




In the name of God

به نام خداوند جان آفرین



MATERNA SERUM MARKER ANEUPLOIDY SCREENING TEST

A.HOSSEINI MD.AP.CP PATHOLOGIST

- 
- **Aneuploidy:** presence of one or more extra chromosomes or the absence of one or more chromosomes

The increased risk of fetal aneuploidy: increasing maternal age

fetal aneuploidy can affect any pregnancy, all pregnant women should be offered screening.

- • Down Syndrome Trisomy 21
- • Trisomy 18 (Edwards synd.)
- • Trisomy 13 (Patau synd.)

- Turner syndrome
- **Smith-Lemli-Opitz Syndrome(SLOS)**

TRISOMY 21: DOWN SYNDROME

Incidence: 1 in 700 births

Karyotypes:
 Trisomy 21 type: 47,XX,+21
 Translocation type: 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21
 Mosaic type: 46,XX/47,XX,+21

Labels: Mental retardation, Abundant neck skin, Epicanthic folds and flat facial profile, Simian crease, Congenital heart defects, Intestinal stenosis, Umbilical hernia, Predisposition to leukemia, Hypotonia, Gap between first and second toe.

TRISOMY 18: EDWARDS SYNDROME

Incidence: 1 in 8000 births

Karyotypes:
 Trisomy 18 type: 47,XX,+18
 Mosaic type: 46,XX/47,XX,+18

Labels: Prominent occiput, Mental retardation, Micrognathia, Low set ears, Short neck, Overlapping fingers, Congenital heart defects, Renal malformations, Limited hip abduction, Rocker-bottom feet.

TRISOMY 13: PATAU SYNDROME

Incidence: 1 in 15,000 births

Karyotypes:
 Trisomy 13 type: 47,XX,+13
 Translocation type: 46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)
 Mosaic type: 46,XX/47,XX,+13

Labels: Microphthalmia, Polydactyly, Microcephaly and mental retardation, Cleft lip and palate, Cardiac defects, Umbilical hernia, Renal defects, Rocker-bottom feet.

Figure 6-15 Clinical features and karyotypes of the three most common autosomal trisomies.



► **First-trimester combined screening:**

- between 10 and 13 weeks' gestation
- detects 82% to 87% of trisomy 21 (Down syndrome)

► **Second-trimester serum quadruple screening:**

between 15 and 22 weeks' gestation
detects 81% of trisomy 21 cases.

► **Combinations** of these tests :improve detection rates

- integrated or serum integrated,
- stepwise sequential,
- contingent sequential screening

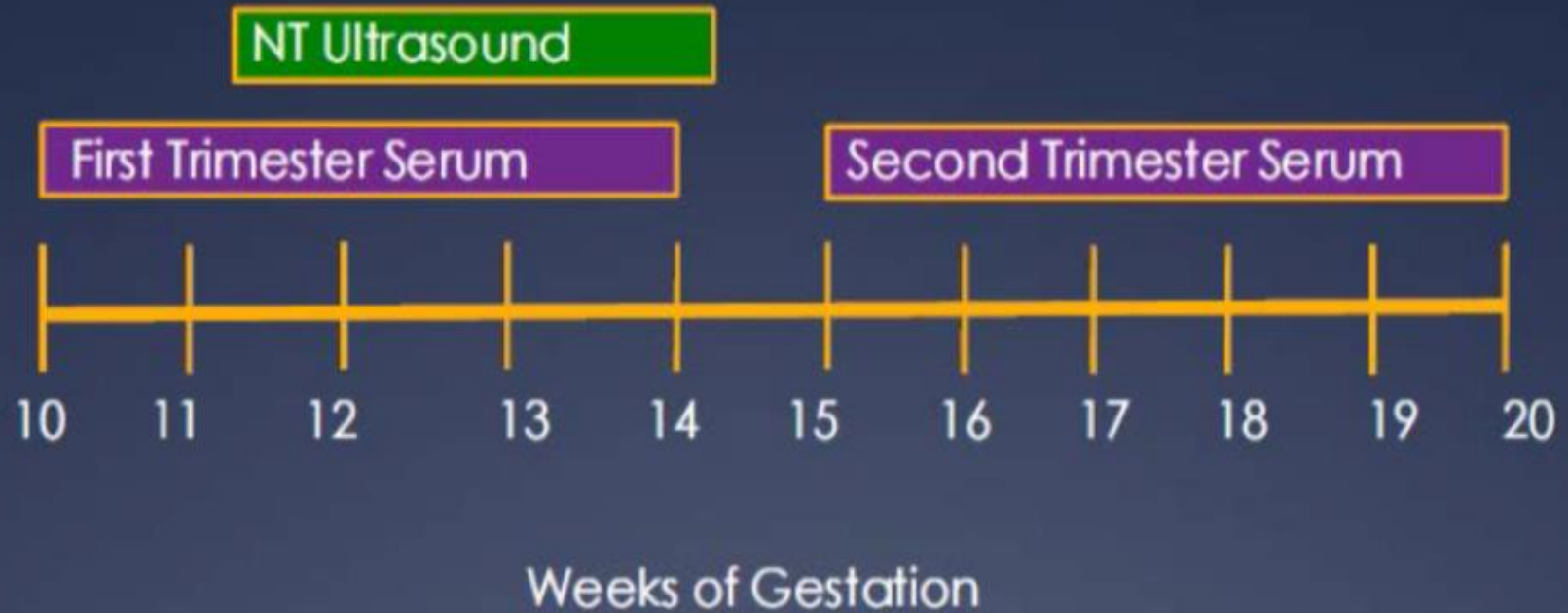
► **Fetal cell-free DNA testing (noninvasive prenatal testing):**

performed at or after 10 weeks' gestation
detects more than 99% of trisomy 21 cases



► **Diagnostic tests** following a positive screening:

- chorionic villus sampling: between 10 and 13 weeks' gestation or
- amniocentesis : after 15 weeks' gestation

Screening Timeline



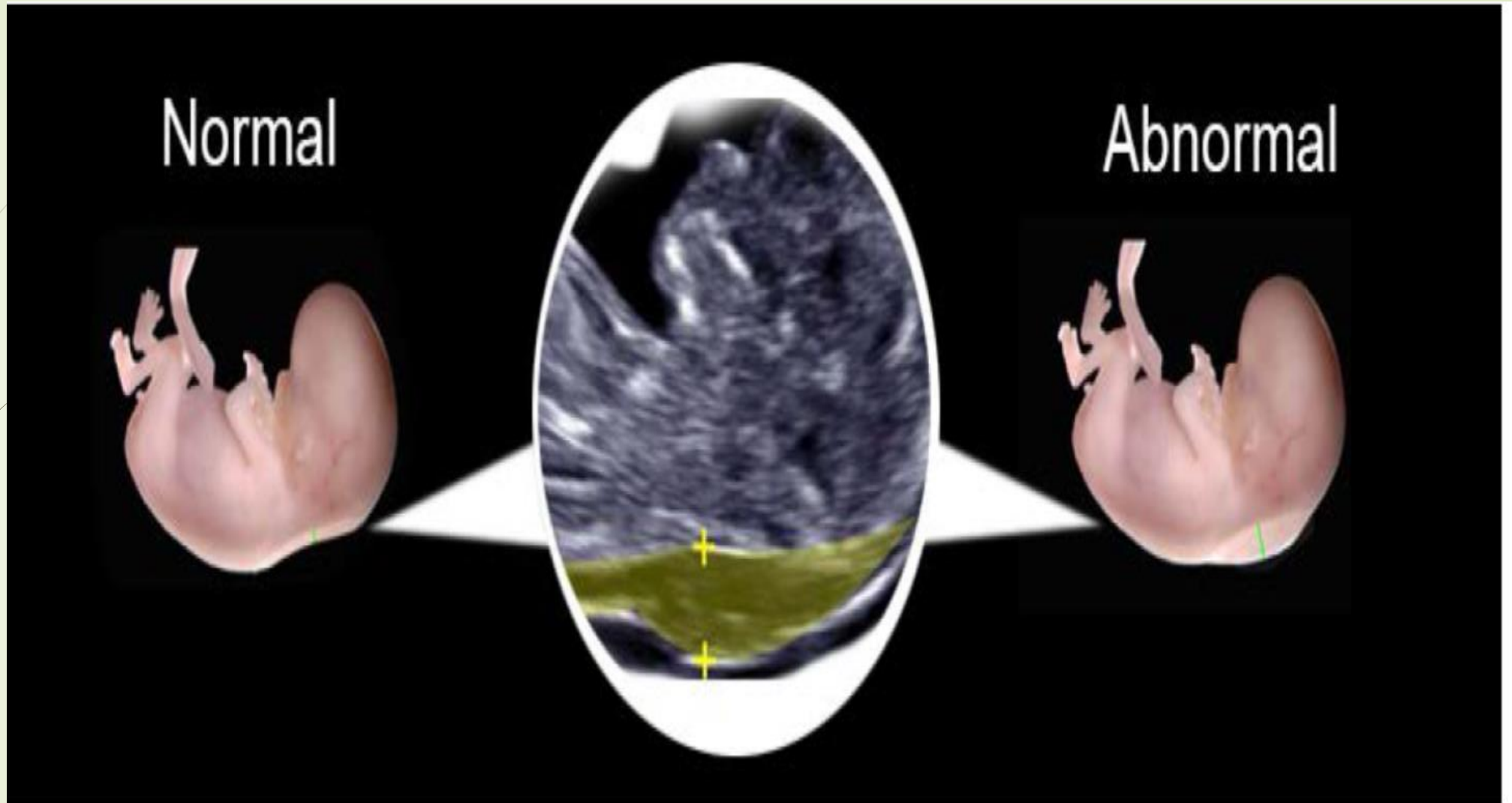
شکل (۱). هفته‌های مناسب برای انجام تست غربالگری در سه ماهه اول و دوم

- 
- 
- Free β HCG
 - PAPP-A
 - Nuchal Translucency

 - Maternal Serum AFP
 - β -hCG
 - Inhibin-A
 - Unconjugated Estriol (uE3)

سه ماهه اول: ▶

سه ماهه دوم: ▶



شکل (۲). ضخامت پشت گردن در حالت نرمال و غیر نرمال

- Nuchal translucency , NT

- ▶ characteristic of fetal chromosomal and structural abnormalities
- ▶ detection rate of 64% to 70% for Down syndrome, trisomy 18, trisomy 13, and Turner's syndrome.
- ▶ میزان ضخامت اندازه گیری شده ی فضای آزاد بین پوست و بافت نرم پوشاننده ستون فقرات گردن (پس سر) جنین اطلاق میگردد.
- ▶ از 10 هفته و 5 روز الی 14 هفته توسط سونوگرافر اندازه گیری می گردد.

Free β -subunit of hCG

- ▶ -predominant form throughout pregnancy: intact hCG α - β dimer
 - a small quantity of free β -subunit: in the first trimester.
 - Free α subunit :appears in the second trimester and increases in the last trimester
- ▶ Free β -hCG در واقع فرم آزاد هورمون β -hCG بوده که از تروفوبلاست جنینی ترشح شده که مانع از تحلیل جسم زرد در بارداری می گردد.
- ▶ در سه ماهه اول، صحت بیشتری برای شناسایی سندرم داون دارد و نیز نقش مهمی در نگهداری جنین دارد.
- ▶ در سیگاری ها 10 درصد کاهش می یابد.

PAPP-A

▶ - pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) : a glycoprotein produced by the trophoblast

▶ در تروفوبلاست جنینی به ویژه خارج پرزوي تولید میشود که سبب تحریک نقش تهاجمی برای لانه گزینی می شود.

▶ در سیگاری ها 15-20 درصد کاهش می یابد.

▶ سطح سرمی PAPP-A در هر دو بیماری سندرم داون و تریزومی 18 بسیار کاهش مییابد و میانگین MOM آن برای سندرم داون به 0.44 و در تریزومی 18 به 0.32 میرسد.

▶ در مشکلات جفتی، پره اکلمپسی و IUGR کاهش می یابد.

DOWN SYNDROME

► All women should be offered screening for fetal chromosomal abnormalities before age 20 weeks, regardless of maternal age

► **First-trimester screening**, between 12 and 13 weeks,

With two maternal serum analytes: detection rate to 82% to 87%.

- free β -subunit of hCG : elevated to 1.98 MoM

- pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) : reduced to 0.48 MoM


- Maternal age

► 20-29 سال 1 در 1500

► 39-30 سال 1 در 900

► 49-40 سال 1 در 100

► increased risk of aneuploidy or advanced maternal age (age 35 or greater at the time of delivery) on first-trimester screening should be offered genetic counseling and the option of diagnostic testing, such as chorionic villous sampling or second-trimester amniocentesis




نوع تریزومی	Free β -hCG	PAPP-A	NT
تریزومی ۲۱	↑	↓	↑
تریزومی ۱۸/۱۳	↓	↓	↑

- ▶ با وجود اینکه شیوع تولد تریزومیهای 13 و 18 در مقایسه با سندرم داون به طور قابل توجهی پایین است (1 به 5000 در مقایسه با 1 به 650 در سندرم داون)، احتمال رخداد این تریزومیها در بین هفته های 11 تا 13 (سه ماهه اول) به طور قابل توجهی بالاتر (1 به 800 در مقایسه با 1 به 400 در سندرم داون) است.
- ▶ ریسک تریزومی 18 با نرخ شناسایی 80% به ازای 1% مثبت کاذب با استفاده از سن مادر همراه با PAPP-A , Free β -hCG, NT، محاسبه می گردد.
- ▶ تریزومی 13 یک ناهنجاری کروموزومی جدی است که شیوع تولد نوزاد به مراتب کمتر از تریزومی 18 دارد (حدوداً 1 در 10.000).
- ▶ ریسک محاسبه شده برای تریزومی 13 به اندازه سندرم داون قابل اعتماد نیست.



cell-free fetal DNA

- ▶ In 2012, ACOG guidelines ,noninvasive fetal screening test on maternal plasma
- ▶ Indications
 - maternal age 35 or greater at delivery
 - increased risk for aneuploidy on another screening test,
 - history of previous pregnancy with aneuploidy
 - Parental balanced robertsonian translocation with increased risk of fetal trisomy 13 or 21
- ▶ can identify approximately 98% of cases of Down syndrome with a false-positive rate of less than 0.5%



cell-free Fetal DNA testing (noninvasive prenatal testing):

- ▶ performed at or after 10 weeks' gestation
- ▶ detects more than 99% of trisomy 21 cases ,
- ▶ with a lower false-positive rate than traditional first-or second-trimester screening methods.
- ▶ similar detection rates in high- and low-risk populations
- ▶ lower positive predictive values in younger women.

- ▶ primary screening or as a follow-up test to abnormal findings on first- or second-trimester screenings

second-trimester triple or quadruple screen

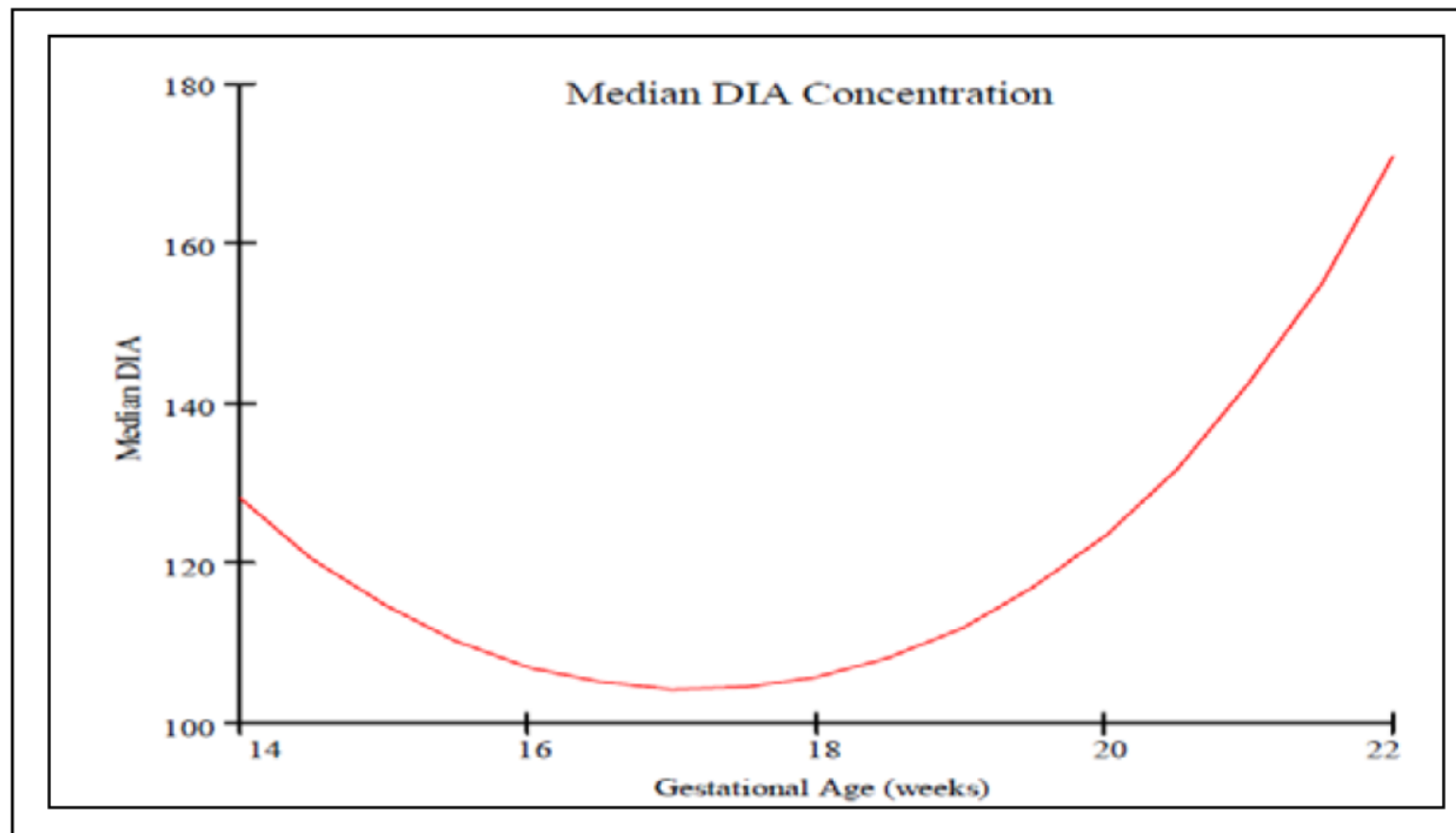
- ▶ MSAFP, hCG, unconjugated estriol and inhibin A
- ▶ between 15 and 20 weeks
- ▶ In pregnancies with Down syndrome:
 - The level of MSAFP is reduced to 0.74 MoM
 - The uE3 level to 0.75 MoM,
 - hCG is increased to 2.06 MoM
 - The level of inhibin A: increased to 1.77 MoM

The detection rate of triple screen can be improved from 69% to 81% by adding the inhibin A (quadruple screen)

Inhibin A

dimeric protein produced by placenta and fetus.

با مصرف سیگار و در پره اکلمپسی افزایش می یابد. ➤



شکل (۱۰). نحوه توزیع مقادیر Inhibin-A با افزایش هفته بارداری

Low UE3 level

- کمبود آروماتاز
- هیپرپلازی مادرزادی آدرنال
- نارسایی آدرنال جنین اولیه یا ثانویه (مصرف کورتیکواستروئید توسط مادر)
- مرگ جنین

UNCONJUGATED ESTRIOL [uE3]

- Estriol as it's name implies, is an estrogen with 3 hydroxyl groups [at position 3,16, & 17].

3 organs involved in the biosynthesis

1. Fetal adrenal - **Cholesterol**
2. Fetal liver - **DHEAs[DehydroEpiAndrosteroneSulfate]**
3. Placenta - **Estriol**

Only a minor amount [9%]of the hormone circulates in plasma unconjugated.

AFP

- ▶ produced initially by the fetal yolk sac and later by the fetal liver
- ▶ the most abundant protein in fetal serum.
- ▶ concentration increases in both fetal serum and amniotic fluid until about 13 weeks' gestation
- ▶ AFP concentration in AF 100-fold less than in fetal serum.
- ▶ Amniotic fluid AFP peaks at 13 to 14 weeks and decreases in the second trimester by about 10% per week.
- ▶ concentrations of AFP in maternal serum (MS): 1000-fold less than in AF
- ▶ MSAFP levels increase by approximately 15% per gestational week ,while AF levels are decreasing
- ▶ nonpregnancy level of 0.2 ng/mL to about **250 ng/mL** at 32 weeks



- ▶ Maternal weight:

MSAFP concentration decreases with increasing maternal weight

- ▶ Race: African American women have MSAFP values 10% to 15% higher than those of Caucasian women

- ▶ Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM):

MSAFP in IDDM 20% lower than in the general population; MoM values must be adjusted upward

- ▶ Multiple gestation (e.g., twins): higher MSAFP levels, proportional to the number of fetuses

Screening for fetal defects is not as reliable as for single pregnancies

NTD detection rate is lower for multiple pregnancies than for single ones

- ▶ Gestational age determination: essential to establish a valid MoM value

The most common reason for abnormal MSAFP screening results is incorrect estimation of gestational age

initially dated using ultrasound, the sensitivity and specificity of the screening are accurate

- ▶ Fetal viability: Fetal demise raises the MSAFP levels, no diagnostic value



Adjustments

- ▶ the multiple of median for special populations
- ▶ Twin pregnancy :
serum concentrations of each biomarker are approximately double
cannot be interpreted in higher-order multiples.
- ▶ In pregestational diabetes:, MSAFP, E3, and inhibin A levels are reduced.
- ▶ As body weight increases, analyte levels decrease
- ▶ In smokers, MSAFP and inhibin A levels are higher, while UE3 and hCG levels are lower



Neural tube defects (NTDs)

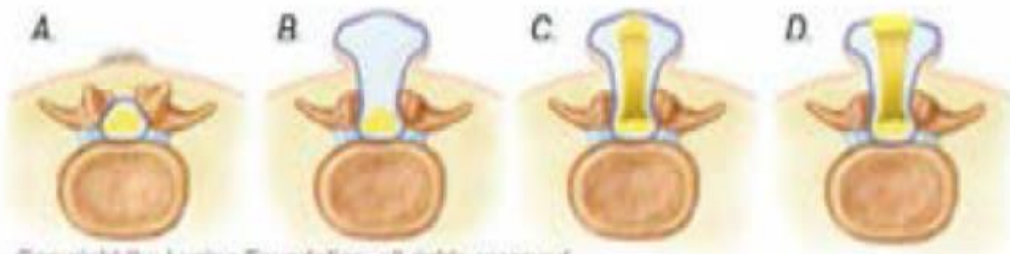
- ▶ 1 per 1000 pregnancies
- ▶ increased risk of recurrence: 1-3%
- ▶ spina bifida, lumbar (or cervical) meningocele,
 - open in 80% of cases: completely uncovered or covered only by a very thin membrane, maternal serum screening will detect only open defects.
 - closed (covered by skin or a thick membrane)
- ▶ All pregnant women should be offered second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein (MSAFP) screening at 15 to 20 weeks gestational age.

Cyst on baby's back from spina bifida

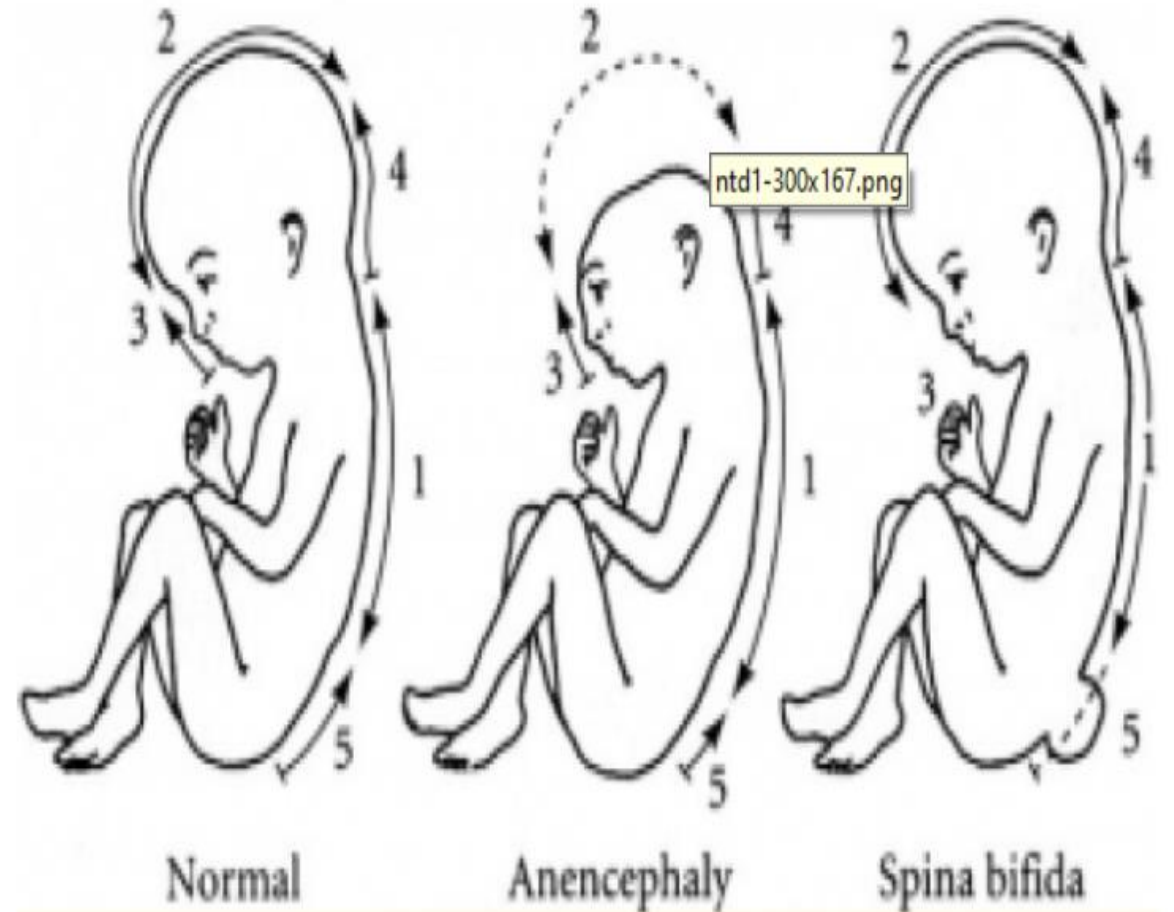


Normal newborn vertebra



- A. Spina bifida occulta
- B. Spina bifida with meningocele
- C. Spina bifida with meningomyelocele
- D. Spina bifida with myeloschisis





Copyright the Lucina Foundation, all rights reserved.



شکل (۱۲). تصاویر جنین مبتلا به انواع نقص لوله‌های عصبی

- 
- 
- ▶ **Multiples of the median (MoM)** :comparison of serum AFP levels from pregnant women in the midtrimester of pregnancy versus median AFP values from women with normal fetuses at comparable gestational ages
 - ▶ MSAFP levels greater than 2.5 times the normal median for singleton pregnancies.
 - ▶ cutoff at 2.0 to 2.5 MoM, detection rate is about 85% of all NTDs with a false-positive rate less than 5%
 - ▶ Only 2% of all women with positive test; affected fetuses.
 - ▶ ultrasound :Normal findings indicate further evaluation, and the patient should be offered diagnostic amniocentesis to determine the amniotic fluid AFP and the fetal karyotype
 - ▶ Acetylcholinesterase (AChE)

- 
- 
- ▶ The presence of AChE and elevated AFP are diagnostic for fetal NTDs
 - ▶ other fetal defects with increased AFP:
 - open ventral wall defects (gastroschisis and omphalocele)
 - congenital nephrosis, benign obstructive uropathy,
 - fetal skin anomalies.
 - ▶ Placental abnormalities can result in elevated MSAFP levels
 - ▶ Elevated MSAFP without genetic or congenital problem:
threatened abortion, low birth weight, preeclampsia, oligohydramnios

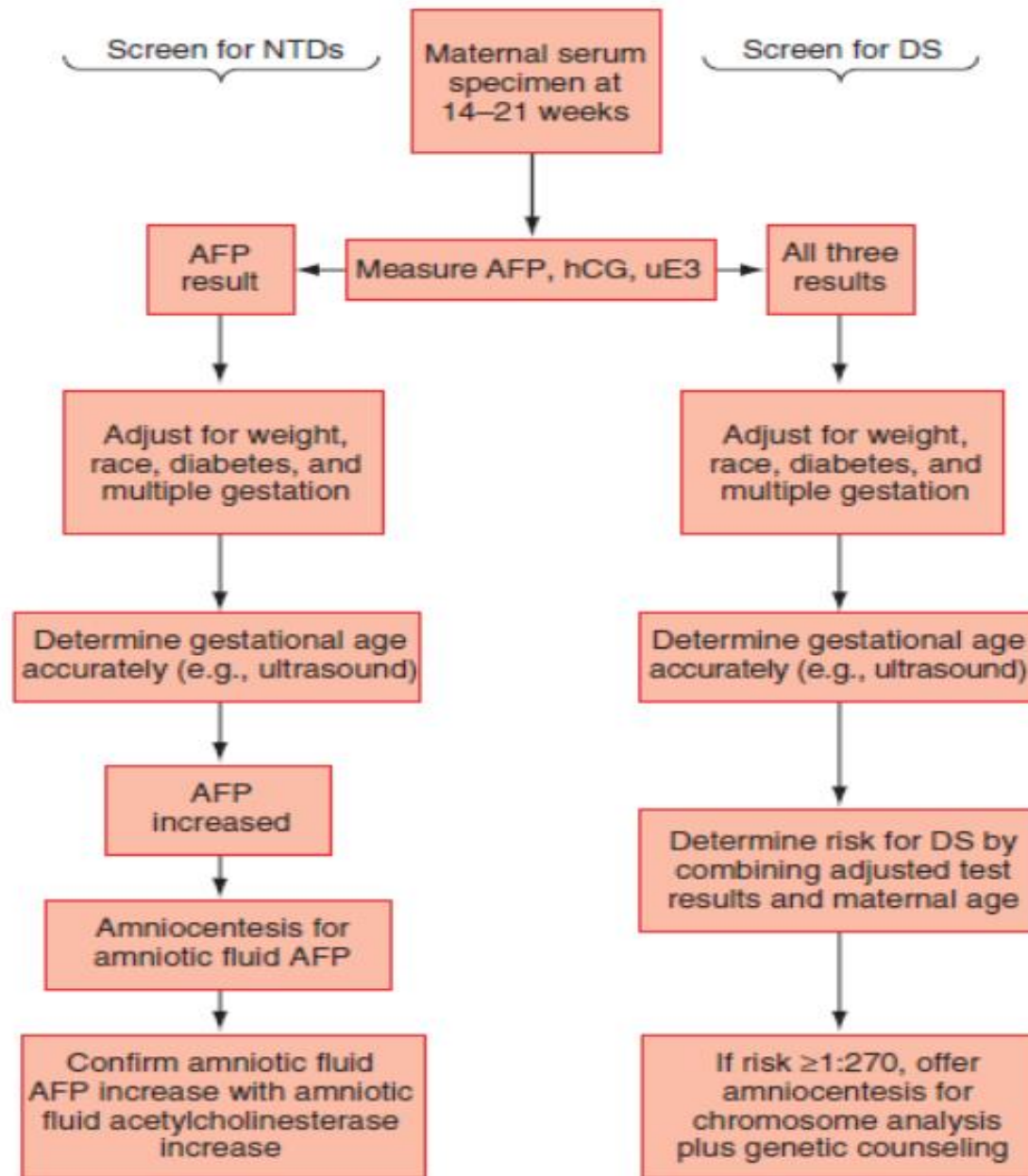
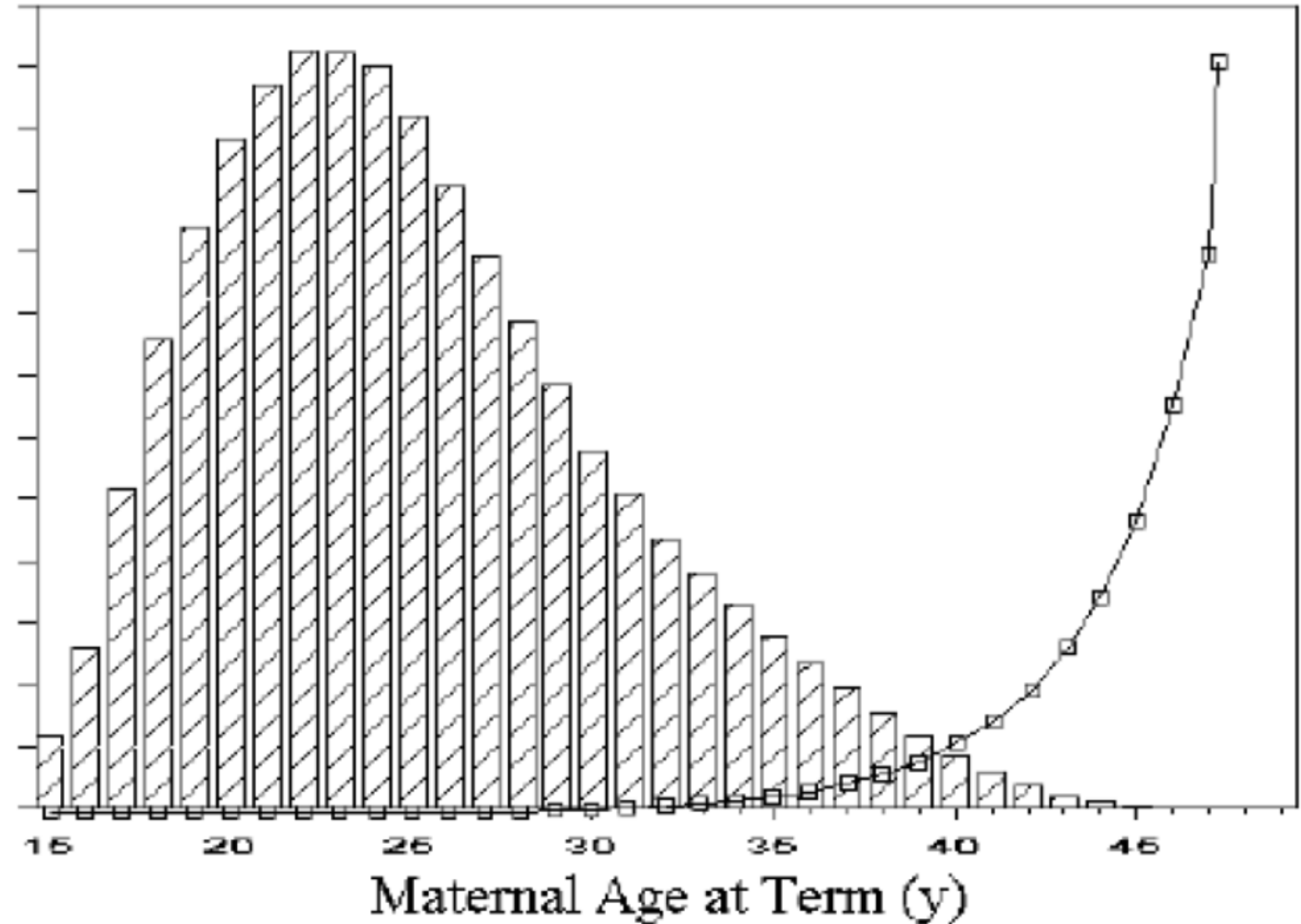


Figure 25-9 A diagnostic algorithm for the simultaneous screening of fetuses for neural tube defects (NTDs) and Down syndrome (DS). AFP, α -Fetoprotein; hCG, human chorionic gonadotropin; uE3, unconjugated estriol.

ریسک سندرم داون

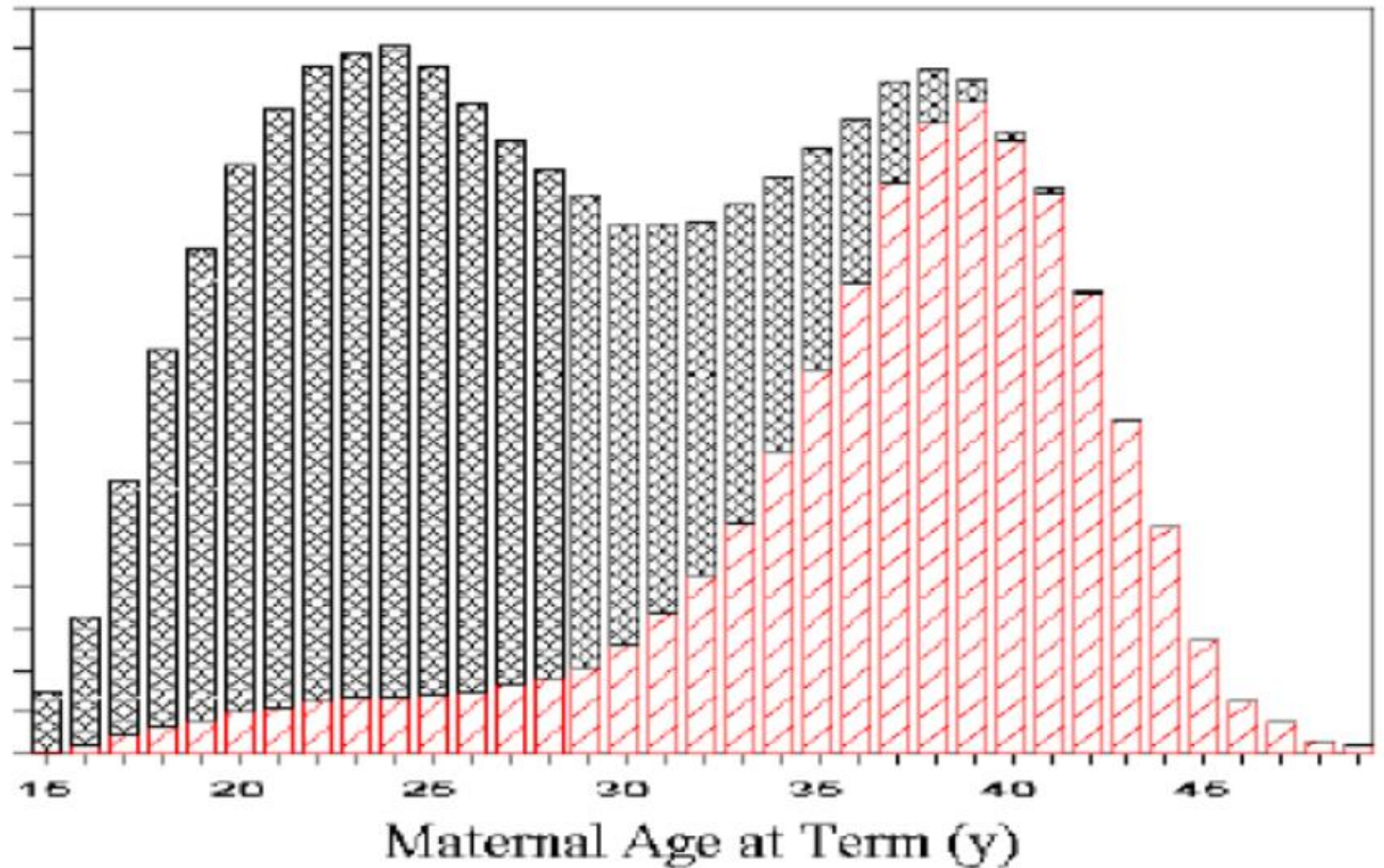
- ▶ خانمهای باردار با ریسک بارداری بیشتر از 1:250 به عنوان ریسکهای مثبت در غربالگری شناخته میشوند
- ▶ به طور معمول، سندرم داون با کاهش سطح سرمی UE3 و AFP و افزایش سطح سرمی Inhibin-A و hCG همراه میشود
- ▶ سطح سرمی hCG در سندرم داون حدوداً دو برابر سطح سرمی در حاملگیهای معمول در بین هفته های 15 تا 22 است.
- ▶ AFP: سطح میانه در حاملگیهای مبتلا به سندرم داون 0.73 حاملگیهای سالم بوده است.
- ▶ Inhibin A: در حاملگی های سندرم داون 1.79 برابر بالاتر از حاملگیهای سالم است.
- ▶ UE3 : 0.75 MOM

Distribution of Live Births by Age at Term, and Risk of Down's Syndrome

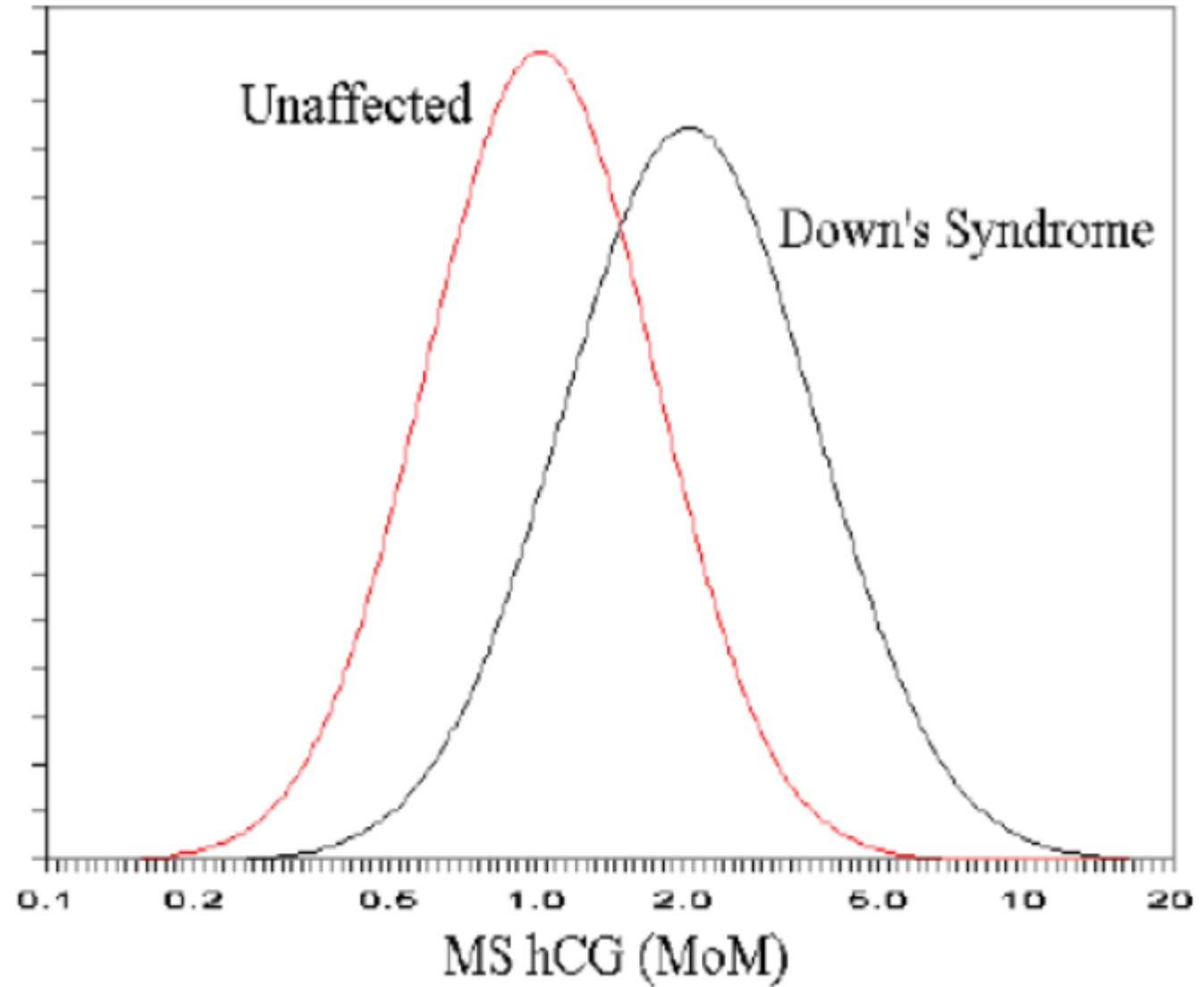


شکل (۶). توزیع تولد در سن‌های متفاوت حاملگی و ریسک سندرم داون

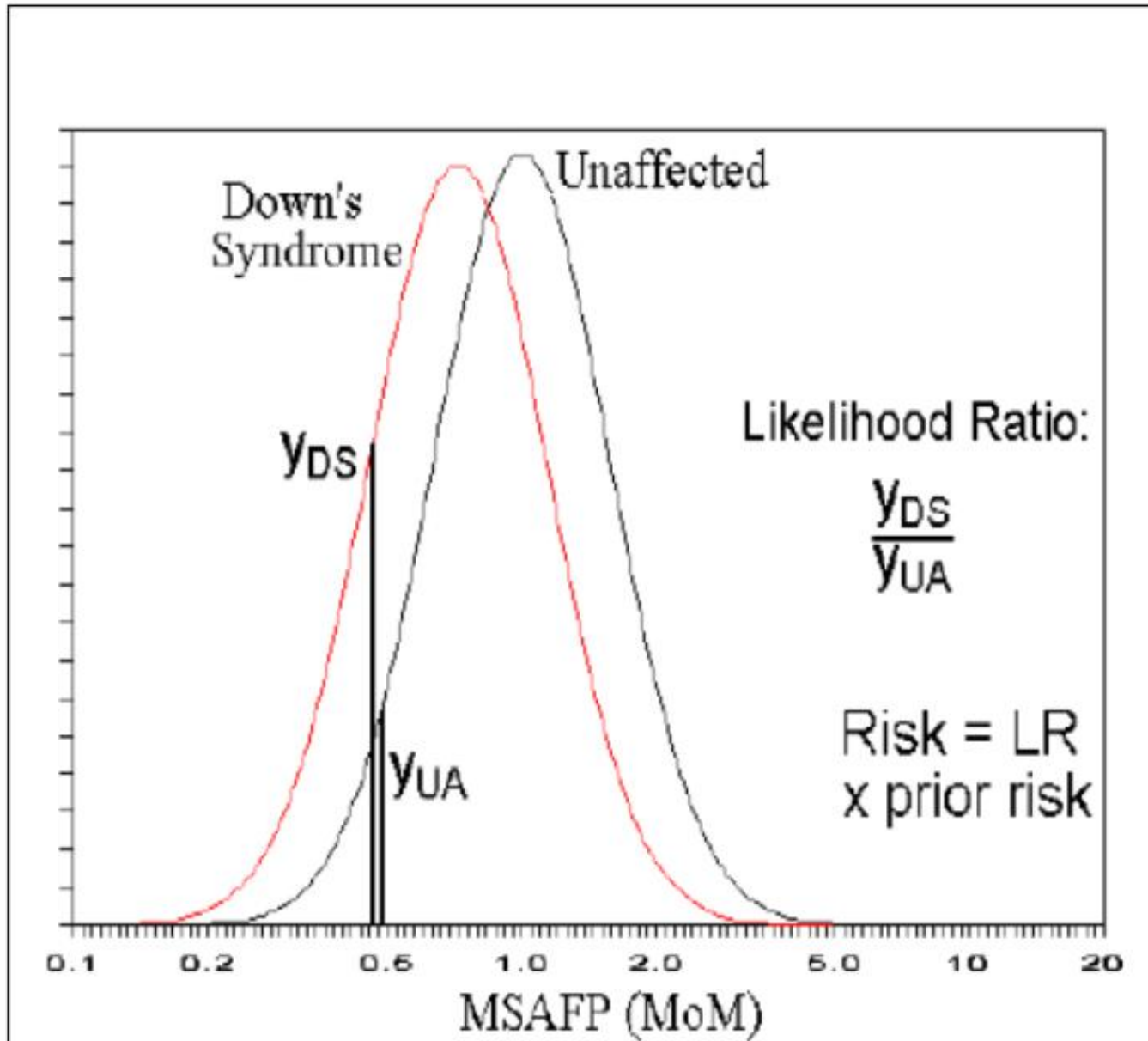
Down's Syndrome Births by Age at Term, with MSAFP/Age Screening



شکل (۷). تولدهای سندرم داون با غربالگری بر اساس سن و سطح سرمی AFP

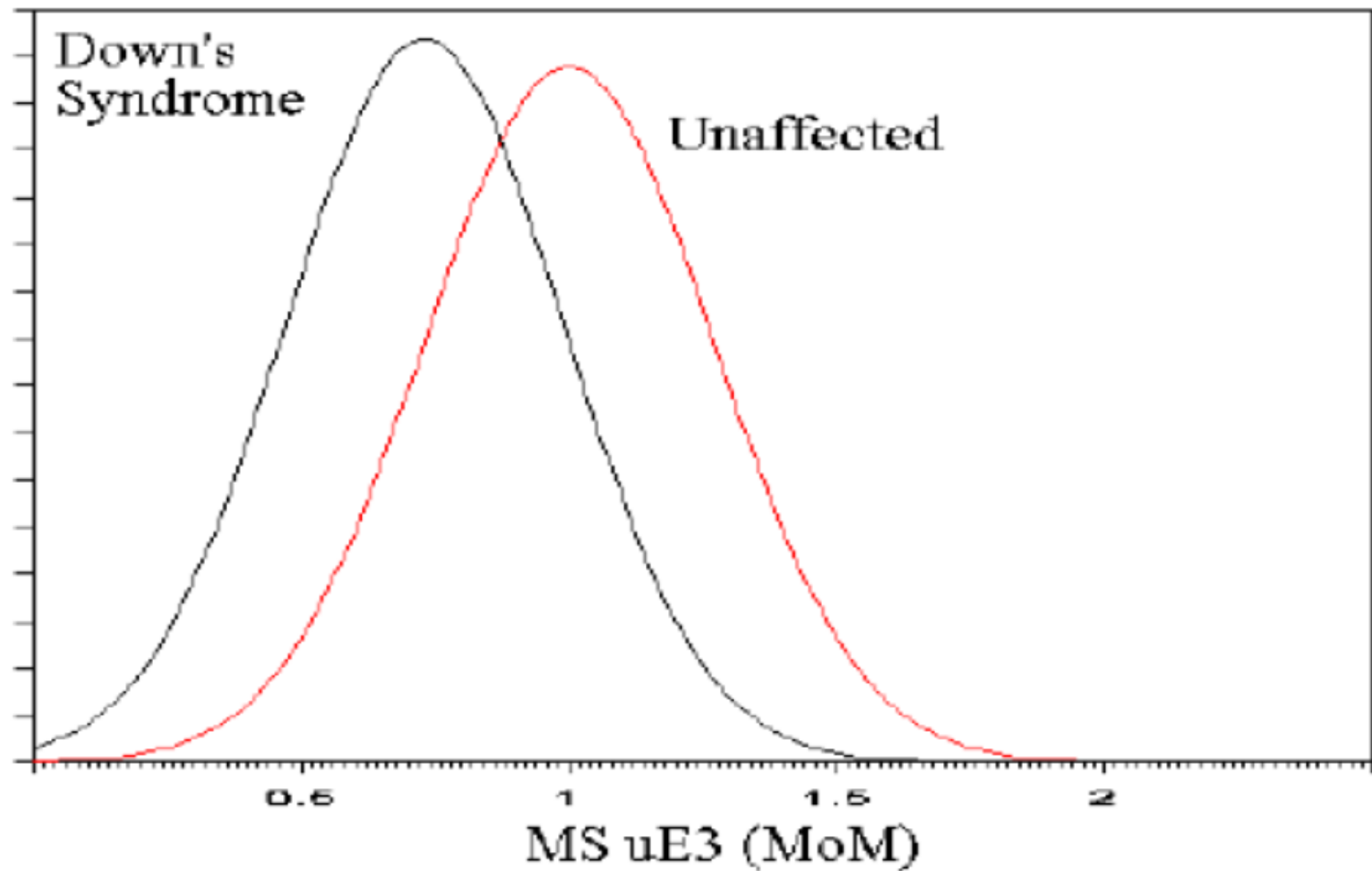


شکل (۸الف). میزان جداسازی بر اساس hCG



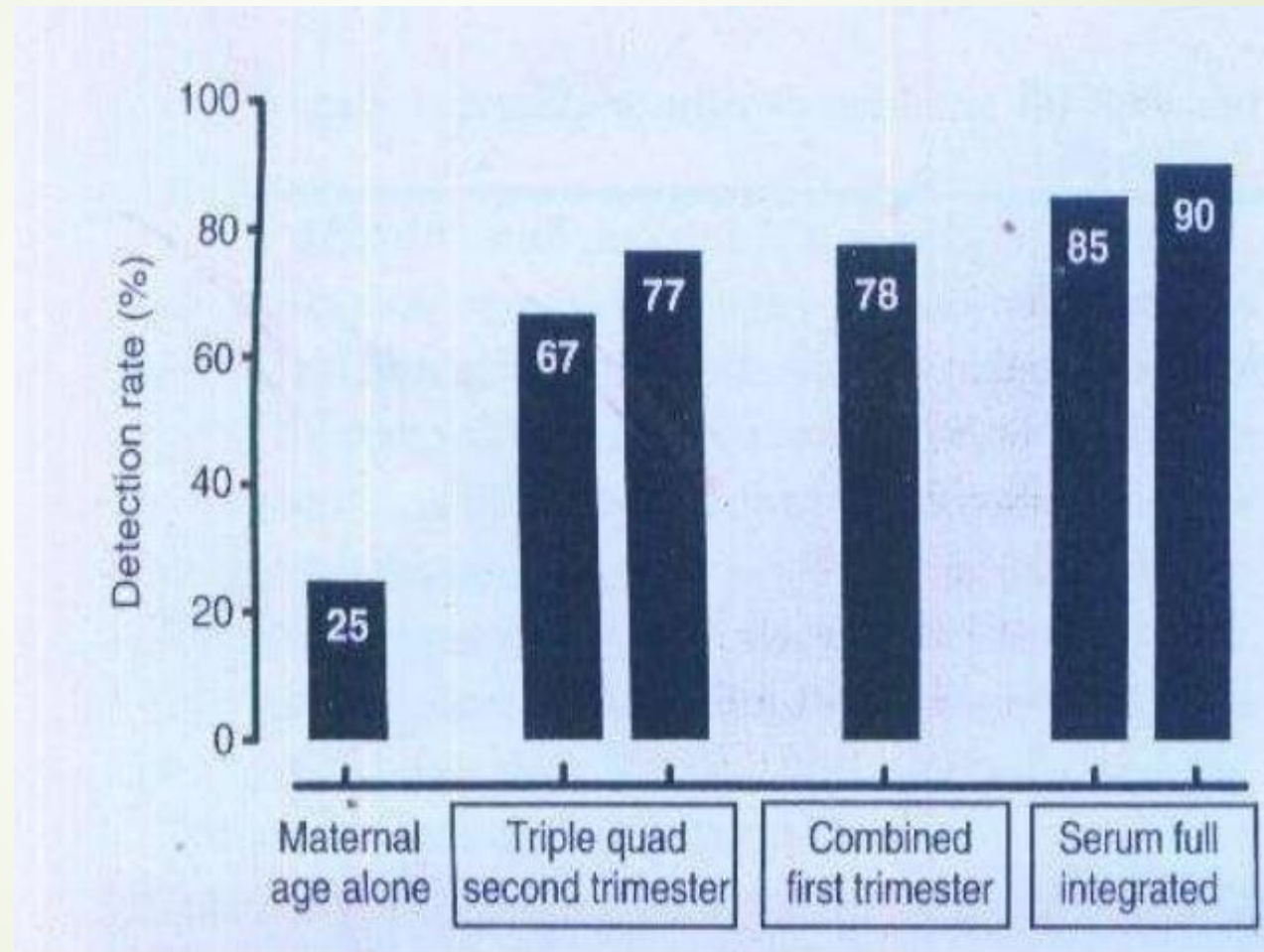
شکل (۸ب). میزان جداسازی بر اساس AFP

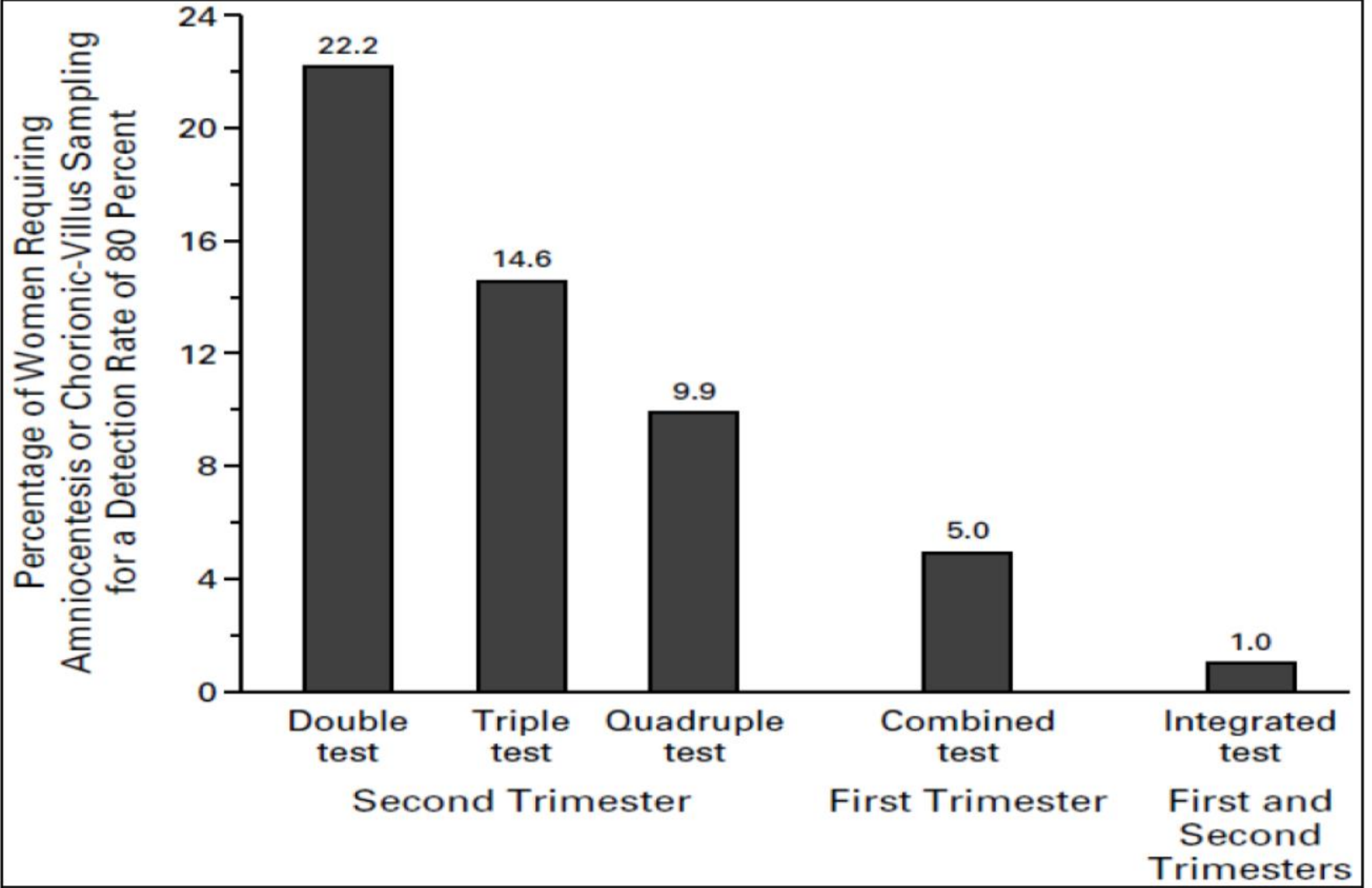
MS uE3: Down's Syndrome vs Unaffected






	Second trimester markers				First trimester markers	
Genetic disorder	AFP	uE3	hCG	Inh A	PAPP-A	beta hCG
Down syndrome	↓	↓	↑	↑	↓	↑
Trisomy 18	↓	↓↓	↓↓	↔	↓↓	↓↓
Trisomy 13	↔	↔	↔	↔	↓↓	↓
Turner syndrome with hydrops	↓	↓	↑	↑	↓↑	↓↑
Turner syndrome without hydrops	↓	↓	↓	↓	↓↑	↓↑
Triploidy (paternal)	↔	↓	↑	↑	↓↑	↑↑
Triploidy (maternal)	↔	↓	↓	↓	↓↑	↓↓
Smith-Lemli-Opitz syndrome	↓	↓↓	↓	NR	NR	NR





شکل (۱۴). نرخ شناسایی سندرم داون و نرخ مثبت کاذب برای تست‌های غربالگری

- 
- **Integrated first- and second trimester screening** : The highest sensitivity rate with the lowest false-positive rates(5%), detection rate of 94% to 96%

Results reported to the patient after first- and second-trimester screening is completed

- increased risk of aneuploidy should be offered amniocentesis.

- **Sequential screening,**

-the patient is informed about first-trimester results.

-positive result :Early diagnostic testing (chorionic villous sampling) is offered ,

- negative results may undergo additional second trimester screening

- The advantage of integrated and sequential screening is a lower false-positive rate, fewer diagnostic procedures.

- only first-trimester screening for chromosomal abnormalities

- neural tube defect screening in the second trimester

تست Contingent

تست Contingent عملکردی مشابه تست Sequential دارد با این تفاوت که در Contingent با استفاده از دو خط Cut-off بیماران را به ۳ گروه تقسیم می‌کند:

۱. **گروه یک:** بیماران با ریسک بالا، ریسک سه ماهه اول این گروه، از Cut-off بالایی بیشتر است. این گروه از بیماران با دستور پزشک جهت نمونه‌گیری از پرزهای کریونی (CVS) ارسال می‌گردند.
 ۲. **گروه دوم:** بیماران با ریسک پایین، ریسک سه ماهه اول بیماران از Cut-off پایینی کمتر است. به این بیماران اطمینان داده می‌شود که در بارداری آنان مشکلی وجود نداشته و تنها با صلاحدید پزشک در هفته ۱۵ تست AFP داده تا ریسک NTD بیمار نیز مشخص شود.
 ۳. **گروه سوم:** بیماران با ریسک متوسط (**Intermediate**)، ریسک این بیماران بین دو Cut-off پایین و بالا می‌باشد. به این بیماران توصیه می‌شود که منتظر بمانند تا وارد سه ماهه دوم شده و در هفته‌های ۱۵ تا ۱۸ برای تست سه ماهه دوم نمونه‌گیری انجام دهند.
- در حقیقت تست Contingent از تریشلدهای متفاوت در سه ماهه اول استفاده کرده تا مشخص کند که کدام گروه از بیماران نیازمند تست تشخیصی تهاجمی در سه ماهه اول می‌باشد، کدام گروه دارای ریسک منفی بوده، و کدام گروه نیازمند به تست کواد در سه ماهه دوم می‌باشد. تعداد بیماران که در این سه گروه دسته بندی می‌شوند با توجه به تریشلدهای متفاوت، تغییر می‌کند.
- با توجه به مقالات متفاوت ارائه شده Cut-off بالا و پایین در سه ماهه اول به ترتیب ۱ به ۵۰ و ۱ به ۱۵۰۰ می‌باشد. با قرار دادن این مقادیر ۸۰٪ بیماران در سه ماهه اول دارای ریسک منفی بوده و توصیه می‌شود از انجام تست سه ماهه دوم خودداری شود.

اطلاعات سه ماهه اول
اطلاعات سه ماهه دوم



CLINICAL INFORMATION

GESTATIONAL AGE: from CRL of 48.4 mm on 24/06/14
MATERNAL AGE AT TERM: 28.1 years
MATERNAL RACE: Persian
MATERNAL HISTORY:
GESTATION: Twins
SCREENING STATUS: Initial sample
PARA/ GRAVIDA: 0 / 1

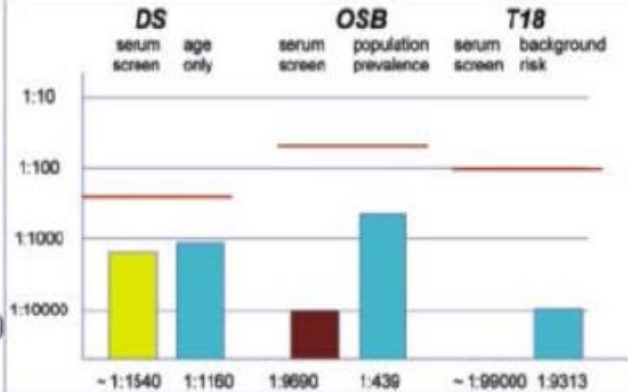
SPECIMEN INFORMATION

Trimester	Referring Lab #	Specimen Code	Received Date	Specimen Date	Gestational Age	Maternal weight
First		4-1647	24/06/14	24/06/14	11 wks 4 d	62 kg
Second		6-351	27/08/14	27/08/14	20 wks 5 d	70 kg

CLINICAL RESULTS

First Trimester			Second Trimester		
Assay Results	MolM		Assay Results	MolM	
PAPP-A	5397.00 mIU/L	2.68	AFP	70.4 IU/mL	1.38
free B-hCG	655.0 IU/L	15.63	uE3	28.20 nmol/L	1.14
Ultrasound	CRL	NT	hCG	91102.0 IU/L	6.25
Fetus A:	47.0	1.08	Inhibin-A	491.0 pg/ml	1.78
Fetus B:	48.4	1.02			
	mm				

Down Syndrome	- 1:1540	1:250
Age alone	1:1160	
OSB:	1:9690	1:46(5.11MolMs)
Trisomy 18/13	- 1:99000	1:100



Interpretation* (based on partial information supplied)

DOWN SYNDROME

Screen Negative

This patient's relative risk for Down syndrome has been determined by dividing the assay results by the average analyte level in twin pregnancies, and then calculating the risk associated with a singleton pregnancy. This relative risk calculation places the patient below the screening cut-off for Down syndrome.

OPEN SPINA BIFIDA

Screen Negative

The maternal serum AFP result is NOT elevated for a TWIN pregnancy of this gestational age. The risk of an open neural tube defect is less than the risk at the TWIN screening cut-off. Twin pregnancies have serum AFP concentrations that are twice those seen in singleton pregnancies.

TRISOMY 18/13

Screen Negative

مادر برای آزمایشات سه ماهه اول و دوم در زمان مشخص مراجعه کرده است. نمودار حاضر، تست جامع

(Integrated)

CLINICAL RESULTS			DOWN SYNDROME	TRISOMY 18/13
Assay	Results	MoM		
PAPP-A	1200.00 MIU/L	0.36		
free β-hCG	65.0 IU/L	2.08		
NT	1.20 mm	0.85		
Risk Assessment (at term)				
Down Syndrome		1:405		
Age alone		1:931		
Equivalent Age Risk		35.0		
Trisomy 18/13		1:99000		

Interpretation* (based on partial information supplied)

DOWN SYNDROME

Intermediate Risk

Based on the patient's first trimester risk, a specimen needs to be submitted between 15 to 18 weeks for final risk calculation.

TRISOMY 18/13

Screen Negative

The risk of trisomy 18 is less than the screening cut-off.

This patient will reach 15 weeks gestation on 20/12/14

تاریخ شروع هفته ۱۵
زمان مجاز برای انجام
تستهای سه ماهه

پنل **Contingent** تست جامع شرطی می باشد که ساز و کاری شبیه به پنل **Sequential** دارد . در سه ماهه اول در این تست دو آستانه (**Cutoff**) وجود دارد، آستانه پایین ۱:۱۵۰۰ و آستانه بالا ۱:۵۰ می باشد. اگر ریسک بیمار کمتر از تریپلند پایین باشد بیمار **Lowrisk** بوده و تنها نیازمند به تست **AFP** در سه ماهه دوم برای تعیین ریسک **NTD** است. اگر ریسک بیمار بین دو آستانه باشد بیمار در ناحیه **Intermediate** بوده و باید منتظر بماند تا مارک‌های سه ماهه دوم نیز گرفته شود و در نهایت یک جواب جامع بر اساس ۳ ماهه اول و دوم شود. اگر ریسک بیمار از آستانه بالایی بیشتر باشد بیمار مثبت بوده و توصیه می شود که تست های تشخیصی انجام شود.

