitada ya que obtienen una sensibilidad inferior al 50% para la detección de trisomía 21 y no identifican al feto afectado^{3,4}.

La medición de la translucencia nuchal (TN) a las 11-13⁶ semanas asociada a la edad materna tiene la ventaja de permitir el cálculo de un riesgo individual para cada feto y la identificación del feto afectado. En la gestación múltiple muestra una sensibilidad del 75-80%, similar a la que se obtiene en un feto único pero con un ligero incremento de falsos positivos⁶.

La distribución de los marcadores bioquímicos del primer trimestre (fracción beta libre de la gonadotropina coriónica [$\text{f}\beta\text{-hCG}$] y proteína plasmática A

asociada al embarazo [PAPP-A]) en la gestación gemelar se ha reportado en diversas series^{5,7} y no ha mostrado diferencias significativas entre gestaciones espontáneas y las procedentes de reproducción asistida⁸ ni respecto a la corionicidad⁹. La aplicación del test combinado en gestación gemelar no parece mejorar la sensibilidad del cribado ecográfico pero existen pocas series en la literatura científica con fetos afectados¹⁰. No obstante, añadir la bioquímica del primer trimestre parece disminuir los falsos positivos¹¹ de la medición de la TN y, por tanto, la necesidad de realizar un procedimiento invasivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio incluye a todas las pacientes con una gestación gemelar atendidas en el Hospital Clínic de Barcelona desde el inicio de la gestación y también a pacientes referidas a la unidad de diagnóstico prenatal durante el primer trimestre para el cribado de aneuploidia desde septiembre del 2001 hasta abril del 2005. Hasta mayo de 2003, el test combinado en la gestación gemelar no se utilizaba en la práctica clínica y el riesgo de aneuploidia se calculaba a efectos asistenciales únicamente mediante la medición de la TN. Tras comparar el resultado de los primeros 70 casos en un estudio de no intervención y observar que el test combinado reducía el número de falsos positivos¹¹, pasó a ser el cribado de elección también en la gestación gemelar en nuestro centro.

En todos los casos, entre las 8 y las 12 semanas se obtuvo sangre materna para la determinación de f β -hCG y PAPP-A (Delfia, PerkinElmer) y la ecografía se realizó entre las 11 y las 14 semanas. Durante la exploración se comprobó la viabilidad de los fetos, se midió la longitud cráneo-caudal (CRL) y la TN de cada feto siguiendo las recomendaciones de la Fetal Medicine Foundation¹². Se determinó siempre la corionicidad y se consideró gestación monocorial en presencia de una única placenta y ausencia del signo lambda¹³ y gestación dicorial en presencia de dos placentas o de una única placenta con signo lambda presente. La edad gestacional se estimó a partir del CRL del feto mayor. Los valores de f β -hCG y de PAPP-A se corrigieron por el factor próximo a 2 asociado a la presencia de gestación

gemelar establecido por Spencer¹⁰ y tanto estos valores como los de las TN se convirtieron a múltiplos de la mediana (MoM) para la edad gestacional correspondiente.

Para calcular el riesgo de cada gestación se utilizó el *software* Delfia (Delfia, Wallac, PerkinElmer). En las gestaciones dicoriales, asumiendo que eran dicigotas, se consideró un riesgo individual para cada feto (dos riesgos para cada gestación)^{6,10} calculado mediante la integración de la TN a la bioquímica y a la edad materna. En las gestaciones monocoriales, y por tanto monocigotas, el riesgo único de la gestación se calculó con la medida de la TN mayor. En todos los casos, un genetista clínico o el médico de referencia explicaron el resultado del cribado a la paciente. Se recomendó realizar un procedimiento invasivo, de preferencia una biopsia corial, cuando el riesgo estimado de aneuploidia para uno o ambos fetos era $\geq 1/250$. A pesar de un resultado de riesgo bajo, a las gestantes de 38 años o más también se les ofreció la posibilidad de realizar un diagnóstico invasivo, tal como recomienda el protocolo vigente de la Generalitat de Catalunya¹⁴. Los procedimientos invasivos fueron realizados en la unidad de diagnóstico prenatal. En las gestaciones dicoriales se obtuvieron siempre dos muestras. En las gestaciones monocoriales diamnióticas, cuando se realizó una amniocentesis se obtuvieron siempre dos muestras y en la biopsia corial se obtuvo, en general, una única muestra.

El resultado del cariotipo o del fenotipo de los recién nacidos se consiguió en todos los casos a partir de la historia clínica o mediante una llamada telefónica en aquellas pacientes que tuvieron el parto en otro centro.

Para comparar el valor de los marcadores bioquímicos y de la medición de la TN expresados en MoM se utilizó la prueba de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó mediante el *software* SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y se consideró significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS

La edad materna media de las 161 pacientes fue de 34,0 años (rango 23-43), con 64 gestantes (40%) con más de 34 años y 24 (15%) mayores de 37 años.

Goncé A et al. Cribado de aneuploidia en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado

580

Tabla 1. Descripción y resultado del cariotipo de las gestaciones con riesgo $\geq 1/250$

Caso	Edad materna	Corionicidad	TN MoM1	TN MoM2	β hCG MoM ^a	PAPP-A MoM ^a	Riesgo feto 1	Riesgo feto 2	Resultado feto 1	Resultado feto 2
1	37	MC-DA	8,75	1,75	0,83	0,25	1/10 ^b	1/10 ^b	47XY + 21	47XY + 21
2	36	DC-DA	0,98	1,95	0,93	0,80	1/4.800	1/100 ^b	46XY	47XY + 21
3	39	DC-DA	1,33	2,77	1,99	2,22	1/2.100	1/5 ^b	46XY	47XY + 21
4	29	DC-DA	4,22	0,7	1,85	0,54	1/5 ^b	1/2.400	45,X	46XY
5	38	DC-DA	1,44	1,44	1,12	0,17	1/15 ^b	1/15 ^b	46XY	46XY
6	40	MC-DA	3,89	0,99	0,69	0,26	1/5 ^b	1/290	46XY	46XY
7	43	DC-DA	0,92	0,31	3,12	0,85	1/80 ^b	1/40 ^b	46XY	46XY
8	39	MC-DA	1,43	1,04	2,88	2,42	1/140 ^b	1/400	46XY	46XY
9	39	DC-DA	1,78	0,94	1,42	0,73	1/170 ^b	1/4.700	46XY	46XY
10	31	DC-DA	0,96	2,05	0,51	0,45	1/10.000	1/180 ^b	46XY	46XY
11	39	DC-DA	1,39	1,18	1,33	0,66	1/190 ^b	1/410	46XY	46XY
12	33	DC-DA	1,48	1,89	2,38	2,31	1/1.200	1/200 ^b	46XY	46XY
13	39	DC-DA	1,00	1,13	1,48	0,48	1/330	1/230 ^b	46XY	46XY
14	42	DC-DA	1,75	1,20	0,97	1,75	1/230 ^b	1/850	46XY	46XY

^aMoM corregido para gestación gemelar según Spencer, 2000.^bFeto riesgo $\geq 1/250$.**Tabla 2. Índice de detección de trisomía 21 y falsos positivos (FP) aplicando el test combinado y considerando gestaciones y fetos**

Test combinado	Detección gestaciones	Detección fetos	FP gestaciones	FP fetos
TN + β -hCG + PAPP-A + edad materna	3/3	4/4	6,4% (10/156)	3,5% (11/315)

En 61 (48%) casos se trataba de una gestación espontánea y en 100 (62%) la gestación se había conseguido tras un tratamiento de reproducción asistida; 137 (85%) eran gestaciones dicoriales y 24 (15%) monocoriales. La edad gestacional media en el momento de la extracción de sangre para los marcadores bioquímicos fue de 11 semanas (rango 7,3-13,5) y de 12,5 semanas (rango 10,3-14,2) en el momento de la ecografía.

Se obtuvo un cribado con riesgo $\geq 1/250$ en 14 gestaciones (14/161: 8,7%) y 18 fetos (18/322: 5,6%). En este grupo se encontraban las 3 gestaciones y los 4 fetos afectados de trisomía 21. En 2 casos se trataba de una gestación dicorial con uno de los fetos afectados y las pacientes optaron por una finalización selectiva, con buena evolución del otro gemelo, y en el tercer caso se trataba de una gestación monocorial con ambos fetos afectados y la paciente solicitó una interrupción de la gestación. En el grupo de gestaciones de riesgo elevado se diagnosticó

también un feto afectado de monosomía X (síndrome de Turner) en una gestación dicorial. En la tabla 1 se muestra el resultado de estas 14 gestaciones de riesgo.

En 147 gestaciones (147/161: 91,3%) y 304 fetos (304/322: 94,4%) se obtuvo un cribado de riesgo bajo ($< 1/250$). Entre ellas había una gestación con ambos fetos afectados de síndrome de Klinefelter (47, XXY; 47, XXY). Se trataba de una gestación dicorial, probablemente monocigota y la paciente había solicitado una amniocentesis por tener 38 años de edad. En el seguimiento posnatal no se detectó ningún otro caso de aneuploidia. Por tanto, tal como se describe en la tabla 2, la sensibilidad del test combinado para la detección de trisomía 21 fue del 100% para un 6,4% de falsos positivos del global de gestaciones y un 3,5% de los fetos.

La mediana de los marcadores bioquímicos expresada en MoM, una vez excluidas las 5 gestaciones afectadas de aneuploidia y antes de aplicar el

Goncé A et al. Cribado de aneuploidia en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado

Tabla 3. Mediana de los marcadores en gestaciones dicoriales frente a monocoriales con fetos euploides

	DC n = 133	MC n = 23	p
Mediana fβ-hCG MoM	1,86	1,44	0,01
Mediana PAPP-A MoM	2,04	1,59	0,02
Mediana TN MoM (fetos)	1,00	0,92	0,07
	n = 266	n = 46	

Tabla 4. Mediana de los marcadores en gestaciones espontáneas frente a por reproducción asistida (TRA) con fetos euploides

	Espontáneas n = 58	TRA n = 98	p
Mediana fβ-hCG MoM	1,59	1,86	0,2
Mediana PAPP-A MoM	2,34	1,91	0,01
Mediana TN MoM (fetos)	0,99	0,98	0,2
	n = 116	n = 196	

factor de corrección para gestación gemelar, fue de 1,72 para la fβ-hCG y 2,01 para la PAPP-A. La mediana de la TN fue de 1,05 MoM. Cuando se comparó el valor de estos marcadores en función de la corionicidad, se observó que la mediana de todos ellos, tanto los bioquímicos como la TN, era mayor en las gestaciones dicoriales y esta diferencia alcanzaba valores significativos para los dos marcadores séricos: fβ-hCG: 1,86 frente a 1,44 MoM (p = 0,01), y PAPP-A: 2,04 frente a 1,59 MoM (p = 0,02) (tabla 3). Cuando se comparó entre gestaciones espontáneas y gestaciones procedentes de reproducción asistida, se observó que la mediana de la PAPP-A era significativamente menor en las gestaciones de reproducción

asistida (2,34 frente a 1,91 MoM; p = 0,01). Por el contrario, la fβ-hCG presentaba valores más elevados, pero sin alcanzar una diferencia significativa, y no se observaron diferencias en la medición de la TN (tabla 4).

Finalmente, se analizó el resultado de los marcadores bioquímicos y de la medición de la TN en las tres gestaciones con uno o ambos fetos afectados de trisomía 21 para valorar si su distribución era la esperable respecto a lo que se observa en las gestaciones únicas. La medición de la TN fue, en todos los casos, superior a 1,75 MoM (o superior al percentil 95). La distribución de la PAPP-A presentaba valores bajos en 2 gestaciones (0,46 y 1,48 MoM) y un valor muy elevado en la tercera. El valor de la fβ-hCG fue muy elevado en una de las gestaciones (4,18 MoM), pero presentó valores próximos a la normalidad en los otros 2 casos (1,74 y 1,95 MoM). En la tabla 5 se presentan estos valores antes de aplicar el factor de corrección asociado a gestación gemelar y se muestra el cálculo de riesgo para cada una de estas gestaciones.

DISCUSIÓN

En esta serie de 161 gestaciones gemelares, la aplicación del test combinado para el cribado de aneuploidia en el primer trimestre permitió la detección de todos los casos de trisomía 21 (3 gestaciones/4 fetos) para una tasa de falsos positivos del 6,4% de las gestaciones con uno o ambos fetos con un riesgo estimado $\geq 1/250$. La efectividad del cribado parece por tanto igual o incluso mejor que la utilización aislada de la medición de la TN, considerada el método de elección pero con una tasa de falsos positivos mayor en gestación múltiple, con un

Tabla 5. Mediana de los marcadores en las 3 gestaciones afectadas de trisomía 21

	Edad materna	EG bioquímica	fβ-hCG MoM	PAPP-A MoM	EG TN	TN MoM feto A/B	Riesgo T21 feto A/B
MC	37	9,2	1,74	0,46	12,3	8,75 (13 mm)	1/10
T21						1,75 (2,6 mm)	(1/20)
DC	36	11,1	1,95	1,48	12,6	1,95 (3 mm)	1/100
T21						0,98 (1,5 mm)	1/4.800
DC	39	9,6	4,18	4,13	12,1	2,77 (4 mm)	1/5
T21						1,33 (1,9 mm)	1/2.100

Goncé A et al. Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado

582

Tabla 6. Valores de la mediana de f β -hCG y PAPP-A reportados en la literatura científica en gestaciones gemelares con fetos euploides

Estudio	Gestaciones gemelares (n)	Mediana MoM f β -bCG	Mediana MoM PAPP-A
Spencer (2000)	159	2,10	1,86
Niemimaa et al (2002)	67	1,85	2,36
Orlandi et al (2002)	30 (TRA)*	1,72	1,61
Spencer et al (2003)	206	2,15	1,93
Bersinger et al (2003)	68		1,87
Mashiach et al (2004)	93	2,18	2,38
Serie actual	156	1,72	2,01

*TRA: técnica de reproducción asistida.

11% de gestaciones con alguno de los fetos con una TN > percentil 95, tal como describieron Sebire et al⁶ en una serie de 448 gestaciones gemelares. En un estudio previo realizado en nuestro centro se comparó la efectividad del cribado ecográfico y de la prueba combinada en 100 gestaciones gemelares y se observó que, al añadir los marcadores bioquímicos, se mantenía la sensibilidad del cribado ecográfico, pero mejoraba la especificidad y disminuían los falsos positivos del 14,3 al 5,1% de las gestaciones¹¹. Existen pocas series en la literatura científica que valoren la aplicación del test combinado en gestación gemelar. La más amplia, sobre 208 gestaciones, obtenía una detección del 75% para un 9% de falsos positivos, ligeramente superior al nuestro¹⁰. El incremento de la especificidad en la presente serie podría deberse a la aplicación del cribado en dos etapas y, por tanto, a una edad gestacional óptima, también para los marcadores bioquímicos (8-12 semanas), tal como fue demostrado previamente por nuestro grupo en gestaciones únicas¹⁵. La disminución de los falsos positivos y, por tanto, de la necesidad de realizar un procedimiento invasivo, es especialmente importante en las gestaciones múltiples con procedimientos más dificultosos y mayor riesgo de pérdida gestacional.

Mediante la aplicación del test combinado, la gestación con uno de los fetos afectados de síndrome de Turner también se detectó debido a que el feto presentaba una TN muy aumentada, marcador habitualmente presente en este tipo de aneuploidía. En cambio, los 2 fetos procedentes de la misma gestación y con síndrome de Klinefelter no fueron de-

tectados ya que en estos casos ni la medición de la TN ni los marcadores bioquímicos acostumbran estar alterados.

A partir de la utilización de cribados con elevada sensibilidad como la medición de la TN o el test combinado, la utilización de la edad materna como criterio aislado para indicar un procedimiento invasivo debería abandonarse definitivamente y tanto el International Down Síndrome Screening Group¹⁶ como la mayoría de los consensos internacionales ya no la consideran. Esto es especialmente importante en las gestaciones multifetales en las que la edad materna avanzada es muy frecuente. En esta serie, el 40% de las gestantes tenían 35 años o más y el 15% superaba los 37 años. Además, el 62% de las gestaciones procedían de tratamientos de reproducción asistida y ésta podía representar la última oportunidad genésica para las pacientes. Probablemente, debido al escaso número de gestaciones espontáneas (28%), el porcentaje de gestaciones monocoriales en esta serie era menor al esperado (el 15 frente al 20%).

En la serie estudiada, la distribución de los marcadores bioquímicos mostró algunas diferencias respecto a los valores referidos por Spencer et al⁵, sobre todo la f β -hCG, con una mediana que no alcanzaba los 2 MoM. En la tabla 6 se muestran las diferentes medianas no corregidas tanto para la f β -hCG como para la PAPP-A en las diferentes series publicadas de gestaciones gemelares del primer trimestre. Cada centro debería conocer la distribución de los propios marcadores de sus gestaciones gemelares con fetos euploides para aplicar este factor

de corrección al realizar el cálculo de riesgo de trisomía 21.

Se analizaron las diferencias de los marcadores bioquímicos en función de la corionicidad y del tipo de concepción espontánea o asistida, y se compararon con los resultados hallados en la literatura médica. Se observó que el valor de los marcadores séricos era significativamente menor en las gestaciones monocoriales, lo que podría atribuirse a la menor masa placentaria. Este resultado coincide con el de Spencer et al⁵, que también encontraron valores más bajos de PAPP-A en las gestaciones monocoriales, pero sin que la diferencia alcanzara valores significativos⁹. Wojdemann et al¹⁷ especularon que, debido a un mayor riesgo de preeclampsia y de restricción del crecimiento intrauterino en las gestaciones monocoriales, la PAPP-A debería encontrarse disminuida, tal como sucede en gestaciones únicas que posteriormente desarrollan esta complicación, pero estos autores no pudieron confirmar esta hipótesis en una serie de 31 gestaciones monocoriales y 150 dicoriales. Ninguna otra serie publicada confirma una disminución significativa de la $\text{f}\beta\text{-hCG}$ en las gestaciones monocoriales^{7,9,17} y curiosamente existe una serie muy amplia de gestaciones gemelares en Francia con valores de $\text{f}\beta\text{-hCG}$ significativamente incrementados en gestaciones monocoriales del segundo trimestre⁴.

La PAPP-A mostró valores significativamente menores en las gestaciones procedentes de reproducción asistida y esto coincide con el resultado de diferentes series en gestaciones únicas^{8,18,19}, aunque no se ha podido confirmar en otras series de gestaciones gemelares⁸. Por el contrario, hallamos valores de $\text{f}\beta\text{-hCG}$ más elevados en las gestaciones procedentes de tratamiento de fertilidad, pero la diferencia no alcanzaba valores significativos. Existe un estudio de gestaciones gemelares en el segundo trimestre que halló valores de $\text{f}\beta\text{-hCG}$ un 20% superiores en gestaciones procedentes de FIV²⁰, pero esta diferencia no se ha podido confirmar en el primer trimestre⁸.

Respecto a la medición de la TN, no se observó un incremento de ésta en los fetos procedentes de las gestaciones monocoriales, tal como ha sido descrito por Sebire et al^{21,22} en diversas publicaciones. En el seguimiento de los casos no se analizó específicamente la aparición del síndrome de transfusión feto-fetal, que sería la posible causa del incremento

de la TN en el primer trimestre en gestaciones monocoriales con cariotipo normal. Se trata además de una serie con pocas gestaciones monocoriales (24) comparada con la serie de Sebire et al²², con 132. Otros autores, no obstante, tampoco hallaban diferencias en la TN en función de la corionicidad^{9,23}. Tampoco se evidenciaron diferencias en la TN entre gestaciones espontáneas y las que provenían de tratamientos de fertilidad, lo que coincide con otras series de la literatura científica^{8,23}.

En relación con el valor de los marcadores en las gestaciones con trisomía 21, la medición de la TN se encontraba incrementada por encima del percentil 95 en todos los fetos afectados y esto permitió su identificación. En la gestación monocorial, en la que el riesgo global de la gestación fue calculado con la TN mayor, tal como marcaba nuestro protocolo, la medición media de las dos TN, tal como recomiendan algunos autores²¹, también hubiera permitido la identificación de la gestación (TN media de 5,25 MoM). Hallamos una sensibilidad de este marcador superior al 75% referido en la literatura científica^{12,5}, pero este resultado es atribuible al escaso número de fetos afectados en la presente serie. Los valores de $\text{f}\beta\text{-hCG}$ solamente se encontraban sustancialmente incrementados en una de las gestaciones dicoriales. En las otras dos gestaciones su valor era semejante al de las gestaciones no afectadas de trisomía 21 y, por tanto, su determinación aislada no hubiese permitido detectarlas. Noble et al²⁵, en la serie más amplia de gemelos afectados (12 gestaciones), concluyeron que la $\text{f}\beta\text{-hCG}$ no era un marcador útil para la predicción de trisomía 21 en las gestaciones gemelares. La producción de esta hormona podría ser menor que lo esperado en la gestación gemelar, tanto euploide como aneuploide, tal como refieren Niemimaa et al⁷, y constatamos también nosotros en esta serie. La PAPP-A podría representar un mejor marcador para la detección de la trisomía 21, tal como ocurre en las gestaciones únicas. En este estudio, la utilización aislada de este marcador hubiese permitido la identificación de dos de las tres gestaciones afectadas. Bersinger et al²⁶, en una serie de 9 gestaciones con algún feto afectado de trisomía 21, hallaron una disminución de los valores de PAPP-A respecto a gestaciones gemelares no afectadas, aunque la diferencia no era significativa. Nuestros resultados coinciden con la modelación estadística realizada por Spencer et al⁵ sobre la utilización aislada

584 de los marcadores bioquímicos del primer trimestre para el cálculo de riesgo de trisomía 21 en gestación gemelar, con una sensibilidad estimada del 50%.

Con la aplicación del test combinado en gestaciones gemelares se obtiene una elevada sensibilidad y una buena especificidad que permite reducir

los procedimientos invasivos innecesarios. La distribución de los marcadores bioquímicos muestra en esta serie algunas diferencias en función de la corionicidad y del antecedente de un tratamiento de reproducción asistida, pero estos resultados deberían confirmarse con un mayor número de casos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Neveux L, Palomaki G, Knight G, Haddow J. Multiple marker screening for Down Syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 1996;16: 29-34.
2. Yukobowich E, Anteby EY, Cohen SM, Yagel S. Risk of fetal loss in twin pregnancies undergoing second trimester amniocentesis. *Obstet Gynecol.* 2001;98:231-4.
3. Spencer K, Salonen R, Muller F. Down's syndrome screening in multiple pregnancies using alpha fetoprotein and free beta hCG. *Prenat Diagn.* 1994;14: 537-42.
4. Muller F, Dreux S, Dupoizat H, Uzan S, Dubin MF, Oury JF, et al. Second trimester Down syndrome maternal serum screening in twin pregnancies: impact of chorionicity. *Prenat Diagn.* 2003;23:331-5.
5. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free B-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn.* 2000;20:91-5.
6. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynecol.* 1996;103:999-1003.
7. Niemimaa M, Suonpaa M, Heinonen S, Seppala M, Bloigu R, Ryyanen M. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A in twin pregnancies in the first trimester. *Prenat Diagn.* 2002;22:183-5.
8. Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, et al. First trimester screening with free β -hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn.* 2002;22:718-21.
9. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: does chorionicity impact on maternal serum free β -hCG or PAPP-A levels? *Prenat Diagn.* 2001;21:715-7.
10. Spencer K, Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in one-stop clinic: a review of three years prospective experience. *Br J Obstet Gynecol.* 2003;110:281-6.
11. Gonc  A, Borrell A, Fortuny A, Casals E, Martínez MA, Mercadé I, et al. First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn.* 2005;25:1156-61.
12. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol.* 1994;101:782-6.
13. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. The lambda sign at 10-14 weeks gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996;7:421-3.
14. Protocol de seguiment de l'embaràs. 2.^a ed. revisada Generalitat de Catalunya, 2005.
15. Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farré MT, Gonc  A, Sánchez A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn.* 2004;24:541-5.
16. Ferguson Smith M, Arbuzova S, Benn P, Canick J, Cuckle H, Fortuny A, et al. Down Syndrome Screening. A position statement from the scientific committee of the International Down Syndrome Screening Group; 2004.
17. Wojdemann KR, Larsen SO, Shalmi AC, Tabor A, Christiansen M. Nuchal translucency measurements are highly correlated in both mono- and dichorionic twin pairs. *Prenat Diagn.* 2006;26:218-20.
18. Maymon R, Neeman O, Shulman A, Rosen H, Herman A. Current concepts of Down syndrome screening tests in ART twin pregnancies: another double trouble. *Prenat Diagn.* 2005;25:746-50.
19. Wah Hui P, Lam YH, Yin Tang MH, Ho PC. Maternal serum PAPP-A and β -hCG in pregnancies conceived with fresh and frozen-thawed embryos from in vitro fertilization and ICSI. *Prenat Diagn.* 2005;25:390-3.
20. R ty R, Antilla L, Virtanen A, Koskinen P, Laitinen P, M rsky P, et al. Maternal midtrimester serum AFP and free beta-hCG levels in in vitro fertilization twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 2000;20:221-3.

Goncé A et al. Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado

21. Sebire N, Nicolaides KH. Multiple pregnancy. En: The 11-136 weeks scan. London: Fetal Medicine Foundation; 2004. p. 95-112.
22. Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. Human Reproduction. 2000;15:2008-10.
23. Maymon R, Jauniaux E, Holmes A, Wiener YM, Drezzen E, Herman A. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome after assisted conception versus spontaneously conceived twins. Human Reproduction. 2001;16:1999-2004.
24. Vandecruys H, Faiola S, Auer M, Sebire N, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in mono chorionic twins by measurement of fetal NT thickness. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005;25:551-3.
25. Noble PL, Snijders RJ, Abrahams HD, Nicolaides KH. Maternal serum free beta-hCG at 10-14 weeks gestation in trisomic twin pregnancies. Br J Obstet Gynecol. 1997;104:741-3.
26. Bersinger NA, Noble P, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum PAPP-A, SP1 and M-CSF levels in normal and trisomic twin pregnancies. Prenat Diagn. 2003;23:157-62.

585

ESTUDI 2

“Prevalence and perinatal outcome of dichorionic and monochorionic twins with nuchal translucency above the 99th percentile and normal karyotype”

Anna Goncé, Antoni Borrell, Eva Méler, Marta Arigita, Josep M^a Martínez, Francesc Botet, Aurora Sánchez, Eduard Gratacós

Ultrasound Obstet Gynecol 2010; 35: 14-18 (January 2010)

Ultrasound Obstet Gynecol 2010; 35: 14–18
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/uog.7498

Prevalence and perinatal outcome of dichorionic and monochorionic twins with nuchal translucency above the 99th percentile and normal karyotype

A. GONCÉ*, A. BORRELL*, E. MELER*, M. ARIGITA*, J. M. MARTÍNEZ*, F. BOTET†, A. SÁNCHEZ‡ and E. GRATACÓS*

Departments of *Maternal-Fetal Medicine and †Neonatology, Institut Clinic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia and ‡Biomedical Diagnosis Centre, Hospital Clinic-IDIBAPS, University of Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

KEYWORDS: fetal abnormalities; increased nuchal translucency; multiple pregnancy; normal karyotype; twin–twin transfusion syndrome

ABSTRACT

Objective To evaluate the prevalence of and perinatal outcome associated with increased nuchal translucency thickness (NT) >99th percentile in dichorionic and monochorionic twins with normal karyotype.

Methods Two hundred and six consecutive twin pregnancies (166 dichorionic and 40 monochorionic) underwent an NT scan during a 4-year period. In those with NT >99th percentile and normal karyotype, we performed first- and second-trimester anomaly scans, fetal echocardiography at 14–16 and 20–22 weeks, maternal serology and, in monochorionic pregnancies, serial ultrasound examinations every other week. Perinatal outcome was recorded.

Results There were 10 (4.95%) pregnancies in which one of the fetuses had NT >99th percentile and normal karyotype, including five fetuses (1.5%) in dichorionic and five (6.25%) in monochorionic pregnancies. During the same period the prevalence of NT >99th percentile and normal karyotype in singleton pregnancies studied in our center was 2.6%. Among the 10 twins affected, six (60%) were diagnosed with structural abnormalities (three dichorionic and three monochorionic), and two intrauterine fetal demises occurred (one dichorionic and one monochorionic). Thus, the perinatal outcome was normal in only two of the pregnancies, one dichorionic and one monochorionic.

Conclusions The prevalence of NT >99th percentile in dichorionic twins with a normal karyotype is similar to that in singletons. In monochorionic twins we confirmed

previous studies reporting an increased prevalence compared with singletons. NT >99th percentile with a normal karyotype in twins was associated with a high rate of fetal abnormalities and/or fetal demise (overall 80%) irrespective of chorionicity. Copyright © 2009 ISUOG. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

INTRODUCTION

It is well known that when an increased nuchal translucency thickness (NT) is observed in the first trimester in chromosomally normal fetuses there is an increased risk for structural abnormalities, mainly cardiac, genetic syndromes and fetal loss¹. However, the prevalence and significance of increased NT in twin pregnancies has scarcely been investigated.

In monochorionic compared with dichorionic twin pregnancies, previous reports have described a higher prevalence of increased NT². Earlier reports suggested an association between increased NT (>95th percentile) in one fetus and subsequent development of twin–twin transfusion syndrome (TTTS)^{3,4}, but according to recent studies this association is controversial^{5,6}. In a recent series of monochorionic twins, a $\geq 20\%$ discordance in NT was found to increase the risk of subsequent fetal demise or severe TTTS to more than 30%⁷. The prevalence and the perinatal outcome of dichorionic twins with increased NT and normal karyotype has not yet been reported.

The aim of this study was to investigate prevalence and perinatal outcome of twin pregnancies in which one or

Correspondence to: Dr A. Gonc , Department of Maternal-Fetal Medicine, Institut Clinic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia, Hospital Clinic, University of Barcelona, Sabino de Arana 1, Barcelona 08028, Spain (e-mail: agonce@clinic.ub.es)

Accepted: 17 July 2009

both fetuses had an increased NT > 99th percentile and a normal karyotype.

METHODS

From October 2002 to September 2006, 206 consecutive first-trimester twin pregnancies with both fetuses alive at the 11 + 0 to 13 + 6-week scan were evaluated in our center, either for routine combined screening⁸ or referred due to an increased risk for chromosomal defects. All scans were performed by experienced sonographers certified by The Fetal Medicine Foundation in NT ultrasound, using high-resolution equipment (PowerVision 6000 (SSA-370), Toshiba Medical Systems; Acuson Aspen, Acuson Inc., Mountain View, CA, USA and Voluson 730 Expert, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Crown-rump length (CRL) was measured in each twin and NT was measured following The Fetal Medicine Foundation's guidelines⁹. Chorionicity was determined, the pregnancy being considered monochorionic in the presence of a single placenta and absent lambda sign, and dichorionic when the placentae were not adjacent or in a single placental plate and the lambda sign was present¹⁰. The intertwin discordance in CRL and NT was calculated as a percentage of the larger measurement: $(CRL1 - CRL2/CRL1 \times 100$ and $NT1 - NT2/NT1 \times 100$). As previously described⁸, chorionic villus sampling or amniocentesis for fetal karyotyping was offered if the estimated risk for Down syndrome in either fetus was $\geq 1/250$ calculated by NT screening or by the combined test, when there was a structural abnormality and when the maternal age was > 37 years.

The objective of the study was to evaluate the prevalence and outcome of pregnancies in which one or both fetuses had an NT > 99th percentile, according to our reference ranges at the 11–14-week scan¹¹, and a normal karyotype. These reference intervals were constructed following the methodology described by the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS)¹² and Royston and Wright recommendations¹³. According to our center guidelines and similarly to singleton pregnancies with increased NT and normal karyotype, these women attended a specific antenatal clinic for an extensive follow-up. Antenatal investigations included first-trimester anomaly scan, fetal echocardiography at 14–16 weeks and 20–22 weeks, anomaly scan at 20–22 weeks and maternal serology including toxoplasmosis, cytomegalovirus and parvovirus B19 (IgG and IgM). In monochorionic pregnancies, serial scans were scheduled every other week to rule out TTTS. Postnatal follow-up until 2 years of age was obtained for survivors.

Data regarding perinatal outcome from all pregnancies were ascertained from delivery room records or by phone enquiry if the pregnancy was not followed up and delivered in our center. Statistical analysis was performed using the software package SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). 95% CIs were calculated for means. Student's *t*-test was used for comparisons between continuous variables.

RESULTS

During the 4-year study period, 206 consecutive twin pregnancies were seen at our center (166 dichorionic and 40 monochorionic). In 12 of these, one of the pair of fetuses had NT > 99th percentile (Figure 1) and among them cytogenetic analysis revealed two unrelated dichorionic twins to have a chromosomal anomaly (Down syndrome and Turner syndrome). There were also two chromosomal anomalies diagnosed in the twins with NT \leq 99th percentile, leaving 10 of 202 (4.95%) pregnancies with normal karyotype in which one of the fetuses had NT > 99th percentile (five dichorionic and five monochorionic, including four diamniotic and one monoamniotic). In all of them, the NT in the cotwin was < 99th percentile, but in one cotwin the NT was moderately increased (between 95th and 99th percentiles). The prevalence of twin fetuses with NT > 99th percentile and normal karyotype in dichorionic pregnancies was thus 1.5% (5/324 fetuses; 95%CI, 0.2–2.9%) and in monochorionic pregnancies it was 6.25% (5/80 fetuses; 95% CI, 0.9–11.6%). The prevalence of NT > 99th percentile and normal karyotype in singleton pregnancies studied in our center in the same period was 2.6% (171/6666 fetuses; 95% CI, 2.2–2.9%).

Among twin pregnancies with NT > 99th percentile and normal karyotype, the mean maternal age was 33.4 (range, 27–39) years and the mean CRL was 60 (range, 45–84) mm. The pregnancy outcomes are shown in Table 1. An intertwin discordance of > 10% in CRL was observed in four (40%) of these pregnancies, all of which had a poor perinatal outcome; in three, the smaller twin was the one with an increased NT and in the fourth, the smaller twin had a normal NT but was affected by exencephaly. Among the 10 cases with increased NT, the mean measurement was 5.2 (range, 4.1–7.1) mm in monochorionic and 3.8 (range, 3.1–5.0) mm in dichorionic fetuses, the difference being statistically non-significant. In all 10 pregnancies, the intertwin NT discordance was > 20%.

Regarding fetal outcome among the 10 with increased NT, there were six (60%) with structural abnormalities (three dichorionic and three monochorionic), all diagnosed before 22 weeks' gestation (Table 1). In addition, there were two intrauterine fetal demises, one in dichorionic and one in monochorionic twins. There was a normal fetal outcome with normal postnatal follow-up up to 2 years of age in only two pregnancies, one dichorionic and one monochorionic.

TTTS complicated four of the 40 (10%) monochorionic pregnancies but in none of the fetuses was the NT > 99th or > 95th percentile.

DISCUSSION

This study provides evidence that the prevalence of increased NT in dichorionic twins (1.5%) is similar to that observed in singleton fetuses (2.6%), although both were above the 1% expected since the sample was

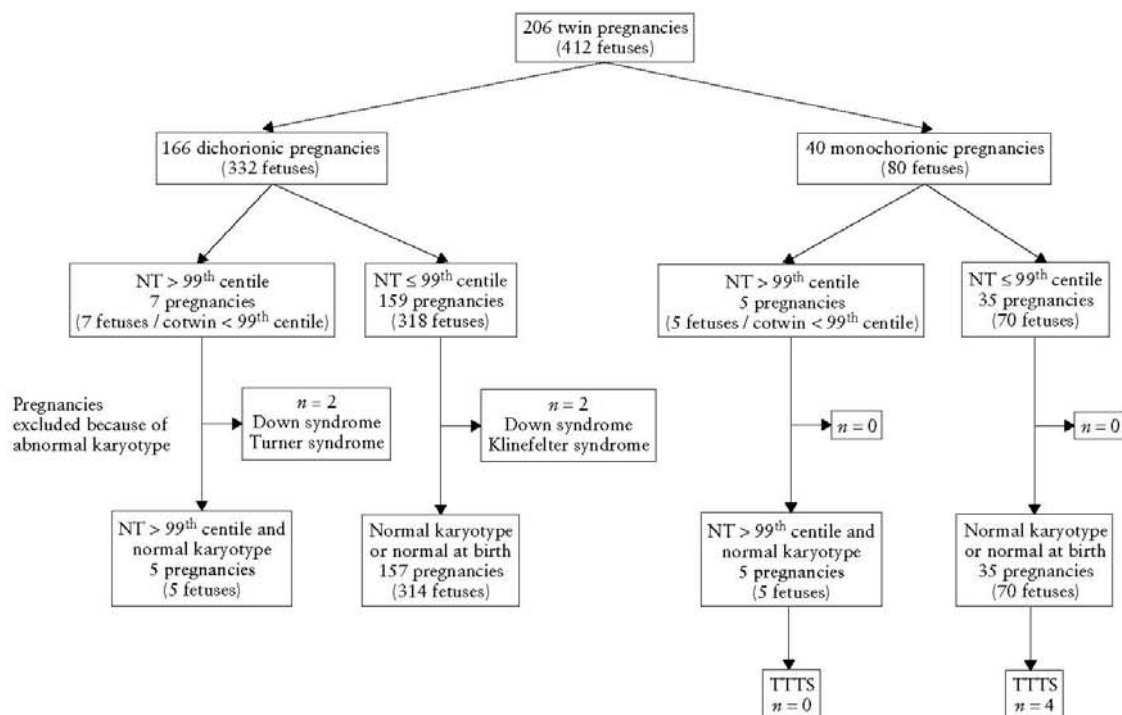


Figure 1 Flow chart summarizing the twin study population. NT, nuchal translucency; TTTS, twin-twin transfusion syndrome.

Table 1 Pregnancy data and outcome in dichorionic and monozygotic twin pregnancies with normal karyotype and one fetus with a nuchal translucency thickness > 99th percentile (Fetus 1)

MA (years)	GA (weeks)	Crown-rump length (CRL)			Nuchal translucency thickness (NT)			Fetal abnormalities	Outcome
		Fetus 1 (mm)	Fetus 2 (mm)	ΔCRL* (%)	Fetus 1 (mm)	Fetus 2 (mm)	ΔNT† (%)		
Dichorionic pregnancy									
27	14.0	84	80	5	5.0	2.4	52	Limb reduction & bilateral renal agenesis (both twins)	TOP
35	12.4	55	66	16	4.2	1.8	57	Fanconi anemia syndrome	Selective TOP
36	13.1	70	75	7	3.4	2.0	41	VSD	Birth 40 weeks, survived
35	12.2	49	61	20	3.1	2.1	32	None	IUD 17 weeks
34	12.2	61	58	5	3.2	2.3	28	None	Alive & well
Monozygotic pregnancy									
35	12.1	60	54	10	4.8	1.2	75	VACTERL association	Selective TOP, 20 weeks
30	12.0	47	57	17	7.1	1.8	74	Complex cardiac defect (truncus + AVSD), IUGR	Birth 36 weeks, intervention, survived
32	11.1	45	48	6	4.9	1.5	69	Unilateral renal agenesis, hemivertebrae, hypoplastic thumb	Birth 38 weeks, survived
39	12.2	61	49	19	5.1			(Selective cotwin TOP for exencephaly at 17 weeks)	IUD 35 weeks
31	13.0	71	66	7	4.1	2.9	29	None	Alive & well

*ΔCRL = CRL discordance as a percentage of the larger twin = $CRL1 - CRL2 / CRL1 \times 100$. †ΔNT = NT discordance as a percentage of the larger measurement = $NT1 - NT2 / NT1 \times 100$. AVSD, atrioventricular septal defect; GA, gestational age; IUD, intrauterine demise; IUGR, intrauterine growth restriction; MA, maternal age; TOP, termination of pregnancy; VSD, ventricular septal defect.

obtained from a tertiary referral center. In chromosomally normal dichorionic twins, increased NT is likely to be due to an underlying mechanism similar to that in a

singleton fetus, leading to a similar increased risk for adverse pregnancy outcome, although no specific data are available. However, in monozygotic twins, increased

NT may also be produced by hemodynamic imbalances between the fetuses through the vascular anastomoses, which may result in severe early onset of TTTS^{3,4}. Previous studies in singleton pregnancies have reported that an increased NT in a fetus with normal karyotype was associated with a poor pregnancy outcome, the chances of which increased exponentially with increasing NT thickness, from 8% when NT ranged between the 95th and 99th percentiles to 80–85% when the NT was above 6.5 mm^{1,14}. While establishing our reference ranges for NT, we found the 99th percentile not to be a fixed value, as has been described by other groups^{1,15}, but to increase, from 2.27 mm at 45 mm CRL to 3.78 mm at 84 mm¹¹.

In our series, twins with an NT > 99th percentile and normal karyotype had a 60% prevalence of fetal anomalies and a 20% risk of fetal demise, irrespective of chorionicity. Thus, although the relative rate of malformations is normally higher in monochorionic twins¹⁶, the presence of an NT > 99th percentile seems to represent a similarly increased risk for both monochorionic and dichorionic twins. It is well established that, compared with singleton pregnancies, structural malformations are more common in twin pregnancies, particularly monozygotic ones, in which each fetus has a two- to three-fold increased risk. This is basically due to the inherent risk of zygotic splitting and is also secondary to imbalances in placental sharing when the pregnancy is monochorionic^{16,17}. In the present study, there were three polymalformative disorders, including skeletal defects (two in a monochorionic and one in a dichorionic presumably monozygotic pregnancy because the cotwin showed the same defects) and two cardiac defects (one major abnormality in a monochorionic and one minor defect in a dichorionic fetus), also suggesting a higher rate of severe defects in monozygotic twins with increased NT.

It is well established that the rate of perinatal mortality in monochorionic twins is at least four-fold that in dichorionic ones, and this is likely to be due to the complications caused by placental vascular sharing¹⁸. The fetal demise of the dichorionic twin occurred at 17 weeks, concomitant with selective early growth delay, a condition already described in association with poor outcome^{19,20}. We found an intertwin CRL discordance > 10% in four pregnancies, and it was always associated with adverse fetal outcome (three severe fetal abnormalities and one fetal demise), in accordance with results from a previous study²¹. The fetal demise of the monochorionic twin occurred at 35 weeks in a pregnancy in which the exencephalic cotwin had been selectively terminated in the second trimester by cord occlusion. It has been shown that perinatal mortality is higher in monochorionic pregnancies in which at least one twin shows an NT > 95th percentile (30% vs. 7%)⁶ or when there is an intertwin NT discordance of > 20%⁷. In a recent series of 30 monochorionic pregnancies, poor perinatal outcome was observed in the five pregnancies in which one of the twins had an increased NT (> 95th percentile): one double fetal demise at 22 weeks, one case of TTTS and three

extremely preterm deliveries. Nevertheless, prematurity was the only factor that showed a significant correlation with NT thickness²².

Increased NT in chromosomally normal twins is considered to be more common in monochorionic than in dichorionic pregnancies. It has been suggested that this sign might constitute an early manifestation of TTTS^{3,4}, but this notion has been questioned in more recent studies^{5,6,22}. Therefore, it is suggested that this finding in a monochorionic twin should prompt a search for signs of TTTS. In the present study, NT > 99th percentile was four times more common among monochorionic compared with dichorionic twins (6.3% vs 1.5%), but this may have been due to the increased risk of structural defects in monozygotic twins rather than being an early sign of TTTS. Moreover, none of the four monochorionic pregnancies which developed TTTS showed an increased NT at the first-trimester scan. However, the small sample size prevented us from assessing the association between increased NT and TTTS.

In conclusion, this study provides prevalence rates for increased NT in multiple pregnancies, and suggests that twins with NT > 99th percentile and normal karyotype have a high rate of fetal structural anomalies and adverse perinatal outcome, irrespective of chorionicity.

ACKNOWLEDGMENTS

M. Arigita and E. Meler were supported by Hospital Clinic research grants.

REFERENCES

1. Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 1005–1021.
2. Sebire NJ, Sniijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; **103**: 999–1003.
3. Sebire NJ, D'Ercole CD, Hughes K, Carvalho M, Nicolaides KJ. Increased nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation as a predictor of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; **10**: 86–89.
4. Sebire NJ, Souza A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod* 2000; **15**: 2008–2010.
5. Sperling L, Kiil C, Larsen LU, Brocks V, Wojdemann KR, Qvist I, Schwartz M, Jorgensen C, Espersen G, Skajaa K, Bang J, Tabor A. Detection of chromosomal abnormalities, congenital abnormalities and transfusion syndrome in twins. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; **29**: 517–526.
6. El Kateb A, Nasr B, Nassar M, Bernard JP, Ville Y. First trimester ultrasound examination and the outcome of monochorionic twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2007; **27**: 922–925.
7. Kagan KO, Gazzoni A, Sepulveda-González G, Sotiriadis A, Nicolaides KH. Discordance in nuchal translucency thickness in the prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; **29**: 527–532.
8. Goncá A, Borrell A, Fortuny A, Casals E, Martínez MA, Mercadé I, Cararach V, Vanrell JA. First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn* 2005; **25**: 1156–1161.

9. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; **101**: 782–786.
10. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. The lambda sign at 10–14 weeks gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996; **7**: 421–423.
11. Borrell A, Quintó L, Fortuny A, Borobio V, Mercadé I, Goncè A, Vanrell JA. Translucencia nuchal y ductus venoso: valores de referencia en el primer trimestre de la gestación. *Prog Obstet Ginecol* 2006; **8**: 434–440.
12. NCCLS. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline*, 2nd edn (NCCLS C28-A2). National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA; 2000.
13. Royston P, Wright EM. A method for estimating age-specific reference intervals (“normal ranges”) based on fractional polynomials and exponential transformation. *J R Stat Soc Ser A* 1998; **161**: 79–101.
14. Bilardo CM, Müller MA, Pajkrt E, Clur SA, Van Zalen MM, Bijlsma EK. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; **30**: 11–18.
15. Souka AP, Krampfl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; **18**: 9–17.
16. Baldwin VJ. Anomalous development of twins. In *Pathology of Multiple Pregnancy*; Baldwin VJ (ed). Springer-Verlag: New York, 1994; 169–197.
17. Machin G, Bramforth F, Innes M, McNichol K. Some perinatal characteristics of monozygotic twins who are dichorionic. *Am J Med Genet* 1995; **55**: 71–76.
18. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; **104**: 1203–1207.
19. Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, Cuore DN, Rye PH, Matulich EM, Dickey MH. Incidence and significance of unequal gestational sac diameter or embryo crown-rump length in twin pregnancy. *Hum Reprod* 1992; **7**: 1170–1172.
20. Tai J, Grobman WA. The association of crown-rump length discordance in twin gestations with adverse perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2007; **197**: 369.e1–4.
21. Salomon LJ, Cavicchioni O, Bernard JP, Duyme M, Ville Y. Growth discrepancy in twins in the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; **26**: 512–516.
22. Casabuenas A, Wong AE, Sepúlveda W. Nuchal translucency thickness in monochorionic multiple pregnancies. Value in predicting pregnancy outcome. *J Ultrasound Med* 2008; **27**: 363–369.

V. DISCUSSIÓ GENERAL

En les gestacions gemel·lars és especialment important conèixer el risc d'aneuploidia i detectar els defectes congènits, ja que tant el risc de cromosomopatia en les gestacions dizigòtiques, com el risc de defectes estructurals en les gestacions monozigòtiques, estan incrementats en comparació amb les gestacions úniques. El Test Combinat ha demostrat ser un mètode de cribratge de trisomia 21 molt efectiu en les gestacions úniques, ja que amb la seva aplicació s'obté una sensibilitat i especificitat elevades. No obstant, en les gestacions gemel·lars, l'efectivitat del Test Combinat ha estat menys validada i només hi ha tres estudis d'aplicació clínica publicats a la literatura de parla anglesa, i un d'ells forma part d'aquesta tesi (Spencer & Nicolaidis, 2003; Goncé et al., 2005; Chasen et al., 2007). Secundàriament, una TN augmentada quan el cariotip és normal, és un marcador d'altres defectes congènits i de resultats desfavorables tant en les gestacions úniques com gemel·lars.

En el primer estudi d'aquesta tesi es van comparar els resultats obtinguts amb la mesura aïllada de la TN de cada un dels fetus, amb el Test Combinat que incorpora també els marcadors bioquímics de primer trimestre ($\text{f}\beta\text{-hCG}$ i PAPP-A). Els resultats obtinguts van mostrar que, en afegir-se la bioquímica de primer trimestre en el càlcul de risc de trisomia 21 es manté la sensibilitat del cribratge ecogràfic, però se'n millora l'especificitat. Així, la taxa de falsos positius va baixar del 14.3% al 5.1% de les gestacions, amb la consegüent reducció de procediments invasius innecessaris. Malgrat tot, aquestes diferències no van resultar significatives, probablement degut a la mida de la mostra. De totes maneres, a partir de la valoració dels resultats de les primeres 70 gestacions, el Test Combinat va esdevenir el mètode de cribratge d'elecció, també en les gestacions gemel·lars del nostre centre. Amb l'ampliació dels casos de Test Combinat inclosos **en l'annex al primer estudi**, es va mantenir una detecció de tots els casos de trisomia 21 (3 gestacions i 4 fetus), per una taxa de falsos positius del 6.4% de les gestacions.

En les gestacions gemel·lars, l'incorporació de la bioquímica materna a la mesura de la TN podria disminuir la sensibilitat del cribratge, ja que tal com s'ha vist en el segon trimestre, els marcadors sèrics que provenen del fetus sa podrien emmascarar els marcadors del fetus afecte (Muller et al., 2003). No obstant, això no ha estat observat en els estudis de modelització matemàtica (Spencer, 2000; Wald et al., 2003), ni en els estudis d'aplicació clínica del Test Combinat apareguts

a la literatura, inclòs el que forma part d'aquesta tesi. En un primer estudi, Spencer (2000) fent una modelització matemàtica, va estimar que l'incorporació de la bioquímica materna podria incrementar la taxa de detecció en un 5%, sense perdre cap dels beneficis de la TN (càlcul de risc individual i identificació del fetus afecte). Posteriorment, en l'únic estudi d'aplicació clínica aparegut abans de la publicació del primer article d'aquesta tesi, i que incloïa 206 gestacions gemel·lars amb 4 fetus afectes de trisomia 21, els mateixos autors van obtenir una detecció del 75%, la mateixa de la TN, per un 9% de gestacions falsament positives (Spencer & Nicolaides, 2003). Posteriorment, Chasen i cols (2007), van obtenir uns resultats molt semblants als nostres. Amb l'aplicació del Test Combinat en 519 gestacions gemel·lars amb seguiment complet, i amb un punt de tall de 1/300 per considerar alt risc, van identificar les 6 gestacions i 7 fetus amb trisomia 21, amb un 7% de falsos positius de les gestacions. En canvi, amb la valoració exclusiva de la TN, la taxa de falsos positius augmentava fins a un 11%. Mitjançant modelació, aquests autors van trobar que el Test Combinat incrementava la detecció del 83 al 100%, fixant en un 5% els falsos positius.

La millora de l'especificitat del Test Combinat en el present estudi i també en l'estudi de Chasen i cols (2007) respecte a l'estudi de Spencer i Nicolaides (2003), podria ser deguda a l'aplicació del cribratge en dos temps i per tant en una edat gestacional òptima també pels marcadors bioquímics (8-12 setmanes), tal com s'ha mostrat en les gestacions úniques (Borrell et al., 2004). S'ha vist que la distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre presenta algunes diferències en les sèries de gestacions gemel·lars euploides publicades a la literatura (Spencer, 2000; Niemimaa et al., 2002; Orlandi et al., 2002; Spencer et al., 2003; Bersinger et al., 2003; Mashiach et al., 2004; Wojdemann et al., 2006). Idealment, cada centre amb un nombre suficient de gestacions gemel·lars, hauria de calcular el risc d'aneuploidia aplicant els propis factors de correcció. Nosaltres en el primer estudi vam recalculer el risc de trisomia 21 mitjançant l'aplicació dels nostres factors de correcció extrets de la distribució de $f\beta$ -hCG (1.57 MoM) i de PAPP-A (1.96 MoM) de les nostres gestants, en comptes d'aplicar els factors establerts per Spencer (2000). Aplicant aquests nous factors de correcció es van incrementar els falsos positius fins al 8.2% de les gestacions, però probablement la sèrie és encara massa limitada per poder-ne extreure conclusions. Amb el nombre de casos ampliat en l'estudi annex no vam realitzar aquest nou càlcul, però

probablement haurien disminuït els falsos positius ja que la mediana de la f β -hCG (1.72 MoM) obtinguda amb un nombre més elevat de gestacions (156) no presentava uns valors tan baixos.

L'aplicació del Test Combinat amb els casos ampliats, també va permetre la detecció de la gestació amb un dels fetus amb síndrome de Turner. Aquest fetus presentava una TN superior al percentil 99, tal com es troba en més del 75% dels fetus afectes d'aquesta aneuploïdia (Nicolaidis et al., 1999). En canvi, els 2 bessons amb una síndrome de Klinefelter procedents d'una mateixa gestació, no van ser identificats prenatalment, degut a que en aquest tipus d'aneuploïdia, ni la TN ni els marcadors bioquímics acostumen a estar alterats.

Les gestacions gemel·lars i múltiples es presenten en una edat materna més avançada i això condiona un major risc d'aneuploïdia (Neveux et al., 1996). En els primer estudis d'aquesta tesi, prop del 40% de les gestants tenien més de 34 anys i el 15% més de 37. La consideració de l'edat materna com a criteri únic per indicar un cariotip fetal, tal com recomanava el Protocol de Seguiment de l'Embaràs a Catalunya en aquell moment (Generalitat de Catalunya 1998 i 2005), ens va portar a realitzar un 25% de procediments invasius, malgrat la nostra oferta d'un cribratge d'elevada sensibilitat. El grup d'experts de la "International Down Syndrome Screening Group" (Ferguson Smith et al., 2004) ja va recomanar a l'any 2004 que es deixés de considerar l'edat materna aïllada com a indicació de procediment invasiu. La reducció dels procediments invasius és especialment rellevant en les gestacions múltiples, on la necessitat d'obtenir més d'una mostra fa que el procediment sigui més complex i que presenti un risc incrementat de pèrdues fetals (Casals et al., 2002) L'últim protocol actualitzat de diagnòstic prenatal de la Generalitat de Catalunya (2008) ha abolit definitivament l'edat materna com a únic criteri per aconsellar un procediment invasiu.

En les gestacions dicorials, considerades dizigòtiques ja que en la seva majoria (80-90%) ho són, a cada fetus se li calcula un risc independent d'aneuploïdia, a partir de la mesura de la TN combinada amb la bioquímica materna corregida per la presència de bessons. En aquest estudi, tant quan es va aplicar la TN aïllada com en el Test Combinat, es van calcular dos riscos per a cada gestació, tal com havien proposat Spencer (2000) i Spencer i Nicolaidis (2003). Altres autors en

canvi, consideren que l'estratègia correcta en gestacions gemel·lars requereix el càlcul d'un únic risc específic per a la gestació, en comptes d'un risc per cada fetus. Però a efectes pràctics, hi ha poques diferències entre aquests dos sistemes de càlcul. Wald i cols (2003) proposen calcular primer un risc específic per cada fetus en funció de la seva TN i dividir-lo per dos (considerant que cada bessó té la meitat de risc de trisomia 21 que un fetus únic), sumar els dos riscos fetals i incorporar-hi la bioquímica materna. Chasen i cols (2007) calculen un risc independent per cada fetus en funció de la seva TN, però donen un resultat únic de risc gestacional basat en el bessó amb més risc. En el nostre estudi hem calculat dos riscos, però la indicació del procediment invasiu es feia sempre que un dels dos fetus presentés un risc $> 1/250$.

En les gestacions monocorials i per tant monozigòtiques, s'ha de tenir en compte que els dos fetus presenten el mateix risc d'aneuploïdia i en conseqüència la gestació ha de tenir un únic risc. Quan les TN són diferents, no queda clar si el risc s'ha de calcular amb la TN superior, la inferior o la mitjana de les dues (Nicolaidis, 1999; Zoppi, 2009). Una TN augmentada és més freqüent en els fetus euploides procedents d'una gestació monocorial (Sebire et al., 1996; Zoppi, 2009) i el càlcul de risc fet a partir de la TN major pot portar a un increment de falsos positius. Vandecruys i cols, (2005) van mostrar que el cribratge més efectiu s'obtingria fent servir la mitjana de les dues TN, ja que la detecció d'aneuploïdia era la mateixa que amb la superior però disminuïen els falsos positius, tot i que la diferència no era estadísticament significativa. En l'estudi que compona aquest treball es va fer servir la TN superior, per evitar una disminució de la sensibilitat del cribratge. Els resultats confirmen les dades de Vandecruys i cols. (2005) ja que tant amb l'aplicació de la TN superior com amb la mitjana, s'hauria pogut identificar l'única gestació monocorial afecta de trisomia 21 (8.75 MoMs i 5.25 MoMs respectivament). En canvi, la TN menor es trobava per sota del percentil 95 (2.6 mm a les 12 setmanes de gestació). Amb l'aplicació de la TN mitjana, s'hauria evitat un dels dos falsos positius obtinguts en el grup de gestacions monocorials.

La mediana de la TN en els fetus euploides no va ser més gran en els bessons procedents de les gestacions monocorials que dicorials, tal com s'havia descrit en altres estudis (Sebire et al., 1997; 2000). Sorprenentment, en el primer estudi, la mediana de la TN va ser menor en els bessons monocorials, però aquest resultat

és atribuïble a la mida de la mostra, ja que no es va confirmar amb l'ampliació de casos. Altres estudis tampoc han trobat diferències en la TN entre gestacions monocorials i dicorials (Maymon et al., 2001; Linskens et al 2009). En canvi, el segon estudi d'aquest treball va posar de manifest que la presència d'una TN extrema (superior al percentil 99) en un fetus amb cariotip normal, és més prevalent en les gestacions monocorials (6.3%) que en les gestacions dicorials (1.5%) o úniques (2.6%).

La mediana dels marcadors sèrics materns (β -hCG i PAPP-A) en les gestacions gemel·lars euploides, és esperable que sigui aproximadament del doble que la trobada en les gestacions úniques, però hi ha un cert grau de variabilitat en les diferents sèries publicades (Spencer, 2000; Niemimaa et al., 2002; Orlandi et al., 2002; Spencer et al., 2003; Bersinger et al., 2003; Mashiach et al., 2004; Wojdemann et al., 2006). En una revisió sistemàtica recent, es va obtenir una mediana de 2.01 MoM per a la β -hCG (2356 gestacions) i de 2.07 MoM per a la PAPP-A (2238 gestacions) (Spencer et al., 2008). Tant en el primer estudi d'aquesta tesi com amb l'ampliació de casos de l'estudi annex, la mediana de la PAPP-A (1.96 MoMs i 2.01 MoMs) es trobava pròxima a 2. En canvi, la distribució de la β -hCG en les primeres 100 gestacions va ser molt més baixa del que era esperable i del que s'havia trobat en la resta de sèries (1.57 MoMs). Amb l'ampliació a 161 gestacions, la distribució de la β -hCG tampoc arribava als 2 MoMs però el seu valor (1.72 MoMs) s'aproximava més al d'altres sèries com la de Niemimaa i cols, (2002); Orlandi i cols, (2002) i Sahota i cols, (2009) (1.85, 1.72 i 1.77 MoMs respectivament). Aquests valors més disminuïts de β -hCG en la nostra població poden ser deguts a que realitzem el cribratge combinat en dos temps, amb obtenció de la bioquímica en una edat gestacional més precoç (11.0 setmanes de mitjana en els nostres estudis vs. 12.1 en l'estudi de Spencer i Nicolaides, (2003)). Hi ha un estudi en gestacions gemel·lars obtingudes per FIV que va trobar una correlació positiva entre els valors de β -hCG i l'edat gestacional, però aquesta correlació no va poder ser demostrada en les gestacions espontànies (Orlandi et al., 2002). En el nostre estudi, més del 50% de les gestacions procedien de RMA però no es van trobar diferències en els valors de β -hCG, entre gestacions espontànies i les que procedien de RMA.

Els valors de $f\beta$ -hCG només es trobaven francament incrementats en una de les gestacions dicorials afectes de trisomia 21. En les altres dues (una gestació dicorial i una monocorial), la $f\beta$ -hCG tenia un valor similar al de les gestacions no afectes i no arribava als 2 MoMs. Noble i cols., (1997) en la sèrie més àmplia publicada de bessons amb trisomia 21 (10 casos discordants i 2 concordants), van trobar que només en un cas la $f\beta$ -hCG es trobava per sobre del percentil 95, i van concloure que en les gestacions gemel·lars no era un marcador útil per a la predicció de trisomia 21. Chasen i cols (2007) també van confirmar aquesta troballa en una sèrie de 6 gestacions amb un o ambdós fetus afectes de trisomia 21. Sembla que la producció d'aquesta hormona és més baixa del que és esperable, tant en les gestacions gemel·lars euploides, com en les que tenen algun fetus afecte de trisomia 21 (Niemimaa et al., 2002; Chasen et al., 2007). En canvi, uns valors de PAPP-A disminuïts semblen representar un millor marcador de trisomia 21, de manera similar a les gestacions úniques, i fins i tot en les gestacions gemel·lars amb aneuploidia discordant. En el nostre estudi, en dos dels tres casos, la PAPP-A es trobava amb valors inferiors del que era esperable, sobretot en la gestació monocorial (0.46 MoMs). Bersinger i cols., (2003), en una sèrie de 9 gestacions amb algun dels fetus amb trisomia 21 (6 discordants i 3 concordants), van trobar també uns valors més baixos de PAPP-A que en les gestacions euploides en 8 dels 9 casos, disminució que era més remarcable en els casos de trisomia concordant.

Pel que fa a la TN, totes les gestacions amb trisomia 21 van poder ser identificades amb aquest marcador, tots dos bessons dicorials presentaven una TN superior al percentil 95, així com la mitjana de les dues TN en la gestació monocorial. No obstant, l'elevada sensibilitat obtinguda amb aquest marcador ecogràfic (100%), és atribuïble a l'escàs nombre de casos.

La comparació de les distribucions dels marcadors bioquímics dividint les gestacions gemel·lars euploides en 2 grups segons fossin monocorials o dicorials, presenta resultats discrepants entre el primer estudi i l'ampliació de casos en l'estudi annex, però això és atribuïble a l'escàs nombre de gestacions monocorials incloses en el primer estudi. Les distribucions de la $f\beta$ -hCG i de la PAPP-A dels subgrups de les gestacions monocorials i dicorials obtingudes en les 156 gestacions gemel·lars de la sèrie ampliada, s'apropen més amb el que ha estat descrit posteriorment a la literatura.

El fet que el valor dels dos marcadors sèrics sigui significativament inferior en les gestacions monocorials (PAPP-A: 1.59 vs. 2.04 MoMs i f β -hCG: 1.44 vs. 1.86 MoMs) podria ser atribuïble a l'existència d'una menor massa placentària en les placentes úniques. Spencer (2001), en un primer estudi, també va trobar uns valors de PAPP-A més baixos en les gestacions monocorials, però la diferència no era significativa. Posteriorment, ha confirmat aquest resultat en una sèrie de 190 gestacions monocorials i 1024 dicorials. Aquest autor conclou que en les gestacions monocorials, els valors de la PAPP-A han de ser ajustats amb un factor de correcció més baix (1.8 vs 2.2) a l'hora de fer el càlcul de risc de trisomia 21, per evitar un increment de la taxa de falsos positius (Spencer et al., 2008). Sahota i cols (2009) i Linskens i cols (2009) han confirmat també aquest resultat (1.67 MoMs en monocorials vs. 2.13 MoMs en dicorials i 1.59 MoMs vs. 2.40 MoMs, respectivament) encara que estudis previs no ho havien evidenciat (Niemimaa et al., 2002; Wojdemann et al., 2006). Wojdemann i cols (2006) van suggerir que un valor més baix de PAPP-A en les gestacions monocorials, podria estar relacionat amb el risc incrementat de preeclàmpsia i de RCIU que presenten aquestes gestacions. No obstant, aquesta hipòtesi no va poder ser confirmada en el seu propi estudi

En l'estudi de Spencer i cols (2008), els valors de la f β -hCG també eren lleugerament inferiors en les gestacions monocorials, però la diferència no era significativa. Linskens i cols (2009) en canvi, van trobar com en el nostre estudi, uns valors significativament més baixos de f β -hCG en les gestacions monocorials, però en fer una anàlisi estratificada en funció de l'edat gestacional, van evidenciar que aquesta disminució només afectava les mostres obtingudes abans de les 12 setmanes. Aquest resultat corrobora les dades del nostre estudi, on el cribratge bioquímic es fa a una edat gestacional més precoç que en l'estudi de Spencer i cols (2008). A més a més, hi ha un estudi de segon trimestre que va trobar els valors de f β -hCG significativament incrementats en les gestacions monocorials respecte a les dicorials (Muller et al., 2003).

La PAPP-A ha mostrat valors inferiors en les gestacions procedents de RMA i amb l'ampliació de casos, aquesta diferència ha assolit significació estadística. Aquest resultat coincideix amb diversos estudis realitzats en gestacions de fetus únic (Liao et al., 2001; Kagan et al., 2008; Gjerris et al., 2009; Amor et al., 2009), però no

havia estat mai observat en gestacions gemel·lars (Orlandi et al., 2002). En una sèrie recent, Linskens i cols (2009) també han obtingut valors més baixos de PAPP-A i més elevats de β -hCG en les gestacions gemel·lars procedents de FIV, però la diferència no era significativa. En el nostre estudi, els valors de la β -hCG encara que també es troben lleugerament incrementats en les gestacions procedents de RMA, no van assolir una diferència significativa. Aquest resultat coincideix amb la majoria d'estudis en gestacions de fetus únics i amb un altre estudi publicat en bessons (Orlandi et al., 2002). Tampoc hem trobat diferències en la mesura de la TN en funció del tipus de reproducció, i en això coincidim amb dos estudis més fets en bessons (Maymon et al., 2005; Hui et al., 2006). Orlandi i cols (2002) en canvi, van observar una reducció significativa de la TN en les gestacions gemel·lars procedents de FIV respecte al grup control, però no van observar aquesta diferència en les gestacions úniques.

Com a conclusió d'aquest primer estudi, es podria afirmar en primer lloc que el Test Combinat sembla ser més efectiu que el cribratge exclusiu mitjançant la mesura de la TN, ja que manté la taxa de detecció i la possibilitat d'identificar al fetus de risc, però redueix la taxa de falsos positius i per tant els procediments invasius innecessaris. En segon lloc, i en coincidència amb altres estudis recents, la PAPP-A presenta una disminució significativa en les gestacions monocorials i semblaria necessari aplicar aquest factor de correcció diferent a l'hora de fer el càlcul de risc per disminuir els falsos positius. Finalment, la disminució de la β -hCG observada en les gestacions monocorials i la disminució de la PAPP-A en les gestacions procedents de RMA, hauria de ser confirmada amb un major nombre de casos.

En el **segon treball d'aquesta tesi**, es va avaluar la prevalença i el resultat perinatal associat amb una TN superior al percentil 99 en els bessons amb un cariotip normal. L'estudi va posar de manifest que la prevalença d'una TN molt augmentada en els fetus procedents d'una gestació dicorial amb cariotip normal (1.5%) és semblant a la prevalença observada en els fetus únics (2.6%), però degut a que l'estudi s'ha realitzat en un centre terciari de referència, en ambdós casos ha resultat superior a l'1% esperable. En canvi, en els fetus amb cariotip normal que procedien d'una gestació monocorial, una TN superior al percentil 99 ha resultat ser 4 vegades més freqüent, en coincidència amb el resultat d'altres

estudis (Sebire et al., 1996; Monni et al., 2000; Sepúlveda et al., 2009)(6.3%). En els bessons dicorials, una TN augmentada és probablement conseqüència d'un mecanisme fisiopatològic semblant al d'una gestació única i s'associa probablement al mateix risc de resultats perinatals adversos, però no hi havia dades prèvies a la literatura. En les gestacions monocorials, en canvi, una TN augmentada podria ser deguda també a un desbalanç hemodinàmic produït per les anastomosis vasculars existents entre la circulació dels dos fetus.

Estudis previs en gestacions úniques havien evidenciat que una TN augmentada amb cariotip normal s'associava a mort fetal, defectes estructurals sobretot cardíacs, i síndromes gèniques. El risc d'un resultat advers augmenta de forma exponencial amb l'increment de la TN, d'un 8% quan la TN es troba entre el percentil 95 i 99, fins a 80-85% quan es troba per sobre de 6.5 mm (Souka et al., 2005; Bilardo et al., 2007). En el nostre estudi vam decidir definir una TN augmentada quan superés el percentil 99, perquè aquest és el punt de tall utilitzat en la pràctica clínica per a indicar un seguiment exhaustiu en els fetus únics. Prèviament havíem establert els intervals de referència de la TN, i es va trobar que una TN superior al percentil 99 no corresponia a un punt de tall fix com havien descrit altres grups (Souka et al., 2001; Senat et al., 2002) sinó que el percentil 99 presentava un increment a mesura que augmentava la LCC, des de 2.27 mm per una LCC de 45 mm fins a 3.78 mm per una LCC de 84 mm (Borrell et al., 2006).

En la nostra sèrie, els bessons amb una TN superior al percentil 99 amb cariotip normal van presentar una freqüència del 60% de defectes estructurals i un risc del 20% de mort intrauterina, independentment de la corionicitat. Així, malgrat que se sap que el risc relatiu de malformacions es troba incrementat en els bessons monocorials (Baldwin, 1994), la presència d'una TN superior al percentil 99 semblaria estar associada a un risc similarment elevat de defectes congènits, tant en els bessons monocorials com dicorials. Està ben establert que en comparació amb les gestacions úniques, en les gestacions gemel·lars les malformacions estructurals són més freqüents, particularment en les gestacions monozigòtiques, on cada fetus té un risc de malformacions augmentat dos a tres vegades. Aquest increment podria estar relacionat amb els mateixos factors responsables de la divisió zigòtica i amb una alteració en la blastogènesi (Schinzel et al., 1979;

Petrikovsky, 1999). En aquest estudi es van trobar tres fetus amb malformacions múltiples que incloïen defectes esquelètics (dos en una gestació monocorial i un en una gestació dicorial, probablement monozigòtica ja que l'altre fetus amb una TN normal presentava les mateixes malformacions). Hi havia també dos casos de defectes cardíacs (una malformació complexa en un fetus procedent d'una gestació monocorial i un defecte menor en un bessó dicorial). El sisè cas corresponia a una síndrome d'anèmia de Fanconi (malaltia autosòmica recessiva), en una gestació dicorial. Aquests resultats, doncs, també suggereixen una taxa incrementada de defectes severes en els bessons monozigòtics amb una TN superior al percentil 99.

És conegut que la mortalitat perinatal és al menys 4 vegades superior en els bessons monocorials que en els dicorials, probablement degut a les complicacions relacionades amb una circulació placentària compartida (Sebire et al., 1997a). En el present estudi es van produir dues morts fetals intraúter en els fetus amb una TN superior al percentil 99 amb cariotip normal, una en una gestació dicorial i l'altre en una monocorial. L'òbit del bessó dicorial es va esdevenir a les 17 setmanes en un fetus amb una RCIU selectiva precoç concomitant, condició que també comporta un resultat obstètric desfavorable (Salomon et al., 2005; Tai et al., 2007). La mort del fetus monocorial va succeir a les 35 setmanes en una gestació on prèviament s'havia realitzat un feticidi selectiu per oclusió de cordó en el segon trimestre en l'altre bessó, afecte d'una exencefàlia. S'ha vist que la mortalitat perinatal és més elevada en les gestacions monocorials amb un dels fetus amb una TN superior al percentil 95 (30% vs 7%) (El Kateb et al., 2007) o quan la discordança de la mesura de la TN és superior al 20% (Kagan et al., 2007). En una sèrie recent de 30 gestacions monocorials es va evidenciar un resultat desfavorable en els 5 casos on un dels bessons presentava una TN augmentada (superior al percentil 95): un òbit fetal doble a les 22 setmanes, una STFF i tres casos de part prematur extrem. Malgrat tot, la prematuritat va ser l'únic factor que va mostrar una correlació significativa amb l'increment de la TN (Casasbuenas et al., 2008).

Fa uns anys es va considerar que una TN augmentada es troba més sovint en els bessons monocorials euploides que en els dicorials, i que aquest fet representava una manifestació precoç d'una STFF (Sebire et al., 1997b, 2000). Aquesta troballa, no obstant, no ha estat confirmada en estudis posteriors (Sperling et al., 2007; El

Kateb et al., 2007). L'estudi que aquí es presenta mostra que una TN superior al percentil 99 és 4 vegades més freqüent en els bessons monocorials que en els dicorials, però aquesta diferència seria més aviat atribuïble a una prevalença incrementada de defectes estructurals en els bessons monozigòtics, més que a un signe inicial de STFF. En cap dels fetus procedents de les gestacions monocorials que van desenvolupar una STFF es va trobar una TN superior al percentil 95, però l'escàs nombre de casos d'aquesta sèrie no permet descartar totalment aquesta associació.

Malgrat que la freqüència de defectes estructurals i de morts fetals era la mateixa en les gestacions monocorials i dicorials, la mitjana de la TN era superior en el grup de bessons monocorials (5.2 mm vs 3.8 mm), però la diferència no era significativa. Aquesta tendència podria reflectir la major severitat dels defectes observada en els bessons monocorials i també els factors hemodinàmics característics d'aquestes gestacions.

Per concloure, aquest estudi aporta dades sobre la prevalença d'una TN superior al percentil 99 en fetus amb cariotip normal procedents d'una gestació gemel·lar, la qual es troba augmentada en els monocorials en relació als dicorials, però un cop detectada aquesta condició, els bessons presenten un risc similarment elevat d'anomalies estructurals i de mort fetal, independentment de la corionicitat.

VI. CONCLUSIONS

1. El Test Combinat aplicat a les gestacions gemel·lars es mostra com un mètode de cribratge d'aneuploïdia millor que la utilització de la TN amb l'edat materna, ja que manté la sensibilitat de la TN i aporta una reducció en la taxa de falsos positius (de 14.3% a 6.4%) i per tant de procediments invasius innecessaris i de pèrdues fetals.
2. La distribució dels marcadors bioquímics de primer trimestre en la nostra població de gestants amb bessons euploides, mostra uns valors disminuïts de f β -hCG (1.72 MoM) en relació a la majoria de sèries de la literatura, que podria ser atribuïble a l'edat gestacional més precoç en que es determinen els marcadors bioquímics en el nostre centre. L'aplicació dels nostres propis factors de correcció podria disminuir l'efecte de minva en la taxa de falsos positius que aporta l'aplicació del Test Combinat fent servir els factors de correcció referits a la literatura.
3. Les gestacions gemel·lars monocorials presenten uns valors significativament menors de PAPP-A (1.59 vs 2.04 MoM) i de f β -hCG (1.44 vs 1.86 MoM) en relació a les gestacions dicorials. Les gestacions procedents de reproducció mèdicament assistida mostren uns valors significativament menors de PAPP-A (1.91 vs 2.34 MoM) i una tendència a presentar valors més elevats de f β -hCG en relació a les gestacions espontànies.
4. La mesura de la TN no mostra diferències significatives entre gestacions monocorials i dicorials, ni entre gestacions espontànies i gestacions obtingudes a partir de reproducció mèdicament assistida.
5. La freqüència d'una TN extrema, superior al percentil 99, és tres vegades superior en els fetus procedents d'una gestació monocorial (6.25%), en relació als bessons dicorials (1.5%) i als fetus únics (2.6%).
6. Una TN superior al percentil 99 present en un bessó amb cariotip normal sembla anar associada a un risc elevat de defectes estructurals fetals (60%) i de resultat perinatal advers (20%), independentment de la corionicitat.

7. L'aparició d'una STFF en les gestacions monocorials no sembla anar precedida per una TN augmentada en el primer trimestre, però l'escàs nombre de casos no permet tampoc descartar aquesta associació .

VII. BIBLIOGRAFIA

ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists (2007). *Obstet Gynecol*; 109: 217-227

Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I et al. 2009. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod* ; 34 (6): 1330-1338

Bahtiyar MO, Dulay AT, Weeks BP, Friedman AH, Copel JA. 2007. Prevalence of congenital heart defects in monochorionic/diamniotic twin gestations: a systematic literature review. *J Ultrasound Med*; 26: 1491-1498

Bajoria R, Wee LY, Anwar S, Ward S. 1999. Outcome of twin pregnancies complicated by single uterine death in relation to vascular anatomy of the monochorionic placenta. *Hum Reprod*; 14 (8): 2124-2130

Baldwin VJ. Anomalous development of twins. In Baldwin VJ, ed *Pathology of Multiple Pregnancy*. New York: Springer-Verlag, 1994:169-97

Bartha JL, Ling Y, Kyle P, Soothill W. 2005. Clinical consequences of first-trimester growth discordance in twins. *Eur J Obst Gynecol and Reprod Biol*; 119: 56-59

Becker R, Wegner RD. 2006. Detailed screening for fetal anomalies and cardiac defects at 11-13 week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 27: 613-618

Benacerraf BR, Gelman R, Frigoletto FD. (1987) Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome. *N Engl J Med*; 317 (22): 1371-1376

Bersinger NA, Noble P, Nicolaides KH. 2003. First-trimester maternal serum PAPP-A, SPI and M-CSF levels in normal and trisomic twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 23: 157-162

Bersinger NA, Wunder D, Vanderlick F, Chanson A, et al. 2004. Maternal serum levels of placental proteins after in vitro fertilization and their implications for prenatal screening. *Prenat Diagn*; 24: 471-477

Bhide A, Sankaran S, Sairam S, Papageorghiou AT, Thilaganathan B. 2009. Relationship of intertwin crown-rump length discrepancy to chorionicity, fetal demise and birth-weight discordance. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 34: 131-135

Bilardo CM, Pajkrt E, de Graaf I, Mol BW, Bleker OP. 1998. Outcome of fetuses with enlarged nuchal translucency and normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 11: 401-406

Bilardo CM, Muller MA, Zikulnig L, Schipper M, Hecher K. 2001. Ductus venosus studies in fetuses at high risk for chromosomal or heart abnormalities: relationship with nuchal translucency measurement and fetal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 17: 288-294

Bilardo CM, Muller MA, Pajkrt E, Clur SA, Van Zalen MM, Bijlsma EK. 2007. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 30: 11-18

Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. 2002. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 20: 219-225

Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. 1987. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn*; 7:623-630

Borrell A, Antolin E, Costa MD, Farré MT, Martínez JM, Fortuny A. 1998. Abnormal ductus venosus blood flow in trisomy 21 fetuses during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 179: 1612-1617

Borrell A, Martínez JM, Serés A, Borobio V, Cararach V, Fortuny A. 2003. Ductus venosus assessment at the time of nuchal translucency measurement in the detection of fetal aneuploidy. *Prenat Diagn*; 23: 921-926

Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farré MT, Goncé A, et al.,. 2004. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn*; 24: 541-545

Borrell A, Goncé A, Martínez JM, Borobio V, Fortuny A, Coll O, Cuckle H. 2005. First-trimester screening for Down syndrome with ductus venosus Doppler studies in addition to nuchal translucency and serum markers. *Prenat Diagn*; 25: 901-905

Borrell A, Quintó L, Fortuny A, Borobio V, Mercadé I, Goncé A, Vanrell JA. 2006. Translucencia nuchal y ductus venoso: valores de referencia en el primer trimestre de la gestación. *Prog Obstet Ginecol* 2006; 49::434-440

Borrell A, Pérez M, Figueras F, Méler E, Goncé A, Gratacós E. 2007. Reliability analysis on ductus venosus assessment at 11-14 weeks' gestation in a high-risk population. *Prenat Diagn*; 27: 442-446

Borrell A, Robinson J, Santolaya-Forgas J. 2009a. Report on the 11-13⁶ -week ultrasound evaluation as a screening test for trisomy 21 in singleton pregnancies. *Am J Perinatol*; 26: 703-710

Borrell A, Borobio V, Bestwick JP, Wald NJ. 2009b. Ductus venosus pulsatility index as an antenatal screening marker for Down's syndrome: use with the Combined and Integrated Tests. *J Med Screen*; 16: 112-118

Borrell A. 2009c. Promises and pitfalls of first trimester sonographic markers in the detection of fetal aneuploidy. *Prenat Diagn*; 29: 62-68

Borrell A, Robinson JN, Santolaya-Forgas J. 2010. A global perspective of the 11-13⁶ weeks' sonogram for diagnosis of major congenital malformations in singleton pregnancies. *Am J Perinatol* (In press)

Brizot ML, Snijders RJM, Bersinger NA, Kuhn P, Nicolaides KH. 1994. Maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in early pregnancy. *Obstet Gynecol*; 84: 918-922

Bromley B, Lieberman E, Shipp TD, Benacerraf BR. 2002. Fetal nose bone length: a marker for Down syndrome in the second trimester. *J Ultrasound Med*; 21: 1387-1394

Campbell KH, Copel JA, Ozan Bahtiyar M. 2009. Congenital heart defects in twin gestations. *Minerva Ginecol*; 61: 239-244

Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. 1988. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *BR J Obstet Gynecol*; 95: 330-333

Casals G, Borrell A, Martínez JM, Soler A, Cararach V, Fortuny A. 2002. Transcervical chorionic villus sampling in multiple pregnancies using a biopsy forceps. *Prenat Diagn*; 22: 260-265

Casasbuenas A, Wong AE, Sepulveda W. 2008. Nuchal translucency thickness in monochorionic multiple pregnancies. *J Ultrasound Med*; 27: 363-369

Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS and Kim SH. 2009. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 91 (6): 2381-90

Chasen ST, Perni SC, Kalish RB, Chervenak FA. 2007 First trimester risk assessment for trisomies 21 and 18 in twin pregnancy. *SMFM Meeting Papers. Am J Obstet Gynecol*; 197 (4): 374 e 1-3

Chen CJ, Wang CJ, Yu MW, Lee TK. 1992. Perinatal mortality and prevalence of major congenital malformations of twins in Taipei city. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*; 41: 197-203

Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides KH. 2001. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation. An observational study. *Lancet*; 358: 1665-1667

Cicero S, Sonek JD, McKenna DS, Croom CS, Johnson L, Nicolaides KH. 2003. Nasal bone hypoplasia in trisomy 21 at 15-22 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 21: 15-18

Cicero S, Rembouskos G, Vandecruys H, Hogg M, Nicolaides KH. 2004. Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with absent nasal bone at 11-14 weeks scan. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 23: 218-223

Cicero S, Avgidou K, Rembouskos G, Kagan KO, Nicolaides KH 2006. Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol*; 195:109-114

Cleary-Goldman J, Berkowitz RL. 2005 First trimester screening for Down Syndrome in multiple pregnancy. *Seminars in Perinatology*; 29: 395-400

Cleary-Goldman J, Rebarber A, Krantz D, Hallahan T, Saltzman D. 2008. First-trimester screening with nasal bone in twins. *Am J Obstet Gynecol*; 199: 283.e1-283.e3

Clur SA, Ottenkamp J, Bilardo CM. 2008. The nuchal translucency and the fetal heart: a literature review. *Prenat Diagn*; 29: 739-748

Comas C, Galindo A, Martínez JM, Carrera JM, Gutierrez L, Puerto B, Borrell A. 2002. Early prenatal diagnosis of major cardiac anomalies in a high-risk population. *Prenat Diagn*; 22: 586-594

Corney G, Mac Gillivray I, Campbell DM, Thompson B, Little J. 1983. Congenital anomalies in twins in Aberdeen and Northeast Scotland. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*; 32: 31-35

Cuckle H. 1998. Down syndrome screening in twins. *J Med Screening* 1998; 5: 3-4

Drugan A, Johnson MP, Isada NB, Holzgreve W, Zador IE et al., 1992. The smaller than expected first-trimester fetus is at increased risk for chromosome anomalies. *Am J Obstet Gynecol*; 167: 1525-1528

El Kateb A, Nasr B, Nassar M, Bernard JP, Ville Y. 2007. First-trimester ultrasound examination and the outcome of monochorionic twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 27: 922-925

Evans MI, Goldberg JD, Dommergues M, Wapner RJ et al., 1994. Efficacy of second-trimester selective termination for fetal abnormalities: international collaborative experience among the world's largest centers. *Am J Obstet Gynecol*; 171: 90-94

Ferguson Smith M, Arbuzova S, Benn P, Canick J, Cuckle H, Fortuny A, Ham Lam Y, Norgaard-Pedersen B, Spencer K, Wald N. 2004. Down Syndrome Screening. A position statement from the scientific committee of the International Down Syndrome Screening Group

Fisk NM, Bennett PR. 1995. Prenatal determination of chorionicity and zygosity. In: *Multiple Pregnancy*, Ward RH, Whittle W (eds). RCOG Press: London; 56-66

Frishman GN, Canick JA, Hogan JW, Hackett RJ, Kellner LH, Saller DN, Jr. 1997. Serum triple-marker screening in in vitro fertilization and naturally conceived pregnancies. *Obstet Gynecol*; 90: 98-101

Fusi L, Mc Oharland P, Fisk N, Nicolini U, Wigglesworth J. (1991). Accute twin-twin transfusion: a possible mechanism for brain damaged survivors after intrauterine death of a monozygotic twin. *Obste Gynecol*; 78: 517-522

Garchet-Beaudron A, Dreux S, Leporrier N, ABA Study Group, Clinical Study Group, Oury JF, Muller F. 2008. Second-trimester Down syndrome maternal serum marker screening: a prospective study of 11 040 twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 28:1105-1109

Garne E, Stoll C, Clementi M; Euroscan Group. 2001. Evaluation of prenatal diagnosis of congenital heart diseases by ultrasound: experience from 20 European registries. *Ultrasound Obstet Gynecol*;17: 386-391

Germer U, Kohl T, Smrcek JM, Geipel A, et al., 2002. Comparison of ductus venosus blood flow waveform indices of 607 singletons with 133 multiples at 10-14 weeks gestation. An evaluation in uncomplicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet*; 266: 187-192

Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Christiansen M, Tabor A. 2009. First-trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 33: 8-17

Gringas P and Chen W. 2001. Mechanisms for differences in monozygous twins. *Early Hum Dev*; 64: 105-117

Grynberg M, Graesslin O, Teyssedre J, Quereux C, Gaillard D, Carré-Pigeon F. 2007. Prenatal diagnosis in monozygotic twins with Down syndrome who had different phenotypes. *Prenat Diagn*; 27: 552-554

Hall JG. 2003. Twinning in Developmental biology IV. *Lancet*; 362: 735-743

Hui PW, Tang MHY, Lam YH, Yeung WSB, Ng EHY, Ho PC. 2005. Nuchal translucency in pregnancies conceived after assisted reproduction technology. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 25: 234-238

Hui PW, Tang MHY, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. 2006. Nuchal translucency in dichorionic twins conceived after assisted reproduction. *Prenat Diagn*; 26: 510-513

Jamar M, Lemarchal C, Lemaire V, Koulischer L, Bours V. 2003. A low rate of trisomy 21 twin-pregnancies: a cytogenetics retrospective study of 278 cases. *Genet Couns* 2003; 14: 395-400

Jenkins TM, Wapner RJ. 2000. The challenge of prenatal diagnosis in twin pregnancies. *Curr Opin Obstet Gynecol*; 12: 87-92

Johnson MP, Johnson A, Holzgreve W, Isada NB, Wapner RJ et al., 1993. First-trimester simple hygroma: cause and outcome. *Am J Obstet Gynecol*; 168: 156-161

Kagan KO, Gazzoni A, Sepulveda-González G, Sotiriadis A, Nicolaides KH. 2007. Discordance in nuchal translucency thickness in the prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 29: 527-532

Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. 2008a Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 31: 618-624

Kagan KO, Wright D, Maiz N, Pandeva I, Nicolaides KH 2008b. Screening for trisomy 18 by maternal age, fetal nuchal translucency free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 32: 488-492

Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, Wright D, Nicolaides KH. 2009. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21,18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 33: 259-264

Källén B, Olausson PO, Nygren KG. 2002. Neonatal outcome in pregnancies from ovarian stimulation. *Obstet Gynecol*; 100: 414-419

Kalish RB, Chasen ST, Gupta M, Sharma G, Perni SC, Chervenak FA. 2003. First trimester prediction of growth discordance in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol*; 189: 706-709

Kalish RB, Gupta M, Perni SC, Berman S, Chasen ST. 2004. Clinical significance of first trimester crown-rump length disparity in dichorionic twin gestations. *Am J Obstet Gynecol*; 191: 1437-1440

Kiserud T, Eik-Nes SH, Blaas HG, Hellevik LR. 1991. Ultrasonographic velocimetry of the fetal ductus venosus. *Lancet*; 338: 1412-1414

Krantz DA, Hallahan TW, Orlandi F et al., 2000. First-trimester Down syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. *Obstet Gynecol*; 96: 207-213

Lee W, Allan L, Carvalho JS, Chaoui R, Copel J et al., 2008. ISUOG consensus statement: what constitutes a fetal echocardiogram?. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 32: 239-242

Liao AW, Heath V, Kametas N, Spencer K, Nicolaides KH 2001 First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Hum Reprod*; 16: 1501-1504

Linskens IH, Spreeuwenberg MD, Blankenstein MA, van Vugt JMG. 2009. Early first-trimester free β -hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn*; 29: 74-78

Maiz N, Valencia C, Emmanuel EE, Staboulidou I, Nicolaides KH. 2008a Screening for adverse pregnancy outcome by ductus venosus Doppler at 11-13⁺⁶ weeks. *Obstet Gynecol*; 112: 598-605

Maiz N, Kagan KO, Milovanovic Z, Celik E, Nicolaides KH. 2008b. Learning curve for Doppler assessment of ductus venosus flow at 11-13⁺⁶ weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 31: 503-506

Maiz N, Valencia C, Kagan KO, Wright D, Nicolaides KH. 2009a. Ductus venosus Doppler screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 33: 512-517

Maiz N, Staboulidou I, Leal AM, Minekawa R, Nicolaides KH. 2009b. Ductus venosus Doppler in the prediction of outcome in twin pregnancies. *Obstet Gynecol*; 113: 860-865

Makrydimas G, Sotiriadis A, Ioannidis JPA. 2003. Screening performance of first-trimester nuchal translucency for major cardiac defects: A meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*; 189: 1330-1335

Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade G, Berkowitz RL et al. 2004. First-trimester nasal bone evaluation for aneuploidy in the general population. *Obstet Gynecol*; 104: 1222-1228

Malone FD, Canick JA, Ball RH et al., 2005 First-trimester or second-trimester screening or both, for Down syndrome. *N Engl J Med*; 353: 2001-2011

Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD et al., 2003. Births final data 2002. *National Vital Statistics Reports*, Vol. 42, No 10. Hyattsville, MD. National Center for Health Statistics

Mashiach R, Orr-Urtreger A, Yaron Y. (2004) A comparison between maternal serum free β -human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A levels in first trimester twin and singleton pregnancies. *Fetal Diagn Ther*; 19: 174-177

Matias A, Gomes C, Flack N, Montenegro N, Nicolaides KH. 1998. Screening for chromosomal abnormalities at 11-14 weeks: the role of ductus venosus blood flow. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 12: 380-384

Matias A, Montenegro N, Areias JC. 2000. Anticipating twin-twin transfusion syndrome in monochorionic twin pregnancy. Is there a role for nuchal translucency and ductus venosus blood flow evaluation at 11-14 weeks? *Twin Res*; 3: 65-70

Matias A, Montenegro N, Loureiro T, Cunha M, Duarte S, Freitas D, Severo M. 2010. Screening for twin-twin transfusion syndrome at 11-14 weeks of pregnancy: the

key role of ductus venosus blood flow assessment. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 35: 142-148

Maymon R, Dreazen E, Rozinsky S, Bukovsky I et al., 1999a. Comparison of nuchal translucency measurement and second-trimester triple serum screening in twins versus singleton pregnancies. *Prenat Diagn*; 19: 727-731

Maymon R, Dreazen E, Tovbin Y et al., 1999b. The feasibility of nuchal translucency measurement in higher order multiple gestations achieved by assisted reproduction. *Hum Reprod*; 14: 2102-2105

Maymon R, Jauniaux E, Holmes A, Wiener YM, Dreazen E, Herman A. 2001. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome after assisted conception versus spontaneously conceived twins. *Hum Reprod*; 16(9): 1999-2004

Maymon R, Jauniaux E, Herman A. 2002. Down syndrome screening in twin pregnancies by nuchal translucency measurement: current concept. *Minerva Ginecol*; 54: 211-215

Maymon R, Neeman O, Shulman A, Rosen H, Herman A. 2005. Current concepts of Down syndrome screening tests in assisted reproduction twin pregnancies: another double trouble. *Prenat Diagn*; 25: 746-750

Maymon R, Cuckle H, Herman A. 2006. Maternal serum inhibin levels in twin and singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Hum Reprod*; 21 (5): 1305-1308

Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. 1984. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*; 148: 886-894

Meyers C, Adam R, Dungan J, Prenger V. 1997. Aneuploidy in twin gestations: when is maternal age advanced ? *Obstet Gynecol* 89: 248-251

Monni G, Zoppi MA, Ibba RM, Putzolu M, Floris M. 2000. Nuchal translucency in multiple pregnancies. *Croat Med J*; 41: 266-269

Muller F, Dreux S, Dupoizat H, Uzan S, Dubin MF, Oury JF, Dingenon B, Dommergues M. 2003. Second trimester Down syndrome maternal serum screening in twin pregnancies: impact of chorionicity. *Prenat Diagn.*; 23: 331-335

Myriantopoulos NC. 1978. Congenital malformations: the contribution of twin studies. *Birth Defects Orig Artic Ser*; 14: 151-165

Neveux LM, Palomaki GE, Knight GJ., Haddow JE. 1995. Multiple marker screening for Down syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 16: 29-34

Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. 1992. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimestre of pregnancy. *BMJ*; 304: 867-869

Nicolaides KH, Sebire NJ, Snijders RJM. 1999 In: *The 11-14 weeks scan. The diagnosis of fetal abnormalities.* The Parthenon Publishing Group. New York-London: 149-185

Nicolaides KH 2004a In: *The 11-13⁶ weeks scan.* Fetal Medicine Foundation, London. www.fetalmedicine.com/fmf/online-education

Nicolaides KH. 2004b Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*; 191: 45-67

Niemimaa M, Heinonen S, Seppala M, Hippelainen M et al. 2001. First-trimester screening for Down's syndrome in in vitro fertilization pregnancies. *Fertil Steril*; 76: 1282-1283

Niemimaa N, Suonpaa M, Heinonen S, Seppala M, Bloigu R, Ryyananen M. 2002. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A in twin pregnancies in the first trimester. *Prenat Diagn*; 22: 183-185

Noble PL, Snijders RJM, Abraha HD, Sherwood RA, Nicolaides KH. 1997. Maternal serum free beta hCG at 10-14 weeks of gestation in trisomic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*; 104: 741-743

Nylander PPS. 1975. Frequency of multiple births. In MacGillivray I, Nylander PPS, Corney G, eds. *Human multiple reproduction*. London W. B. Saunders: 87-98

Odibo AO, Lawrence-Cleary K, Macones GA. 2003. Screening for aneuploidy in twins and higher-order multiples: Is first-trimester nuchal translucency the solution ? *Obstet Gynecol Surv*; 58: 609-614

Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, Macri J. 2002 First trimester screening with free β -hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn*; 22: 718-721

Paladini D, Vassallo M, Sglavo G, Russo MG, Martinelli P. 2005. Diagnosis and outcome of congenital heart diseases in fetuses from multiple pregnancies. *Prenat Diagn*; 25: 403-406

Pandya PP, Brizot ML, Kuhn P, Snijders RJM, Nicolaides KH. 1994. First trimester nuchal translucency thickness and risk for trisomies. *Br J Obstet Gynecol*; 84: 420-423

Pandya PP, Snijders RJM, Johnson SP, Brizot ML, Nicolaides KH. 1995. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks gestation. *Br J Obstet Gynecol*; 102: 957-962

Petrikovsky BM. 1999. Multiple pregnancies. In *Fetal Disorders. Diagnosis and management*. Edited by Petrikovsky BM, USA, pp. 223-248

Protocol de seguiment de l'embaràs a Catalunya. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut 1998. 2^a Edició revisada. 2005

Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals. 2008. Actualització del Programa de Diagnòstic Prenatal de 1998. Generalitat de Catalunya

Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals. Actualització del protocol (15/12/2009). Generalitat de Catalunya

Quintero RA, Morales WJ, Allen MH, Bornick PW, Johnson PK, Kruger M. 1999. Staging of twin-twin transfusion syndrome. *J Perinatol*; 19: 550-555

Rasiah SV, Publicover M, Ewer AK, Khan KS, Kilby MD, Zamora J. 2006. A systematic review of the accuracy of first-trimester ultrasound examination for detecting major congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 28: 110-116

Räty R, Virtanen A, Koskinen P, Laitinen P, Förstrom J et al.,. 2000. Maternal mid-trimester serum AFP and free beta-hCG levels in in vitro fertilization twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 20:221-223

Räty R, Virtanen A, Koskinen P, Anttila L, Förstrom J et al.,. 2002. Serum free beta-hCG and alpha-fetoprotein levels in IVF, ICSI and frozen embryo transfer pregnancies in maternal mid-trimester serum screening for Down's syndrome. *Hum Reprod*; 17: 481-484

Registre de defectes congènits de la ciutat de Barcelona (REDCB) Informe annual 2003 (període 1992-2002). Institut Municipal de Salut Pública. Ajuntament de Barcelona.

Rodis JF, Egan JFX, Craffey A, Ciarleglio L, Greenstein RM, Scorza WE. 1990. Calculated risk of chromosomal abnormalities in twin gestations. *Obstet Gynecol*; 76: 1037-1041

Sahota DS, Leung TY, Fung TY, Chan LW, Law LW, Lau TK. 2009. Medians and correction factors for biochemical and ultrasound markers in Chinese women undergoing first-trimester screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 33: 387-393

Salomon LJ, Cavicchioni O, Bernard JP, Duyme M, Ville Y. 2005. Growth discrepancy in twins in the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 26: 512-516

Saltvedt S, Almström H, Kublickas M, Valentin L, Grunewald C. 2006. Detection of malformations in chromosomally normal fetuses by routine ultrasound at 12 or 18 weeks of gestation-a randomised controlled trial in 39 572 pregnancies. *BJOG*; 113: 664-674

Schinzler AA, Smith DW, Miller JR. 1979. Monozygotic twinning and structural defects. *J Pediatr*; 95: 901-930

Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. 1996. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *B J Obstet Gynecol*; 103: 999-1003

Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. 1997a. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*; 104: 1203-1207

Sebire NJ, D'Ercole C, Hughes K, Carvalho M, Nicolaides KH. 1997b. Increased nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation as a predictor of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 10: 86-89

Sebire NJ, D'Ercole C, Soares W, Nayar R, Nicolaides KH. 1998. Intertwin disparity in fetal size in monochorionic and dichorionic pregnancies. *Obstet Gynecol*; 91: 82-85

Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH: 2000. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod*; 15: 2008-2010

Senat MV, De Keersmaecker B, Audibert F, Montchamont G, Frydman R, Ville Y. 2002. Pregnancy outcome in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn*; 22: 345-349

Senat MV, Bernard JP, Boulvain M, Ville Y. 2003. Intra-and interoperator variability in fetal nasal bone assessment at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 22: 138-141

Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. 1996. The lambda sign at 10-14 weeks gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 7: 421-423

Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Kallogeropoulos, Nicolaides KH. 1997. Evolution of the lambda or twin-chorionic peak sign in dichorionic twin pregnancies. *Obstet Gynecol*; 89: 439-441

Sepulveda W, Wong AE, Casabuenas A. 2009. Nuchal translucency and nasal bone in first-trimester ultrasound screening for aneuploidy in multiple pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 33: 152-156

Souka AP, Snijders RJM, Novakov A, Soares W, Nicolaides KH. 1998. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 11: 391-400

Souka AP, Krampfl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. 2001. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 18: 9-17

Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. 2005. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol*; 192: 1005-1021

Spencer K, Salonen R, Muller F. 1994. Down syndrome screening in multiple pregnancies using alpha fetoprotein and free beta hCG. *Prenat Diagn*; 14: 537-542

Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders RJM, Nicolaides KH. 1999. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 13: 231-237

Spencer K. 2000. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free β -hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn*; 20: 91-95

Spencer K. 2001. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: does chorionicity impact on maternal serum free β -hCG or PAPP-A levels ? *Prenat Diagn*; 21: 715-717

Spencer K, Nicolaides KH. 2003. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *B J Obstet Gynaecol*; 110: 276-280

Spencer K. 2005. Non-invasive screening tests. In *Multiple Pregnancy, epidemiology, gestation and perinatal outcome*. Blickstein I, Keith LG (eds). Taylor & Francis: Abingdon: 368-384

Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. 2008. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn*; 28: 49-52

Sperling L, Kiil C, Larsen LU, Qvist I et al., 2006. Naturally conceived twins with monochorionic placentation have the highest risk of fetal loss. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 28: 644-652

Sperling L, Kiil C, Larsen LU, Brocks V et al., 2007. Detection of chromosomal abnormalities, congenital abnormalities and transfusion syndrome in twins. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 29: 517-526

Tai J, Grobman WA. 2007. The association of crown-rump length discordance in twin gestations with adverse perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*; 197: 369.e1-369.e4

Vandecruys H, Faiola S, Auer M, Sebire N, Nicolaides KH. 2005. Screening for trisomy 21 in monozygotic twins by measurement of fetal nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 25: 551-553

Vitthala S, Gelbaya TA, Brison DR, Fitzgerald CT, Nardo LG. 2009. The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*; 15: 45-55

Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T et al., 1988. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ J*; 297: 883-887

Wald N, Cuckle H, Hu T et al. 1991. Maternal serum unconjugated oestriol and human chorionic gonadotropin levels in twin pregnancies: implications for screening for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynecol*; 98: 905-908

Wald NJ, Densem J, Stone R, Chen R. 1993. The use of free-beta hCG in antenatal screening for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynecol*; 100: 550-557

Wald NJ, Hackshaw K. 1997. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn*; 17: 821-829

Wald NJ, White N, Morris JK, Huttly WJ, Canick JA. 1999. Serum markers for Down's syndrome in women who have had in vitro fertilisation: implications for antenatal screening. *Br J Obstet Gynaecol*; 106: 1304-1306

Wald NJ, Kennard A, Donnenfeld A, Leck I. 2000. Ultrasound scanning for congenital abnormalities. In *Antenatal and Neonatal Screening*, Wald NJ, Leck I (eds). Oxford University Press: Oxford, 2000: 441-470

Wald NJ, Huttly WJ, Hackshaw AK. 2003a. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet*; 361: 835-836

Wald NJ, Rish S, Hackshaw AK. 2003b. Combining nuchal translucency and serum markers in prenatal screening for Down syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 23: 588-592

Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM. 2003c. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS). *J Med Screen*; 10: 56-1

Wald NJ, Rish S. 2005. Prenatal screening for Down syndrome and neural tube defects in twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 25: 740-745

Weissman A, Achiron R, Lipitz S, Blickstein I, Mashiach S. 1994. The first-trimester growth-discordant twin: an ominous prenatal finding. *Obstet Gynecol*; 84: 110-114

Wenstrom KD, Syrio CH, Hammitt DG, Van Voorhis BJ. 1993. Increased risk of monozygotic twinning associated with assisted reproduction. *Fertil Steril* 60: 510-514

Westover T, Fisher R. 2001. Refining the risk of aneuploidy in twins. *Am J Obstet Gynecol*; 185: 527.S224

Wöjdemann KR, Larsen SO, Shalmi A, Sundberg K, Christiansen M, Tabor A. 2001. First trimester screening for Down syndrome and assisted reproduction: no basis for concern. *Prenat Diagn*; 21: 563-5

Wöjdemann KR, Olesen Larsen S, Shalmi AC, Sundberg K, Tabor A, Christiansen M. 2006. Nuchal translucency measurements are highly correlated in both mono- and dichorionic twin pairs. *Prenat Diagn*; 26: 218-220

Zoppi MA. 2009. Nuchal translucency screening in monozygotic twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 34: 491-493