

# Rapid aneuploidy detection in prenatal diagnosis The clinical use of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Proefschrift

ter verkrijging van

de graad van Doctor aan de Universiteit Leiden,

op gezag van Rector Magnificus prof. mr. P.F. van der Heijden,

volgens besluit van het college voor Promoties

te verdediging op donderdag 21 oktober 2010

klokke 16.15 uur

door

Elisabeth Marije Antoinette Boormans

geboren te Tilburg

in 1978

# CONTENTS

Chapter 1	General introduction	9
<b>PART I CLINICAL EVALUATION</b>		
Chapter 2	Comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and Karyotyping in Prenatal Diagnosis. <i>Obstet Gynecol</i> 2010;15:297-303	25
Chapter 3	The impact of rapid aneuploidy detection (RAD) in addition to karyotyping versus karyotyping on maternal quality of life. <i>Pren Diagn</i> 2010;30:425-433	41
Chapter 4	Individualized choice in prenatal diagnosis: the impact of karyotyping and standalone rapid aneuploidy detection on quality of life. <i>Accepted Pren Diagn</i>	59
Chapter 5	Economic evaluation of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification and karyotyping in prenatal diagnosis: results from the M.A.K.E. study.	75
<b>PART II PATIENTS' AND PHYSICIANS' PREFERENCES</b>		
Chapter 6	Karyotyping or rapid aneuploidy detection in prenatal diagnosis? The different views of users and providers of prenatal care. <i>BJOG</i> 2009;116:1396-99	95
Chapter 7	Patients' preferences for rapid aneuploidy detection or karyotyping in prenatal diagnosis.	105
Chapter 8	Aiming at multidisciplinary consensus: What should be detected in Prenatal Diagnosis? <i>Accepted Pren Diagn</i>	121
<b>PART III GENERAL DISCUSSION, CONCLUSION AND SUMMARY</b>		
Chapter 9	General discussion	147
Chapter 10	Summary	167
Chapter 11	Nederlandse samenvatting	177
	Authors and affiliations	187
	Acknowledgements	189
	About the author	192

# PROMOTIECOMMISSIE

## Promotores

Prof. dr. J.M.M. van Lith

Prof. dr. G.J. Bonsel (Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam)

## Copromotor

Dr. E. Birnie (Erasmus Universiteit, Rotterdam)

## Overige leden

Prof. dr. A.M. Stiggelbout

Prof. dr. E. Bakker

Prof. dr. T.H. Bui (Karolinska Institutet, Stockholm)

Prof. dr. N.J. Leschot (Academisch Medisch Centrum, Amsterdam)

Prof. dr. G.M.W.R. de Wert (Universiteit Maastricht, Maastricht)

This research was funded by an unconditional grant 945-27-047 from ZonMW, Den Haag

Publication of this thesis was supported by: Department of Obstetrics, LUMC, Leiden; J.E. Jurriaanse Stichting, Rotterdam; Ferring BV, Hoofddorp; MRC Holland, Amsterdam; and Medical Dynamics, Nieuwegein

# Chapter 11

Nederlandse samenvatting

---

# DOELSTELLING VAN DIT PROEFSCHRIFT

Prenatale diagnostiek wordt routinematig aangeboden aan alle zwangere vrouwen, die een verhoogd risico hebben op het krijgen van een kind met een chromosomale afwijking. Het doel van de prenatale diagnostiek is informatie te verstrekken over de aanwezigheid en de aard van chromosomale afwijkingen, zodat ouders een weloverwogen keuze kunnen maken over het verloop van de zwangerschap. Ouders kunnen hierna besluiten om de zwangerschap te beëindigen, maar zij kunnen ook regelingen treffen voor tijdige medische behandeling of psychische ondersteuning. Bovendien kunnen zij zich op de situatie voorbereiden.

De selectie van vrouwen met een hoger dan gemiddeld risico voor foetale chromosomale afwijkingen kan gebaseerd zijn op verschillende informatie: de hogere leeftijd van de moeder, een belaste familiegeschiedenis, afwijkende prenatale screening testen en dan wel afwijkende bevindingen bij echoscopisch onderzoek. In Nederland zijn de belangrijkste indicaties voor prenatale diagnostiek leeftijd van de moeder van 36 jaar en ouder, en een verhoogd risico op Down syndroom na een eerste trimester prenatale screening test. Prenatale diagnostiek voor deze indicaties is voor het grootste deel gericht op de detectie van het syndroom van Down.

Sinds bijna 50 jaar is karyotypering de diagnostische test die gebruikt wordt om foetale chromosomale afwijkingen te detecteren. Karyotypering is een zeer nauwkeurige test. Er zijn gekweekte cellen nodig om cellen in de metafase te kunnen beoordelen. Deze kweektijd leidt tot een wachttijd van twee tot drie weken voordat de cellen beoordeeld kunnen worden en een uitslag bekend is. Karyotypering is arbeidsintensief en leidt tot hoge kosten. Karyotypering kan zowel numerieke als structurele microscopische chromosomale afwijkingen detecteren. Soms worden zo chromosomale afwijkingen gedetecteerd die geen, lichte, onzekere of onduidelijke klinische consequenties hebben. Deze bevindingen leiden tot lastige counselinggesprekken en emotionele dilemma's voor ouders die moeten beslissen om de zwangerschap voort te zetten of te beëindigen.

In 2003, kwam MLPA beschikbaar, een nieuwe test die de meest voorkomende chromosomale afwijkingen (trisomie 13, 18, 21 en niet-mozaïek geslacht chromosomale afwijkingen) kan detecteren op ongekwakte vruchtwatercellen. Preklinische studies lieten een hoge sensitiviteit en specificiteit zien. De techniek leek veelbelovend en zou eventueel een vervanger kunnen zijn van de karyotypering. Er waren toen echter nog geen grote klinische vergelijkende studies beschikbaar om de vervanging te ondersteunen. Bovendien speelden ook andere aspecten dan de diagnostische kenmerken een rol: de

impact op de kwaliteit van leven van patiënten, de kosten en de voorkeur van patiënten en artsen. Daarom werd de M.A.K.E. (MLPA En Karyotypering, een evaluatie) studie opgezet, een landelijke studie waarin MLPA en karyotypering vergeleken worden in de klinische prenatale diagnostiek.

### Patiënten

Zwangere vrouwen werden in de M.A.K.E. studie geïnccludeerd als zij een vruchtwaterpunctie ondergingen op basis van hun leeftijd (36 jaar of ouder), of op basis van een verhoogd risico op het syndroom van Down na prenatale screening of op basis van ouderlijke angst. Vrouwen met andere indicaties (echoscopische afwijkingen, waaronder een nekplooidikte vanaf 3.5 mm, een ouder met een chromosomale afwijking, of een eerder kind met een chromosoomafwijking) voor een vruchtwaterpunctie werden niet geïnccludeerd, omdat zij een verhoogd risico op andere chromosomale afwijkingen hebben dan de meest voorkomende aneuploidieën. Deze andere chromosomale afwijkingen worden die niet gedetecteerd door MLPA, maar wel met karyotypering.

### Interventies

Voor de MLPA procedure werd 1 tot 8 ml, afhankelijk van de totale hoeveelheid ontvangen vruchtwater ontvangen, DNA geïsoleerd uit ongekweekte vruchtwatercellen. De commercieel verkrijgbare kit, de Salsa MLPA P095 (MRC Holland, Nederland) werd gebruikt. Voor elke target genoom, is een set van 2 probes ontworpen, die onmiddellijk naast elkaar hybridiseren op dezelfde target streng. Beide probes bestaan uit een korte target sequentie en een universele polymerase chain reaction (PCR) primer-bindende site. Een van de probes bevat een stuffer sequentie met een unieke lengte en volgorde. Na hybridisatie, wordt elk paar aangrenzende probes verbonden door een ligatiereactie. Vervolgens wordt de PCR uitgevoerd met behulp van een fluorescent gelabeld primerpaar, dat ervoor zorgt dat de relatieve opbrengst van elk van de PCR-producten evenredig is met de hoeveelheid van de target sequenties. De verschillende producten worden op basis van hun lengte gescheiden op een geautomatiseerde capillaire sequencer. De grootte en de maximale oppervlakte voor elke probe worden gekwantificeerd en geanalyseerd met behulp van software (GeneMarker, SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA of Genescan en Genemapper versie 3.7/4.0, Applied Biosystems, CA, USA). Relatieve probe signalen worden berekend en vergeleken ten opzichte van monsters van normaal mannelijk en vrouwelijk geslacht. Als er een normale hoeveelheid chromosomen aanwezig is, zal het relatieve probe signaal naar verwachting 1 zijn. Een normale waarde wordt gedefinieerd als een relatief probe-sigitaal tussen de 0,7 en 1,3. Een relatieve waarde van  $<0,7$  duidt op een monosomie, terwijl een relatieve waarde van  $> 1,3$  wijst

op een trisomie. MLPA detecteert geen laaggradig mosaïcisme. Voor karyotypering, de standaardtest, worden foetale cellen gekweekt en in de metafase onderzocht. Daarna worden ze gekleurd voor chromosomale bandering. Routinematig worden 10 kolonies onderzocht. Alle deelnemende centra volgden de nationale kwaliteitseisen. Kleine verschillen in het aantal gekweekte cellen, de manier van kleuren en de rapportage van de resultaten waren toegestaan.

## RESULTATEN VAN DE M.A.K.E. STUDIE

### Diagnostische nauwkeurigheid (hoofdstuk 2)

In een nationaal vergelijkende cohort studie werden 4585 vruchtwater monsters onderzocht. Alleen vrouwen die een vruchtwaterpunctie ondergingen op basis van hun leeftijd (75,6%), een verhoogd risico na prenatale screening (23,4%) of angst (1%) werden geïncludeerd. Vruchtwater monsters werden onafhankelijk getest met zowel MLPA als karyotypering. In 4484/4585 monsters (97,8%) kwamen karyotypering en MLPA overeen. Bij 4386 van de 4585 samples (95,7%) was er sprake van een normaal resultaat en bij 98 van de 4585 (2,1%) was er een aneuploidie. Bij 26 van de 4585 (0,6%) werden discordante resultaten gevonden; karyotypering liet een abnormaal karyotype zien dat niet gedetecteerd kon worden door MLPA. De diagnostische accuratesse van MLPA was 1.0 (95% betrouwbaarheidsinterval 0.99 tot 1.0), de sensitiviteit was 100% (95% betrouwbaarheidsinterval 0.96 tot 1.0) en de specificiteit 100% (95% betrouwbaarheidsinterval van 0.999 tot 1.0). De diagnostische accuratesse van MLPA was statistisch vergelijkbaar (noninferieur) met die van karyotypering ( $P < 0.001$ ). In 75 gevallen gaf MLPA geen uitslag (1,6%); karyotypering gaf een keer geen uitslag (0,02%). Vergeleken met karyotypering, verkortte MLPA de wachttijd met 14.5 dagen ( $p < 0.001$ , 95% betrouwbaarheidsinterval 14.3-14.6).

### Kwaliteit van leven (hoofdstuk 3 en 4)

In de eerste studie werden angst, persoonlijke controle, stress en gezondheidgerelateerde kwaliteit van leven gemeten met behulp van gevalideerde vragenlijsten. Resultaten werden vergeleken van vrouwen die alleen een karyotype kregen ( $n = 132$ ) en vrouwen die zowel een MLPA en karyotypering kregen ( $n = 181$ ). Er waren geen systematische verschillen in de tijd van de gecombineerde strategie versus karyotypering alleen in angst ( $p = 0.91$ ), algemene fysieke gezondheid ( $p = 0.76$ ,  $p = 0.46$ ), algemene geestelijke gezondheidszorg ( $p = 0.52$ ,  $p = 0.72$ ), persoonlijke controle ( $p = 0.91$ ), en stress ( $p = 0.13$ ). De gecombineerde strategie verminderde angst en stress twee weken eerder in

vergelijking met karyotypering. Concluderend verminderde MLPA met karyotypering angst en stress op de korte termijn, maar beïnvloedde het de totale angst, stress, persoonlijke controle, en generieke gezondheid niet in vergelijking met alleen karyotypering. In de tweede studie werd de impact van standalone MLPA en karyotypering beoordeeld, nadat vrouwen een keuze was aangeboden tussen MLPA en karyotypering. Opnieuw werden angst, persoonlijke controle, stress en gezondheidgerelateerde kwaliteit van leven gemeten met behulp van gevalideerde vragenlijsten. Ook werden de redenen en overwegingen van vrouwen in kaart gebracht bij de keuze tussen standalone MLPA (n=61) en karyotypering (n=68). De meest genoemde reden om voor karyotypering te kiezen was het krijgen van zoveel mogelijk informatie, terwijl de korte wachttijd voor standalone MLPA werd genoemd. Prenatale screening (OR 7,09), onbekend zijn met karyotypering (OR 4,2) en een niet klein en niet groot ervaren risico op chromosomale afwijkingen (OR 3,6) was geassocieerd met het kiezen van standalone MLPA. Er waren geen systematische verschillen in de tijd tussen karyotypering en standalone MLPA in angst ( $p = 0.11$ ), algemene lichamelijke en geestelijke gezondheid ( $p = 0.94$ ,  $p = 0.52$ ,  $p = 0.66$ ,  $p = 0.07$ ), persoonlijke gepercipieerde controle ( $p = 0.69$ ), en stress ( $p = 0.66$ ). Concluderend, heeft de keuze tussen karyotypering en standalone RAD geen invloed op angst, stress, persoonlijke controle, en generieke gezondheid.

## 182

### Kosten (hoofdstuk 5)

Dit hoofdstuk beschrijft de vergelijking van de kosten van MLPA en karyotypering. Alleen vrouwen die een vruchtwaterpunctie ondergingen op basis van hun leeftijd ( $\geq 36$  jaar), een verhoogd risico na prenatale screening of angst werden geïncludeerd. Wij gebruikten de klinische gegevens en gerealiseerde zorg op basis van de klinische MAKE studie. De kosten-minimalisatieanalyse toonde aan dat MLPA op de korte termijn (de tijd vanaf de vruchtwaterpunctie tot aan de beslissing de zwangerschap te beëindigen) € 315,68 (95% CI: € 315,63 tot € 315,74; -44,4%) per sample minder kost vergeleken met karyotypering. Op de lange termijn - dit is de tijd vanaf de beslissing om de zwangerschap voort te zetten of te beëindigen - is MLPA € 76,42 (95% CI: 71,32 tot 81,52; +8,6%) duurder per monster. Als de korte en lange termijn worden samengenomen, is MLPA € 240,13 (bootstrap 95% CI: 235,02 tot 245,23; -14,9%) per monster goedkoper. De kosten werden beïnvloed door het aantal zwangerschapsafbrekingen, de hoeveelheid monsters en de hoeveelheid laboratoria. Vanuit een economisch perspectief, heeft de MLPA strategie de voorkeur bij vrouwen die een vruchtwaterpunctie te ondergaan wegens van hun leeftijd, na prenatale screening of wegens angst.



### Voorkeuren van patiënten (hoofdstuk 6 en 7)

De voorkeuren van patiënten werden onderzocht in twee hoofdstukken. In hoofdstuk 5 hebben we de voorkeuren van patiënten gemeten voor drie strategieën (een test op trisomie 21, een test op trisomies 13, 18, 21, X en Y, en een test vergelijkbaar met karyotypering). De detectie capaciteit, de gevolgen van het resultaat indien een afwijking werd geconstateerd en de wachttijd op het testresultaat werden beschreven. We nodigden 150 zwangere vrouwen uit die een vruchtwaterpunctie ondergingen op basis van hun leeftijd (84,1%), een verhoogd risico na prenatale screening (11,5%) of vanwege angst (2,7%). Vijfenzeventig procent (113/150) vulde de vragenlijst in. Vrouwen gaven de voorkeur aan de test die lijkt op karyotypering (50,4%) of aan RAD techniek (43,4%). Een minderheid van de vrouwen koos voor de test op syndroom van Down. In hoofdstuk 7 evalueerden we patiënten preferenties en werd bepaald welke testeigenschappen van invloed zijn op de voorkeur met behulp van een discrete choice experiment. Zwangere vrouwen die voor prenatale counseling naar het ziekenhuis gingen werden uitgenodigd om deel te nemen. In totaal namen 103/118 (87%) vrouwen deel. Vrouwen waardeerden de detectie van chromosomale afwijkingen met ernstige gevolgen voor hun kind het meest ( $P < 0.01$ ). Het percentage niet gelukte testen, de wachttijd en de ervaren angst beïnvloedden de voorkeuren van vrouwen significant ( $p < 0.05$ ). Voor de huidige beschikbare testen, verkozen vrouwen karyotypering boven RAD ( $p < 0.01$ ) als de gedetecteerde chromosomale afwijkingen maar ernstige gevolgen hadden voor hun kind. Als karyotypering chromosomale afwijkingen detecteert met onzekere of geen klinische gevolgen voor hun kind, gaven vrouwen de voorkeur aan RAD ( $p < 0.01$ ). Angst en wachttijd hadden een gering effect op de voorkeuren van vrouwen, maar de mogelijke klinische gevolgen van de gedetecteerde chromosomale afwijking en het percentage niet gelukte testen beïnvloedden de keuze het meest. Omdat RAD en karyotypering allebei de meest voorkomende chromosomale afwijkingen detecteren met ernstige gevolgen, zijn beide testen geschikt voor prenatale diagnostiek.

### De voorkeuren van experts (hoofdstuk 6 en 8)

In twee hoofdstukken bespreken we de mening van zorgverleners over karyotypering en MLPA. In hoofdstuk 6 hebben we de zorgverleners voorkeuren onderzocht voor drie testen (een test op trisomie 21, een test op trisomies 13, 18, 21, X en Y, en een test overeenkomend met karyotypering). De detectie capaciteit, de gevolgen van het resultaat als een afwijking werd geconstateerd en de wachttijd voor het testresultaat werden beschreven. We nodigden 140 zorgverleners uit die betrokken zijn bij prenatale diagnostiek. Dat waren verloskundigen, vroedvrouwen, klinisch

genetici, klinisch cytogeneticists en huisartsen. Van de zorgverleners (70% vrouwen; gemiddelde leeftijd 44 jaar, 26 tot 63 jaar), antwoordde 55% (77/140) op de vragenlijst. Het merendeel gaf de voorkeur aan voor een RAD test (77.9%), terwijl de resterende voorkeuren voor de andere testen gelijk waren verdeeld (10.4%). In hoofdstuk 8 werd gestreefd naar consensus tussen prenatale experts over welke chromosomale afwijkingen wel en niet gedetecteerd moeten worden in de prenatale diagnostiek. Een deskundig panel van 24 prenatale experts (8 klinische cytogenetici, 8 klinisch genetici en 8 verloskundigen) stemden over 15 chromosomale afwijkingen in twee individuele anonieme rondes en een gezamenlijke bijeenkomst. De experts moesten voor of tegen detectie stemmen. Consensus werd gedefinieerd als minstens 80% van de deskundigen het eens was. Consensus werd bereikt in 12 van 15 gevallen. In 10 gevallen werd er voor detectie gestemd en in twee gevallen tegen detectie. Aan het einde van de 3de ronde bleef er voor drie afwijkingen dissensus bestaan. Experts zijn het eens dat chromosomale afwijkingen met ernstige gevolgen gedetecteerd moeten worden en chromosomale afwijkingen zonder klinische consequenties niet gedetecteerd moeten worden. Voor chromosomale afwijkingen met milde of onzekere uitkomsten werd geen consensus bereikt. Geen van de momenteel beschikbare testen (MLPA en karyotypering) komen overeen met de eisen van alle experts, tenzij men bij karyotypering non-disclosure toepast voor bepaalde onzekere bevindingen.

## CONCLUSIES

In hoofdstuk 9 worden de bevindingen van dit proefschrift besproken, de klinische implicaties gegeven en worden aanbevelingen gedaan voor toekomstig onderzoek. De resultaten van dit proefschrift laten zien dat MLPA een zeer nauwkeurige test is voor de detectie van trisomie 13, 18, 21, X en Y. MLPA is vergelijkbaar (noninferieur) met karyotypering, geeft een vergelijkbare kwaliteit van leven en een significante kostenreductie. Men kan beredeneren op grond van besliskundige overwegingen en de uitkomsten uit de M.A.K.E. studie dat er 2 primaire varianten zijn waarin MLPA en of TKT kunnen worden toegepast: hetzij karyotypering, hetzij RAD gevolgd door karyotypering bij een positieve RAD uitslag.

MLPA gevolgd door karyotypering in geval van een chromosomale afwijking, leidt ten opzichte van karyotypering tot een aanzienlijke kostenverlaging met weinig verlies van informatie. Deze optie is te verdedigen indien maatschappelijk één variant de voorkeur

heeft: de meerkosten voor de detectie van de zeldzame ernstige afwijking die alleen met karyotypering wordt vastgesteld ligt boven de 350.000 euro per afwijking.

Men kan ook van mening zijn dat de keuze aan de ouders moet zijn, ongeacht de kosten. In onze preferentiestudie waren de meningen van zwangere vrouwen bijna gelijkwaardig verdeeld tussen RAD en karyotypering. Zorgverleners (verloskundigen, klinisch genetici, klinisch cytogenetici, verloskundigen en huisartsen) geven de voorkeur aan RAD boven karyotypering. Wanneer prenatale experts moeten stemmen over realistische klinische gevallen, zijn zij het erover eens dat alle chromosomale afwijkingen met ernstige gevolgen gedetecteerd dienen te worden en chromosomale afwijkingen zonder gevolgen niet gedetecteerd moeten worden. Wij prefereren de invoering van een vrije individuele keuze in de prenatale diagnostiek. Zo kunnen ouders, verantwoordelijk voor de zorg van hun kind besluiten na niet-directieve counseling welke test voldoet aan hun individuele behoefte en risico. Toekomstig onderzoek moet zich richten op veelbelovende toekomstige technieken, zoals microarray analyse en niet-invasieve prenatale diagnostiek.

In klinische vergelijkende studies moeten de voorkeuren van patiënten en de ethische discussie worden opgenomen. Toekomstig onderzoek moet de haalbaarheid van gedeelde besluitvorming in de klinische praktijk evalueren en zich richten op de ontwikkeling van duidelijke en gestructureerde informatie voor patiënten en artsen.