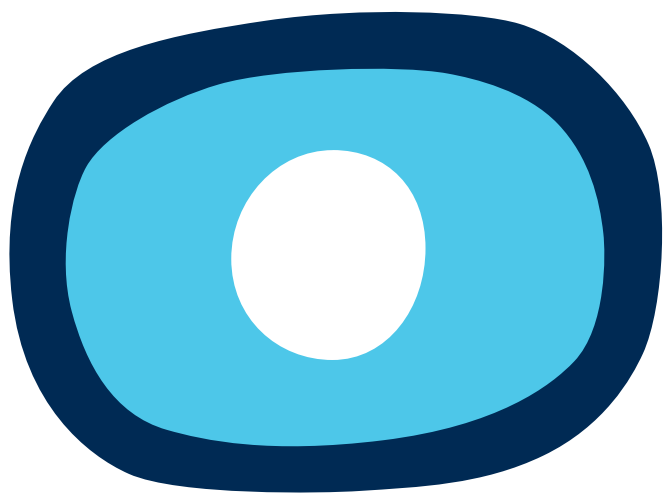


Prenatal screening in twin pregnancies

Ingeborg H. Linskens

Prenatal screening in twin pregnancies

Ingeborg H. Linskens



Contents

.....

CHAPTER 1	••• Introduction	9	CHAPTER 9	••• Expectant management in multiple pregnancies with discordant structural fetal anomalies Submitted	85
CHAPTER 2	••• Early first trimester free β -hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins Prenat Diagn. 2009 Jan;29(1):74-8.	17	CHAPTER 10	••• General discussion and perspectives	97
CHAPTER 3	••• Processing effects and storage conditions on A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM12s), a maternal serum marker for adverse pregnancy outcome Clin Chem Lab Med. 2009;47(2):1579-81.	29	CHAPTER 11	••• Summary/Samenvatting	111
CHAPTER 4	••• ADAM12s as a first trimester screening marker of trisomy Prenat Diagn. 2009 Sep;29(9):866-9.	37	APPENDICES	••• List of abbreviations	120
CHAPTER 5	••• ADAM12s and PP13 as first trimester screening markers for adverse pregnancy outcome Submitted	47		••• Co-authors	121
CHAPTER 6	••• First trimester maternal serum ADAM12s levels in twin pregnancies Prenat Diagn. 2010 Apr;30(4):352-6.	59		••• List of publications	122
CHAPTER 7	••• Discordance in nuchal translucency measurements in monochorionic diamniotic twins as predictor of Twin-to-Twin Transfusion Syndrome Twin Res Hum Genet 2009 Dec;12(6):605-10.	69		••• Dankwoord	123
CHAPTER 8	••• A trend towards increased first trimester free β -hCG and PAPP-A in monochorionic twins complicated by Twin-to-Twin Transfusion Syndrome Prenat Diagn. 2010 Sep;30(9):909-10.	81		••• Curriculum vitae	127

Summary

.....

Prenatal screening intends to identify women at risk for carrying a fetus with a certain anomaly. Prenatal testing for trisomy 21 (Down syndrome=DS) has become part of routine obstetric care in the Netherlands. The current test of choice for singleton pregnancies is the first trimester combined test. This combined test estimates the individual risk of a woman for a trisomy 21 affected pregnancy based on maternal age, ultrasound measurement of the fetal nuchal translucency (NT) and the maternal serum biochemical markers, free beta human chorionic gonadotrophin (free β -hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A).

Fetal anomaly screening in twin pregnancies is more complex than in singletons. Fetuses can either be discordant (only one affected) or concordant (both affected/unaffected) for a certain anomaly. In DS screening both 'fetus specific' markers, i.e. NT measurements, and 'pregnancy specific', i.e. maternal serum markers, have to be taken into consideration for twin pregnancies. Moreover, twin pregnancies are at increased risk for adverse pregnancy outcome compared with singletons.

In this thesis we evaluated the screening options for aneuploidy and structural anomalies in twin pregnancies, including new screening markers and screening for adverse pregnancy outcome. Maternal serum and fetal ultrasound markers, both old and new in the first trimester of pregnancy are evaluated.

Chapter 1 contains a brief general introduction on twin pregnancies and prenatal screening. Further it describes the outline and aim of this thesis.

In **Chapter 2** we assessed whether first trimester maternal serum markers in twin pregnancies currently used for DS screening should be corrected for twin chorionicity. The data of 200 euploid twins were used for setting up reference values for free β -hCG and PAPP-A. Significantly lower first trimester free β -hCG and PAPP-A levels in mono chorionic twins ($n=37$, 1.53 and 1.59 MoM) compared with dichorionic twins ($n=163$, 2.11 and 2.40 MoM) were found. This study strengthened the need to make a distinction between mono- and dichorionic twins for DS screening, since biochemical markers are significantly lower in mono chorionic.

A Disintegrin And Metalloprotease 12s (ADAM12s) is suggested to be a potential first trimester serum marker for fetal trisomy and adverse pregnancy outcome in singletons.

In **Chapter 3** the processing effects and storage conditions on ADAM12s for usage in the routine clinical chemistry laboratory are evaluated. We demonstrated that ADAM12s is stable when stored at -20°C for at least 25 days and at 4°C for at least 4 days. The ADAM12s concentration is not influenced by multiple freeze/thaw cycles and specimens can be stored for 96 hours at 4°C prior to centrifugation. This stability allows a widely spread application of ADAM12s measurement in obstetric practice.

In **Chapters 4, 5** and **6** ADAM12s was evaluated as screening marker for fetal trisomy and adverse pregnancy outcome in both singleton and twin pregnancies.

In **Chapter 4** the screening performance of ADAM12s as marker for fetal trisomy was evaluated in singleton pregnancies. The results of ADAM12s in 218 singleton cases of trisomy 21, in 62 trisomy 18 and in 29 trisomy 13 compared with matched controls are described. The median ADAM12s was 1.00 MoM in controls, and in the trisomy 21 cases at 8, 9, 10, 11, 12, 13 weeks of gestation it was 0.45 ($n=3$), 0.73 ($n=22$), 0.74 ($n=53$), 0.85 ($n=37$), 0.92 ($n=71$), 1.06 ($n=32$) MoM, respectively. The median for trisomy 18 was 0.85 MoM and for trisomy 13 0.63 MoM. The ADAM12s MoM values were reduced in early first trimester for all trisomies. However, the screening performance for Down syndrome is not greatly improved by adding ADAM12s. ADAM12s could be an additional biochemical marker for first trimester screening for trisomies other than Down syndrome.

In **Chapter 5** maternal serum ADAM12s and Placental Protein 13 (PP13) were studied as screening markers for adverse pregnancy outcome in singletons pregnancies. In a retrospective case control study 17 cases of preeclampsia (PE), 30 cases of gestational hypertension (GH) and 8 cases of small for gestational age (SGA) fetus matched with 165 control cases were included. Median MoM values for ADAM12s were 0.90, 0.77 and 0.88 for PE, GH and SGA cases respectively. Median MoM values for PP13 were 0.77, 0.95 and 0.89 respectively. ROC analysis yielded areas under the curve for ADAM12s and PP13 of 0.63 and 0.59 for PE, 0.68 and 0.57 for GH and 0.59 and 0.62 for SGA, respectively. Combined ADAM12 and PP13 did not improve the area under the curve. If specificity was set at 0.80, the corresponding sensitivity of ADAM12s was 52% for GH. Decreased first trimester levels of ADAM12s may be useful in early prediction of GH, although the predictive value was limited. Decreased levels of PP13 were not significantly correlated with adverse pregnancy outcome. Combining ADAM12s and PP13 in this study did not improve screening performance.

In **Chapter 6** ADAM12s was determined in first trimester serum of uncomplicated and complicated twins. Maternal serum of 215 twin pregnancies was compared with a population of singletons. Median ADAM12s MoM in euploid twins is significantly increased (1.61 MoM, $n=209$) compared with singletons, however, not doubled like other first trimester markers such as free β -hCG and PAPP-A. Mono chorionic twins have significantly lower median ADAM12s MoM than dichorionic twins, namely 1.36 MoM ($n=41$) versus 1.67 MoM ($n=168$). Statements about the screening performance of ADAM12s in twin trisomy cases are not possible at this stage since too few cases have been studied so far. In twin pregnancies ADAM12s is not a sufficient potential marker for predicting adverse pregnancy outcome. Median ADAM12s MoMs are not significantly different in twins complicated by hypertensive disorders or small for gestational age fetus compared with uncomplicated twins.

Twin pregnancies are at increased risk for adverse pregnancy outcome compared with singletons. In mono chorionic twins the risk of adverse outcome is also determined by the existence of Twin-to-Twin Transfusion syndrome (TTTS), complicating approximately 9-15% of all mono chorionic twin pregnancies. Timely diagnosis of TTTS is beneficial for treatment options and outcome of the fetuses.

In **Chapter 7** the use of nuchal translucency (NT) discordance as predictor of subsequent Twin-to-Twin Transfusion syndrome (TTTS) in monochorionic twins has been investigated. In 61 monochorionic diamniotic twins NT and crown-rump-length (CRL) discordance was calculated as the percentage of delta NT and CRL (absolute difference NT/CRL fetus 1 and fetus 2 of the largest measurement, and correlated with subsequent development of TTTS. NT discordance of more than 20% in monochorionic diamniotic twins was associated with an increased risk for subsequent development of TTTS, and earlier presentation of symptoms.

In **Chapter 8** the use of first trimester trisomy 21 serum markers was described in relationship to subsequent TTTS development in monochorionic (MC) twins. Serum of 56 MC twins was evaluated for first trimester free β -hCG and PAPP-A and correlated for outcome. In MC twins later developing TTTS, we found a trend towards higher values of first trimester free β -hCG and PAPP-A. Larger studies are needed to confirm our data whether assessment of first trimester free β -hCG and PAPP-A will be of diagnostic or prognostic value for individual patients.

In **Chapter 9** the outcome of multiple pregnancies complicated by a single anomalous fetus is described. Ultrasound and outcome data were evaluated for multiples with a single fetus (major/minor) anomalous. In our population 38 twin fetuses demonstrated anomalies, predominantly central nervous system (n=5), skeletal (n=7), urinary tract (n=6) and cord anomalies (n=5) and four cases had multiple congenital anomalies. Median gestational age at delivery was not significantly different for twins without structural anomalies and twins with one anomalous fetus managed expectantly. In this cohort we report on a tendency towards expectant management on request of the pregnant women and their partners of those twins discordant for major (lethal) anomalies. Fetocide was only opted in a small number of cases with severe but non-lethal anomalies in DC twins.

In **Chapter 10** this thesis finally describes a general discussion and perspectives. In conclusion, prenatal screening in twins is complex. Overall, it is advised to report on a fetus specific risk rather than on a pregnancy specific risk for both mono- and dichorionic twins. In general first trimester screening is advocated above second trimester screening and in any case above screening based on maternal age only. Single NT screening is a sufficient screening program in multiple pregnancies with comparable performance as in singletons. However, first trimester combined testing is reported to reduce false positive rates. For the future, screening programs need to incorporate the between-fetus correlation coefficient for NT measurements. Shifting from single NT measurements towards first trimester combined screening requires implementation of serum chorionicity correction factors. Additionally, other co-variables such as gestational age, conception mode and ethnicity need to be further evaluated in twin pregnancies and adjusted to tailor-made individual risk estimation. Likewise additional first trimester ultrasound markers will need to be evaluated for aneuploidy screening in twin pregnancies, since these markers allow calculating even more specific risk per fetus.

Moreover, we think that calculation of NT discordance should be standardized in monochorionic twins so that predictive values can be calculated in an unselected population. Finally, the current serum screening markers of the first trimester combined test and new serum screening markers need to be further evaluated as predictors of adverse pregnancy outcome in twin pregnancies.

Samenvatting

. . . Prenatale screening bij tweelingzwangerschappen

Het doel van prenatale screening is om tijdens de zwangerschap vrouwen met een verhoogde kans op het dragen van een foetus met een bepaalde afwijking op te sporen. Prenatale testen voor trisomie 21 (Down syndroom=DS) zijn een integraal onderdeel van de verloskundige zorg in Nederland, met de 1e trimester combinatietest als de voorkeurstest bij een eenlingzwangerschap. Deze combinatietest berekent aan de hand van de maternale leeftijd, de echoscopische meting van de nuchal translucency (de 'nekplooi'=NT), en een tweetal serumwaarden (vrij β -hCG en PAPP-A) de individuele kans van een vrouw op een foetus met DS. De screening op aangeboren afwijkingen bij tweelingzwangerschappen is gecompliceerder dan bij eenlingzwangerschappen. Er zijn verschillende mogelijkheden: beide foetussen zijn niet aangedaan met een bepaalde afwijking, slechts één foetus is aangedaan (discordant) of beiden zijn aangedaan/niet aangedaan (concordant). Bij DS screening moeten 'foetusspecifieke' kenmerken (NT metingen) en 'zwangerschapsspecifieke' kenmerken (serummarkers) in overweging genomen worden bij een tweelingzwangerschap. Bovendien hebben tweelingzwangerschappen in het algemeen een verhoogde kans op een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst in vergelijking met een eenlingzwangerschap. In dit proefschrift worden screeningmethoden voor het opsporen van een afwijkend aantal chromosomen (aneuploidie) en van structurele afwijkingen bij tweelingzwangerschappen beschreven met inbegrip van oude en nieuwe screeningmarkers en het screenen op een gecompliceerde uitkomst van de zwangerschap.

Hoofdstuk 1 begint met een korte algemene introductie over tweelingzwangerschappen en prenatale screening. Het beschrijft vervolgens de opbouw en hoofdlijnen van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2** is onderzocht of voor het gebruik van maternaal serum bij de combinatietest voor DS een correctie nodig is voor tweelingchorioniciteit. Serum van 200 euploide tweelingen (normaal aantal chromosomen) is gebruikt voor het opzetten van referentiewaarden van vrije β -hCG en PAPP-A. Een significant lagere mediane vrije β -hCG MoM werd gevonden bij monochoriale tweelingen in vergelijking met dichoriale, namelijk 1.53 MoM (n=37) en 2.11 MoM (n=163). Eveneens werden voor PAPP-A significant lagere MoM waarden gevonden in monochoriale in vergelijking met dichoriale tweelingen, namelijk 1.59 MoM (n=37) en 2.40 MoM (n=168). De resultaten van deze studie benadrukken de noodzaak om bij de combinatietest een correctie aan te brengen voor tweelingchorioniciteit en serummarkers.

A Disintegrin And Metalloprotease 12s (ADAM12s) is een mogelijke eerste trimester screening marker voor een afwijkend aantal chromosomen en/of gecompliceerde zwangerschapsuitkomst.

In **hoofdstuk 3** worden de resultaten van een validatie- en stabiliteitsstudie van ADAM12s beschreven. In deze studie is ondermeer gekeken naar reproduceerbaarheid, matrixinterferentie en stabiliteit van ADAM12s in serum. De ADAM12s is stabiel, mits bewaard bij -20°C, gedurende tenminste 25 dagen en bij 4°C gedurende tenminste 4 dagen. ADAM12s concentratie werd niet beïnvloed door herhaalde vries-dooicycli. Duidelijk werd dat bloedmonsters bewaard kunnen worden tot 96 uur alvorens deze te centrifugeren. Deze kenmerken van de ADAM12s assay zorgen voor goede toepassingsmogelijkheden in het klinisch chemisch laboratorium.

In de **hoofdstukken 4, 5 en 6** is gekeken naar ADAM12s als screeningsmarker voor een aneuploidie en gecompliceerde zwangerschapsuitkomst bij zowel eenling- als tweelingzwangerschappen.

In **hoofdstuk 4** staan de resultaten beschreven van een case-controle studie met ADAM12s als screeningsmarker voor foetale trisomie. In totaal zijn 218 met trisomie 21 aangedane eenlingzwangerschappen, 62 met trisomie 18 en 29 met trisomie 13 vergeleken met gematchte controles. De mediane ADAM12s MoM was 1.00 bij de controles en in de trisomie 21 casus bij 8, 9, 10, 11, 12, 13 weken zwangerschap, respectievelijk 0.45 (n=3), 0.73 (n=22), 0.74 (n=53), 0.85 (n=37), 0.92 (n=71), 1.06 (n=32) MoM. De mediane ADAM12s MoM was 0.85 in de trisomie 18 groep en 0.63 in de trisomy 13 groep. Alle ADAM12s MoM's waren duidelijk verlaagd in het vroege eerste trimester van de zwangerschap voor alle trisomieën. Een uitbreiding van de huidige combinatietest met ADAM12s leidde echter niet tot een sterke verbetering van de detectiegraad van trisomie 21 of een daling van het aantal fout-positieven. ADAM12s kan wel gebruikt worden als additionele screeningsmarker voor trisomieën anders dan trisomie 21.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van ADAM12s en Placentale Protein 13 (PP13) beschreven als eerste trimester voorspellers van een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst, zoals hypertensieve aandoeningen en foetale groeirestrictie bij eenlingen. In een retrospectieve case-controle studie zijn 55 cases, 17 preeclampsie (PE), 30 zwangerschapshypertensie (GH), 8 groeirestrictie (SGA), vergeleken met 165 gematchte controles. Mediane ADAM12sMoM waren 0.90, 0.77 en 0.88 voor PE, GH en SGA. Mediane PP13 MoM waren 0.77, 0.95 en 0.89 voor PE, GH en SGA. ROC curves lieten een area-under-the-curve (AUC) zien voor ADAM12s en PP13 van 0.63 en 0.59 voor PE, 0.68 en 0.57 voor GH en 0.59 en 0.62 voor SGA. Gecombineerde ADAM12s en PP13 bepalingen verbeterden de screeningresultaten niet. Bij een specificiteit van 0.80, was de bijbehorende sensitiviteit van ADAM12s 52% voor GH. Uit deze resultaten blijkt dat verlaagd eerstetrimester ADAM12s een screeningmarker is voor zwangerschapshypertensie bij eenlingen. Hoewel de PP13 levels verlaagd waren, werd in deze studie geen verband gevonden met een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst. Een gecombineerde screening voor een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst met ADAM12s en PP13 heeft eveneens geen toegevoegde waarde.

In **hoofdstuk 6** wordt ADAM12s geëvalueerd in maternaal serum van ongecompliceerde en gecompliceerde tweelingzwangerschappen. In totaal zijn 215 tweelingen onderzocht, waarin de mediane ADAM12s MoM bij euploide tweelingen significant verhoogd (1.61 MoM, n=209) was in vergelijking met een eenling controlegroep, maar niet typisch verdubbeld,

zoals andere 1e trimester serummarkers als vrije β -hCG en PAPP-A. Monochoriale tweelingen hebben een significant lagere mediane ADAM12s MoM in vergelijking met dichoriale tweelingen, namelijk 1.36 (n=41) versus 1.67 MoM (n=168). Er zijn te weinig data beschikbaar om een conclusie te trekken over de prestatie van ADAM12s als screeningmarker voor DS bij tweelingzwangerschappen. Bij tweelingen is ADAM12s geen geschikte marker voor het voorspellen van een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst. De mediane ADAM12s MoMs zijn niet significant anders bij tweelingen met een normale uitkomst dan met een gecompliceerde uitkomst (hypertensieve aandoeningen of groeirestrictie van de foetus).

Ongeveer 10-15% van alle monochoriale tweelingzwangerschappen wordt gecompliceerd door het Tweeling Transfusie Syndroom (TTS). Zonder interventie is TTS een veroorzaker van ernstige morbiditeit, veelal geassocieerd met vroeggeboorte, en mortaliteit van één of beide foetussen. Vroege identificatie en behandeling van TTS leidt tot een verbeterde uitkomst van de zwangerschappen.

In **hoofdstuk 7** en **8** is gekeken of de huidige markers uit de combinatietest bepalend en mogelijk voorspellend zijn voor TTS.

In **hoofdstuk 7** wordt de relatie onderzocht tussen NT discordantie ('nekplooi') en het ontwikkelen van TTS bij monochoriale tweelingen. Bij 61 monochoriale diamniotische tweelingen is gekeken naar het verschil in NT en kop-stuitlengte (crown-rump-length=CRL) tussen de beide foetussen en de latere ontwikkeling van TTS. Als er een groter verschil dan 20% in de NT metingen werd gevonden bij een tweelingpaar dat geassocieerd is met een verhoogde kans op TTS, waarbij de symptomen van TTS zich ook eerder in de zwangerschap manifesteerden.

In **hoofdstuk 8** is onderzoek gedaan naar de 1e trimester serummarkers, vrij β -hCG en PAPP-A, in relatie tot monochoriale tweelingen gecompliceerd door TTS. Data van 56 monochoriale tweelingen, waarbij 12 gecompliceerd door TTS, zijn geanalyseerd. Een trend naar een hogere mediane vrije β -hCG MoM werd gezien in de TTS groep (n=12) in vergelijking met de ongecompliceerde MC tweelingen (n=39) (1.99 versus 1.53 MoM), maar het verschil was niet significant. Een vergelijkbare tendens werd gevonden voor de mediane PAPP-A MoM, namelijk 1.94 in de TTS groep (n=12), versus 1.69 in de ongecompliceerde MC tweelingen. Bij monochoriale tweelingen, die later in de zwangerschap TTS ontwikkelden, bestaat een tendens naar hogere mediane MoM van het vrije β -hCG en PAPP-A. Uitgebreidere studies zijn noodzakelijk om deze data te bevestigen en voorspellende waarden te berekenen.

In **hoofdstuk 9** staan de resultaten beschreven van het zwangerschapsverloop bij een cohort aan tweelingen, waarbij één structureel afwijkende foetus gevonden werd bij het 'Structureel Echoscopisch Onderzoek' tussen 18-22 weken zwangerschap.

In totaal werden 38 tweelingzwangerschappen onderzocht met één afwijkende foetus (ernstig of mild). Het ging hierbij voornamelijk om afwijkingen van het centrale zenuwstelsel (n=5), het skelet (n=7), urogenitaal (n=6) en de navelstreng (n=5). De mediane zwangerschapsduur ten tijde van de bevalling was niet significant langer bij tweelingen zonder structurele afwijkingen dan bij tweelingen met één afwijkende foetus. In dit

cohort zagen wij een neiging naar meer afwachtend beleid op verzoek van de ouders voor discordante tweelingen met ernstige (lethale) afwijkingen. Selectieve foetocide was een optie bij een beperkt aantal gevallen met ernstige maar niet lethale afwijkingen.

In **hoofdstuk 10** worden, na een algemene discussie, toekomstperspectieven voor tweelingzwangerschappen beschreven. De conclusie is dat prenatale screening bij tweelingzwangerschappen gecompliceerder is dan bij eenlingzwangerschappen. Geadviseerd wordt om screeningresultaten te rapporteren per foetus in plaats van per zwangerschap. Eerste trimester screening heeft de voorkeur boven tweede trimester screening, maar in elk geval hebben beide methoden de voorkeur boven screening op basis van alleen de maternale leeftijd. Op dit moment is screening op basis van alleen nekplooi metingen toereikend voor een meerlingzwangerschap met vergelijkbare resultaten als bij eenlingzwangerschappen. Echter het gebruik van de 1e trimester combinatietest kan leiden tot een daling van het aantal fout-positieve uitslagen. In de nabije toekomst moeten screeningprogramma's, waarin de nekplooi metingen zijn opgenomen, ook de interfoetus correlatie coëfficiënt implementeren. Daarnaast zal het noodzakelijk zijn om correctiefactoren voor serummarkers en tweelingchorioniciteit te implementeren wanneer er gebruik gemaakt wordt van de 1e trimester combinatietest. Verder onderzoek naar andere co-variabelen, zoals een nauwkeurigere bepaling van zwangerschapsduur, conceptie en ethniciteit, is nodig, zodat de kansberekening op Down syndroom bij de zwangere geïndividualiseerd kan worden. Bestudering van aanvullende echomarkers bij de screening op aneuploidie bij tweelingzwangerschappen is aan te bevelen, zodat het risico van de foetus op een dergelijke afwijking nog nauwkeuriger bepaald kan worden. Daarnaast is de introductie van een berekening van NT discordantie bij monochoriale tweelingen gewenst, zodat de voorspellende waarden hiervan berekend kunnen worden in een ongeselecteerde patiëntengroep. Tenslotte moeten de huidige serummarkers van de combinatietest en eventuele nieuwe serummarkers als voorspellers van een gecompliceerde zwangerschapsuitkomst bij tweelingen verder onderzocht worden.