



Gdański Uniwersytet Medyczny

mgr Agnieszka Dziennik

**Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna zygotywności ciąży bliźniaczych w oparciu o analizę polimorfizmu markerów STR i DIP-STR w DNA pozakomórkowym izolowanym z krwi matki**

**Noninvasive prenatal diagnosis of zygosity of twin pregnancies, based on analysis of polymorphism of STR and DIP-STR markers in cell-free DNA isolated from maternal blood**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

Promotor: dr hab. n. med. Krzysztof Rębała

Pracę wykonano

w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Gdańsk 2022

## *Podziękowania*

*Serdeczne podziękowania składam mojemu mentorowi oraz Promotorowi, Panu dr hab. Krzysztofowi Rębale za ogromną pomoc, wielkie wsparcie podczas realizacji pomysłu badawczego, udostępnienie zaplecza naukowo-badawczego, a także za cierpliwość podczas powstawania rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję pracownikom Pracowni Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej – Pani Lidii, Pani Ewie za cierpliwe odpowiadanie na wszystkie pytania i pomoc podczas pracy laboratoryjnej.*

*Dziękuję bardzo Panu Profesorowi Krzysztofowi Preisowi oraz Pani Profesor Małgorzacie Świątkowskiej-Freund za eksperckie konsultacje tematyki cięż bliźniaczych oraz za udostępnienie materiału badawczego.*

*Dziękuję położnym i personelowi medycznemu, którzy byli mi życzliwi i pomocni podczas gromadzenia dla mnie materiału badawczego.*

*Dziękuję Marcie Krzyżanowskiej za pomoc w laboratorium i w końcowym ukształtowaniu niniejszej dysertacji.*

*Praca z Wami była dla mnie przyjemnością i niesamowitą przygodą, którą będę wspominać do końca swojego życia!*

*Dziękuję mojemu Mężowi i Rodzicom – bez waszego humoru i niekończącego się wsparcia nie udało by mi się przejść tej drogi i dokończyć tej pracy.*

## **Spis treści**

Wykaz stosowanych skrótów .....	4
Wykaz publikacji będących przedmiotem dysertacji.....	5
Streszczenie.....	6
Summary .....	9
Omówienie problemu badawczego .....	12
Wprowadzenie .....	12
Cele pracy .....	16
Materiał i metody badawcze .....	17
Omówienie wyników badań zawartych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy .....	20
Wnioski .....	27
Piśmiennictwo .....	28
Publikacje będące przedmiotem dysertacji .....	35

## Wykaz stosowanych skrótów

cfDNA – DNA pozakomórkowy; ang. *cell-free DNA*

DA – dwuowodniowy; ang. *diamniotic*

DC – dwukosmówkowy; ang. *dichorionic*

DIP-STR – haplotypy obejmujące dwa regiony polimorficzne: delecję/insercję (DIP) oraz marker mikrosatelitarny (STR); ang. *deletion/insertion polymorphism and short tandem repeats*

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy; ang. *deoxyribonucleic acid*

DZ – dizygotyczny; ang. *dizygotic*

MA – jednoowodniowy; ang. *monoamniotic*

MPS – masowe sekwencjonowanie równoległe; ang. *massively parallel sequencing*

MC – jednokosmówkowy; ang. *monochorionic*

MZ – monozygotyczny; ang. *monozygotic*

NIPT – nieinwazyjne badania prenatalne; ang. *non-invasive prenatal testing*

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy; ang. *polymerase chain reaction*

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy; ang. *quantitative PCR*

QF-PCR – ilościowa fluorescencyjna reakcja łańcuchowa polimerazy; ang. *quantitative fluorescent PCR*

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu; ang. *single-nucleotide polymorphism*

STR – krótkie powtórzenia tandemowe; ang. *short tandem repeats*

TTTS – zespół przetoczenia krwi między płodami; ang. *twin-to-twin transfusion syndrome*

USG – badanie ultrasonograficzne; ang. *ultrasonography*

## Wykaz publikacji

### Publikacja 1

*Genotyping of STR and DIP-STR Markers in Plasma Cell-Free DNA for Simple and Rapid Noninvasive Prenatal Diagnosis of Zygosity of Twin Pregnancies.*

**Dziennik A**, Preis K, Świątkowska-Freund M, Rębała K.

*Twin Res Hum Genet.* 2019;22(5):321-329.

doi: 10.1017/thg.2019.89; PMID: 31619303

Impact factor: **1.319**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **70.000**

### Publikacja 2

*Potential of DNA zygosity tests for non-invasive evaluation of risk of complications in twin pregnancies.*

**Dziennik A**, Preis K, Świątkowska-Freund M, Rębała K.

*Ginekol Pol.* 2022;93(4):310-313.

doi: 10.5603/GP.a2021.0158; PMID: 34541652

Impact factor: **1.216**

Punktacja ministerialna prezentowanej pracy: **40.000**

Razem:

Impact factor: **2.535**

Punktacja ministerialna prezentowanych prac: **110.000**

## Streszczenie

**Wprowadzenie:** Ciąża bliźniacza jest zjawiskiem powszechnym. Szacuje się, że występuje z częstością raz na 80 porodów. Traktowana jest jako patologiczna u człowieka ze względu na wysoki odsetek powikłań i z tego względu wymaga zaplanowania szczególnej opieki prenatalnej. Dotyczy to w szczególności ciąż monozygotycznych, które charakteryzują się 2,5-krotnie wyższą śmiertelnością płodów, głównie z uwagi na ryzyko rozwinięcia zespołu przetoczenia krwi między płodami w ciążach jednokosmówkowych dwuowodniowych, które stanowią około 2/3 ciąż bliźniaczych monozygotycznych. Częstość występowania ciąż bliźniaczych na świecie rośnie na skutek późniejszego przystępowania matek do rozrodu i stosowania technik wspomaganego rozrodu. W populacji europejskiej ciążę monozygotyczną i dizygotyczną stanowią odpowiednio 30% i 70% ciąż bliźniaczych. W prowadzeniu ciąży bliźniaczej istotne jest określenie kosmówkowości. Diagnostyka rutynowo badaniem ultrasonograficznym o wysokiej rozdzielczości na podstawie liczby mas łożyska, grubości błony rozdzielającej płody oraz obecności lub braku znaku lambda lub T między 10. a 14. tygodniem ciąży. Wartość prognostyczną dla przebiegu ciąży może również dostarczyć nieinwazyjne badanie genetyczne zygocności ciąży z wykorzystaniem DNA pozakomórkowego (cfDNA) pochodzenia płodowego, krążącego w krwiobiegu matki. DNA płodowy stanowi 3–20% cfDNA osocza kobiet ciężarnych. Markery mikrosatelitarne (krótkie powtórzenia tandemowe, STR) charakteryzują się zmienną osobniczo liczbą krótkich jednostek repetytywnych o długości 1–6 bp. Znaczna liczba alleli czyni te markery idealnym narzędziem w genetyce sądowej do analizy i różnicowania mieszanin DNA pochodzącego od co najmniej dwóch osób, w których składnik mniejszościowy stanowi co najmniej 5% mieszaniny. Markery DIP-STR stanowią haplotypy obejmujące dwa regiony polimorficzne: delecję lub insercję (DIP) oraz marker mikrosatelitarny. Badanie markerów DIP-STR pozwala na wykrycie alleli pochodzących od osoby, której DNA stanowi składnik mniejszościowy w mieszaninie DNA dwóch osób, nawet jeśli udział DNA tej osoby w mieszaninie jest bardzo niewielki i wynosi zaledwie 0,1%.

**Cel:** Celem pracy była ocena przydatności badania polimorfizmu STR i DIP-STR w cfDNA osocza matki do oznaczania zygocności ciąż bliźniaczych oraz porównanie skuteczności prenatalnych badań DNA i ultrasonograficznych w rozpoznawaniu ciąż bliźniaczych wysokiego i niskiego ryzyka.

**Materiał i metoda:** Materiał badawczy stanowiła krew obwodowa pobrana łącznie od 42 pacjentek w ciąży bliźniaczej z Oddziału Ginekologicznego Kliniki Położnictwa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Oddziału Ginekologiczno-Położniczego Szpitala św. Wojciecha w Gdańsku, COPERNICUS Podmiot Leczniczy Sp. z o.o. Dodatkowo na początku do realizacji projektu pod kątem opracowania i optymalizacji metody pozyskano krew obwodową pochodzącą z 15 ciąż pojedynczych z płodem męskim. Materiał z ciąż pojedynczych i bliźniaczych (23.–41. tydzień ciąży, wiek pacjentek: 22–46 lat) zebrano w latach 2015–2018. Bezpośrednio po porodzie pobierano od każdego z bliźniąt krew pępowinową. Do badania polimorfizmu STR wykorzystano komercyjny zestaw PowerPlex Fusion (Promega), obejmujący 22 markery autosomalne, natomiast polimorfizm DIP-STR analizowano z wykorzystaniem stworzonych we własnym zakresie dwóch zestawów kompleksowej reakcji PCR (multipleksów), umożliwiających amplifikację 7 markerów autosomalnych, osobno dla alleli z delecją i osobno dla alleli z insercją. Uzyskane profile cfDNA osocza porównywano z profilem matki. Obecność dwóch alleli płodowych interpretowano jako ciążę dizygotyczną. Zygotyczność ciąży określoną na podstawie badania cfDNA osocza porównywano z zygotycznością bliźniąt oznaczoną po porodzie w oparciu o krew pępowinową oraz z kosmówkowością, oznaczoną we wczesnej ciąży w rutynowym badaniu ultrasonograficznym.

**Wyniki – publikacja nr 1:** Analiza polimorfizmu DNA z krwi pępowinowej bliźniąt pochodzących z 28 ciąż objętych badaniem wykazała 15 par bliźniąt o różnych genotypach (ciąże dizygotyczne; 53,6%) i 13 par bliźniąt o identycznych genotypach (ciąże monozygotyczne; 46,4%). W przypadku ciąż dizygotycznych w 10 próbkach osocza krwi kobiet ciężarnych (66,7%) w badaniu markerów STR i w 2 próbkach osocza (13,3%) w badaniu markerów DIP-STR wykryto 2 dodatkowe allele, nie pochodzące od matki, świadczące o ciąży bliźniaczej dizygotycznej. Wykazano, że badanie 22 loci STR charakteryzowało się 67% czułością, 100% swoistością i 82% dokładnością w prenatalnym wykrywaniu dizygotyczności ciąży. Wartości te dla 7 markerów DIP-STR wynosiły odpowiednio 13%, 100% i 54%.

**Wyniki – publikacja nr 2:** Wśród 42 ciąż bliźniaczych włączonych do projektu w rutynowym badaniu ultrasonograficznym w pierwszym trymestrze stwierdzono 21 ciąż dwukosmówkowych niskiego ryzyka (50%) i 21 ciąż jednokosmówkowych wysokiego ryzyka (50%). W badaniu DNA krwi pępowinowej wykazano 23 pary bliźniąt o różnych

genotypach (ciąże dizygotyczne niskiego ryzyka, 55%) i 19 par bliźniąt o identycznych genotypach (ciąże monozygotyczne wysokiego ryzyka, 45%). Wykryto 4 ciąży (10%), które zostały zdiagnozowane ultrasonograficznie jako jednokosmówkowe dwuowodniowe wysokiego ryzyka, natomiast w badaniu DNA zostały rozpoznane jako dizygotyczne niskiego ryzyka. Stanowiły one aż 19% wszystkich ciąż jednokosmówkowych wysokiego ryzyka wykrytych w badaniu ultrasonograficznym.

**Wnioski:** Wyniki wskazują na duży potencjał badań DNA w ustalaniu zygotywności ciąż bliźniaczych pod kątem różnicowania ciąż wysokiego i niskiego ryzyka, wymagających innej opieki prenatalnej. Z uwagi na stosunkowo wysoką czułość, swoistość i dokładność w wykrywaniu dizygotyczności ciąż bliźniaczych, niewielką ilość DNA niezbędną do przeprowadzenia badania, niskie koszty i prostotę analizy genotypowania markerów STR/DIP-STR w cfDNA osocza matki może stać się użytecznym testem uzupełniającym o wartości prognostycznej w nieinwazyjnej prenatalnej diagnostyce zygotywności ciąż bliźniaczych w przypadkach, w których kosmówkowości i zygotywności nie można wiarygodnie określić za pomocą badania ultrasonograficznego. Dizygotyczność wykryta testami DNA w przypadku ciąż błędnie zdiagnozowanych ultrasonograficznie jako jednokosmówkowe, powstałe na skutek fuzji łożysk dizygotycznych, eliminuje potrzebę częstych wizyt prenatalnych typowych dla ciąż jednokosmówkowych. Jeśli kosmówkowości nie można jednoznacznie określić i prenatalny test DNA nie wyklucza monozygotyczności, należy zawsze założyć bardziej pesymistyczny wariant ciąży jednokosmówkowej, wymagający częstych wizyt kontrolnych w celu szybkiego wykrycia potencjalnych powikłań i wdrożenia odpowiedniego leczenia.



## Summary

**Introduction:** Twin pregnancy is a common phenomenon. It is estimated that it occurs once per 80 births. Twin pregnancy is treated as pathological in humans due to high rate of complications and therefore requires special prenatal care planning. It concerns especially monozygotic twin pregnancies, which are characterized by 2.5-fold higher fetal mortality, mainly due to risk of development of twin-to-twin transfusion syndrome in monochorionic diamniotic pregnancies, constituting about 2/3 of monozygotic twin pregnancies. Twinning rate grows in the world as a result of the increase of the maternal age at conception and introduction of assisted reproduction techniques. In European populations, monozygotic and dizygotic pregnancies constitute 30% and 70% of twin pregnancies, respectively. In prenatal care of a twin pregnancy, it is crucial to determine its chorionicity. It is diagnosed routinely by high-resolution ultrasound examination, based on the number of placental masses, intertwin membrane thickness and presence/absence of lambda or T sign between 10 and 14 weeks. A prognostic value for the course of the twin pregnancy may be also provided by noninvasive genetic examination of pregnancy zygosity with the use of fetal cell-free (cfDNA), circulating in the maternal bloodstream. Fetal DNA constitutes 3–20% of cfDNA of maternal plasma. Microsatellites (short tandem repeats, STRs) are genetic markers characterized by an individually variable number of short repetitive units of 1–6 bp. The large number of alleles makes these markers a perfect forensic tool for analysis and differentiation of DNA mixtures of at least two individuals, in which a minority component constitutes at least 5% of a mixture. DIP-STR markers are haplotypes comprising two polymorphic regions: deletion/insertion (DIP) and a microsatellite. Analysis of DIP-STRs allows detection of alleles from a person, whose DNA constitutes a minority component in a DNA mixture of two individuals, even though the contribution of this person's DNA in the mixture is very small and amounts to only 0.1%.

**Aim:** The aim of the study was to assess usefulness of analysis of STR and DIP-STR polymorphism in cfDNA of maternal plasma in determination of twin pregnancy zygosity and to compare efficiency of prenatal DNA and ultrasound examination for differentiation of high-risk and low-risk twin pregnancies.

**Materials and methods:** The research material was peripheral blood collected from a total of 42 patients in twin pregnancies at the Department of Obstetrics, the Medical

University of Gdansk, and at the Department of Obstetrics and Gynecology, the St. Adalbert Hospital in Gdansk, Copernicus Podmiot Leczniczy Sp. z o.o. At the beginning of the study, peripheral blood was additionally obtained from 15 patients in singleton pregnancies with a male fetus in order to develop and optimize methodology. The material from singleton and twin pregnancies (23–41 weeks of gestation, age of patients: 22–46 years) was collected between 2015 and 2018. Directly after the birth, umbilical cord blood was obtained from each twin. For analysis of STR polymorphism, a commercial PowerPlex Fusion kit (Promega), comprising 22 autosomal markers, was used. DIP-STR polymorphism was analyzed with the use of two homemade multiplex PCR assays for amplification of 7 autosomal markers, separately for alleles with deletion and for alleles with insertion. The obtained profiles of cfDNA of maternal plasma were compared with mothers' profiles. Presence of two fetal alleles was interpreted as a dizygotic pregnancy. Zygosity of pregnancy determined by examination of cfDNA of maternal plasma was compared with zygosity of twins, determined postnatally by examination of DNA of umbilical cord blood, and with chorionicity, determined in the routine ultrasound examination in the early pregnancy.

**Results – scientific paper 1:** Analysis of polymorphism of DNA from umbilical cord blood of twins coming from 28 pregnancies involved in the study revealed 15 twin pairs with different genotypes (dizygotic pregnancies; 53.6%) and 13 twin pairs with identical genotypes (monozygotic pregnancies; 46.4%). In case of dizygotic pregnancies, 2 additional non-maternal alleles, indicating a dizygotic twin pregnancy, were detected in 10 samples of maternal plasma (66.7%) by STR genotyping and in 2 samples of maternal plasma (13.3%) by DIP-STR genotyping. Analysis of 22 STR loci was characterized by 67% sensitivity, 100% specificity and 82% accuracy of prenatal detection of pregnancy dizygosity. The corresponding values for 7 DIP-STR markers were 13%, 100% and 54%.

**Results – scientific paper 2:** Among 42 twin pregnancies involved in the study, routine ultrasound examination in the first trimester revealed 21 low-risk dichorionic pregnancies (50%) and 21 high-risk monochorionic pregnancies (50%). DNA analysis of umbilical cord blood showed 23 twin pairs with different genotypes (low-risk dizygotic pregnancies, 55%) and 19 twin pairs with identical genotypes (high-risk monozygotic pregnancies, 45%). It was found that 4 pregnancies (10%) were diagnosed ultrasonographically as high-risk monochorionic diamniotic, but were identified as

low-risk dizygotic in DNA analysis. They constituted as much as 19% of all high-risk monochorionic pregnancies detected by ultrasound imaging.

**Conclusions:** Results indicate high potential of DNA examination in determination of twin pregnancy zygosity in order to differentiate high-risk and low-risk pregnancies, requiring distinct prenatal care. Due to relatively high sensitivity, specificity and accuracy of detection of twin pregnancy dizygosity, small amount of DNA required for examination, low costs and simplicity of analysis, genotyping of STR/DIP-STR markers in cfDNA of maternal plasma may become a useful supplementary test with a prognostic value for noninvasive prenatal diagnosis of twin pregnancy zygosity in cases when chorionicity and zygosity cannot be reliably determined by ultrasound imaging. Dizygosity detected by DNA tests in case of pregnancies erroneously diagnosed ultrasonographically as monochorionic, resulting from fusion of dizygotic placentas, eliminates the need for frequent prenatal visits typical for monochorionic pregnancies. If chorionicity cannot be reliably determined and a prenatal DNA test does not exclude monozygosity, a more pessimistic variant of monochorionic pregnancy, requiring frequent control visits, should always be assumed in order quickly detect potential complications and implement appropriate treatment.

## Omówienie problemu badawczego

### Wprowadzenie

Ciąża bliźniacza jest zjawiskiem powszechnym. Zgodnie z regułą Hellina odkrytą w 1895 r. występowała średnio raz na 80 porodów [1]. Kolejne badania ujawniły silne zróżnicowanie częstości porodów bliźniaczych w różnych populacjach. Najniższa częstość (poniżej 0,9%) obserwowana jest w populacjach Ameryki Południowej oraz Azji Wschodniej, Południowo-Wschodniej i Południowej, podczas gdy najwyższe wartości powyżej 1,8% są charakterystyczne dla wielu populacji afrykańskich [2]. W Beninie w Afryce Zachodniej aż 1/37 ciąż stanowią ciążę bliźniacze. Częstość ciąż bliźniaczych w rozwiniętych krajach Europy, Oceanii i Ameryki Północnej miała wartości pośrednie, ale w przeciągu ostatnich czterech dekad wzrosła dramatycznie, osiągając wartości obserwowane w Afryce Subsaharyjskiej [3, 4]. W 2010 r. częstość występowania ciąż bliźniaczych w Europie wahała się od 1:110 w Rumunii do 1:38 na Cyprze [5]. Przyjmuje się, że wzrost częstości występowania ciąż bliźniaczych wynika z coraz późniejszego przystępowania kobiet do rozrodu (udział ciąż bliźniaczych rośnie wraz z wiekiem matki) oraz z coraz powszechniejszego stosowania technik wspomaganego rozrodu [3, 4, 6, 7, 8].

Ze względu na wysoki odsetek powikłań ciążę bliźniacze uważane są u ludzi za patologiczne. W Europie są one związane z 9-krotnie wyższym ryzykiem porodu przedwczesnego, 12-krotnie wyższym ryzykiem porodu bardzo przedwczesnego i 7-krotnie wyższym ryzykiem zgonu noworodka w porównaniu z ciążami pojedynczymi [5].

Ciąże bliźniacze klasyfikuje się jako dizygotyczne (DZ; powstałe w wyniku zapłodnienia dwóch komórek jajowych przez dwa plemniki) i monozygotyczne (MZ; powstałe w wyniku podziału zarodka na dwie identyczne struktury embrionalne w ciągu pierwszych 14-16 dni od zapłodnienia jednej komórki jajowej przez jeden plemnik) [9, 10, 11]. Kryterium klasyfikacji stanowi też liczba mas łożyska (dwukosmówkowe/DC lub jednokosmówkowe/MC) oraz liczba worków owodni (dwuowodniowe/DA lub jednoowodniowe/MA) [12]. Ciążę DZ są prawie zawsze DC DA, a każdy płód ma własne łożysko i jamę owodniową. Z drugiej strony o kosmówkowości i owodniowości w ciążach MZ decyduje czas, w którym następuje podział zarodka [13]. Tak więc zapłodnienie jednej komórki jajowej jednym plemnikiem prowadzące do ciąży bliźniaczej MZ może skutkować ciążą DC DA (podział w ciągu 4 dni od poczęcia),

MC DA (podział między 4. a 8. dniem od poczęcia) lub MC MA (podział między 8. a 12. dniem od poczęcia) [12].

W populacjach europejskich ciąży MZ i DZ stanowią odpowiednio 30% i 70% ciąż bliźniaczych [6, 11]. Podczas gdy farmakologiczna stymulacja jajników i transfer wielu zarodków są związane z wyższą częstotliwością ciąż polizygotycznych (zwłaszcza dizygotycznych), podejrzewa się, że technologia *in vitro* prowokuje późniejsze podziały zarodków w wyniku manipulacji na osłonce przejrzystej, prowadząc do ciąż monozygotycznych [6, 14, 15].

Kosmówkowość w ciążach bliźniaczych diagnozuje się rutynowo za pomocą badania ultrasonograficznego o wysokiej rozdzielczości na podstawie liczby mas łożyska, grubości błony rozdzielającej płody oraz obecności lub braku znaku lambda lub T między 10. a 14. tygodniem [16]. Zakłada się, że znajomość kosmówkowości jest najważniejsza dla zapewnienia odpowiedniej opieki prenatalnej w ciąży bliźniaczej [17]. Pomocna może też być ocena płci płodów (płody różnej płci wskazują na ciążę DZ, a zatem DC DA), jednak, gdy płody są tej samej płci, tylko w ok. 40% stanowią ciążę MC [18, 19]. Stwierdzenie podczas USG pojedynczego dysku łożyska i tej samej płci płodów nie jest wynikiem jednoznacznym ciąży MZ, nie wyklucza ciąży DC, może być również efektem fuzji kosmówek. Należy wtedy zapewnić opiekę prenatalną jak w przypadku ciąży MC [20].

Ciąże bliźniacze są uważane za patologiczne u ludzi, ponieważ wiążą się nawet z 10-krotnie wyższym odsetkiem powikłań (w tym śmiertelnych) u ciężarnej i płodów [21, 22]. Z tego względu wymagają specjalnej opieki medycznej w czasie ciąży. Wśród ciąż bliźniaczych ciążę MC mają kilkakrotnie wyższy odsetek powikłań i zgonów okołoporodowych w porównaniu z ciążami DC [23]. Biorąc pod uwagę fakt, że ciążę MC rozwijają się tylko w przypadku płodów bliźniaczych MZ, wartość prognostyczną dla przebiegu ciąży bliźniaczej może zapewnić również badanie DNA określające zygotyczność ciąży, zwłaszcza, gdy nie można wiarygodnie określić kosmówkowości [24]. Śmiertelność płodów w ciążach bliźniaczych MZ jest co najmniej 2,5 razy wyższa niż w ciążach DZ [25, 26], co wynika głównie z powikłań związanych z wystąpieniem zespołu przetoczenia krwi między płodami (TTTS) w ciążach MC DA, które stanowią około 2/3 ciąż bliźniaczych MZ [27]. Dlatego też w celu szybkiego wykrycia powikłań i wdrożenia odpowiedniego leczenia ciążę MC należy kontrolować w kolejnych badaniach USG co 2 tygodnie, zaś ciążę DC klasycznie co 4 tygodnie [12].

Zygotyczność bliźniąt często oznaczana jest postnatalnie w celu zaspokojenia ciekawości rodziców, a także pod kątem dawstwa tkanek i narządów w transplantologii i w przewidywaniu ryzyka rozwoju chorób o podłożu genetycznym [28, 29]. Oznaczanie zygotyczności bliźniąt po porodzie możliwe jest na podstawie znajomości płci bliźniąt, kosmówkowości ciąży, badania grup krwi oraz badania DNA [30]. Jako że płeć i kosmówkowość ciąży bliźniaczej oznaczane są również prenatalnie w badaniu ultrasonograficznym, możliwa jest ocena zygotyczności ciąży również przed porodem. Badanie DNA w celu określenia zygotyczności ciąży może mieć również znaczenie prognostyczne [31, 32]. Pierwotnie prenatalne oznaczanie zygotyczności ciąży wielopłodowych w oparciu o analizę polimorfizmu DNA przeprowadzano na podstawie badania materiału biologicznego pobranego w czasie amniopunkcji, biopsji kosmówki lub kordocentezy [33, 34, 35, 36, 37]. Do określania zygotyczności w oparciu o badanie DNA pierwotnie stosowano sondy molekularne w celu analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych [33, 38] lub polimorfizmu sekwencji produktów PCR [35], obecnie do tego celu najczęściej wykorzystuje się badanie polimorfizmu STR techniką QF-PCR [34, 36, 37]. Jednak zabiegi amniopunkcji, biopsji kosmówki lub kordocentezy są inwazyjne dla ciąży i charakteryzują się ryzykiem wystąpienia powikłań.

Badania DNA pozakomórkowego (cfDNA) krążącego w osoczu kobiet ciężarnych stały się kolejną, obok badania ultrasonograficznego, bardzo przydatną, nieinwazyjną metodą badań prenatalnych, bezpieczną zarówno dla matki, jak i dla płodu [39, 40, 41, 42, 43]. Apoptoza komórek łożyska prowadzi do obecności DNA pochodzenia łożyskowego w krwiobiegu matki [44, 45, 46], co określane jest jako mikrochimeryzm płodowo-matczyny [47, 48, 49]. Zawartość DNA łożyska, określanego powszechnie w badaniach cfDNA osocza ciężarnej jako DNA płodu, zwiększa się wraz z wiekiem ciąży i według różnych autorów może stanowić 3–10% cfDNA krążącego w osoczu we wczesnej ciąży i 6–20% cfDNA w późnej ciąży [48, 50, 51].

W ostatnich latach zaproponowano kilka technik nieinwazyjnego prenatalnego badania zygotyczności ciąży bliźniaczych w oparciu o analizę cfDNA krążącego w osoczu matki, które wykorzystują sekwencjonowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z użyciem MPS [52, 53, 54] i sekwencjonowanie mikrohaplotypów [55].

Mikrosatelity, powszechnie znane jako krótkie powtórzenia tandemowe (STR), stanowią fragmenty genomu ze zmienną liczbą powtórzeń sekwencji nukleotydowych o krótkich powtarzalnych jednostkach repetytywnych wielkości 1–6 bp [56]. Ze względu na wysoki poziom polimorfizmu markery te znalazły szerokie zastosowanie w medycynie

sądowej do genetycznej identyfikacji człowieka [57, 58, 59]. Elektroforeza kapilarna jest techniką stosowaną rutynowo w genetyce sądowej do badania polimorfizmu STR i umożliwia różnicowanie alleli różniących się wielkością jednego nukleotydu. Znaczna liczba obserwowanych alleli sprawia, że markery STR są doskonałym narzędziem do analizy i różnicowania mieszanin DNA pochodzących od co najmniej dwóch osób. Badanie polimorfizmu STR pozwala wykryć do 5% składnika mniejszościowego, co wskazuje na potencjalną przydatność markerów mikrosatelitarnych w wykrywaniu alleli płodowych w przypadku mikrochimeryzmu płodowo-matczynego.

Markery DIP-STR stanowią haplotypy składające się z dwóch regionów polimorficznych: delecji lub insercji (DIP) i mikrosatelity. W przypadku tych markerów jeden ze starterów rozpoznaje sekwencję komplementarną do delecji lub insercji, przez co amplifikowany jest tylko allel z delecją (S, ang. *short*) lub insercją (L, ang. *long*). W porównaniu ze standardową analizą polimorfizmu STR analiza markerów DIP-STR umożliwia wykrycie alleli osoby, której DNA stanowi składnik mniejszościowy w mieszaninie DNA co najmniej dwóch osób, nawet jeśli zawartość DNA tej osoby jest bardzo niska i wynosi zaledwie 0,1% [60, 61, 62]. Jeden lub dwa allele DIP-STR składnika mniejszościowego wysoce nie zrównoważonych mieszanin DNA można wykryć, gdy główny składnik mieszaniny posiada homozygotyczny układ alleli DIP (SS lub LL), a składnik mniejszościowy jest heterozygotą DIP (SL), lub gdy główny i mniejszościowy składnik mieszaniny DNA są przeciwstawnymi homozygotami DIP (SS/LL lub LL/SS). Kiedy mniejszościowy składnik mieszaniny DNA nie ma charakterystycznego tylko dla niego allelu S lub L, genotypowanie markerów DIP-STR w mieszaninach DNA przypomina standardowe genotypowanie markerów STR. Ze względu na zdolność wykrywania alleli składnika mniejszościowego w wysoce nie zrównoważonych mieszaninach DNA, analiza polimorfizmu DIP-STR wydaje się być jeszcze lepszym narzędziem do wykrywania alleli płodu w DNA izolowanym z osocza kobiet ciężarnych.

Każde dziecko dziedziczy jeden allel od matki i jeden od ojca. Osocze kobiet w ciąży pojedynczej powinno zawierać jeden dodatkowy allel STR lub DIP-STR odziedziczony po ojcu, przy założeniu, że różni się on od alleli matczyńskich. Zatem wykrycie dwóch dodatkowych niematczyńskich alleli STR lub DIP-STR w próbce osocza kobiety w ciąży bliźniaczej wskazuje na ciążę DZ.

### **Cele pracy:**

- Ocena przydatności polimorfizmu markerów STR w oznaczaniu zygotywności ciąży bliźniaczych w oparciu o DNA pozakomórkowy izolowany z krwi matki.
- Opracowanie i optymalizacja zestawów do jednoczesnej amplifikacji, rozdzielenia, detekcji i oznaczania alleli markerów DIP-STR przy zastosowaniu kompleksowej reakcji PCR i elektroforezy kapilarnej.
- Ocena przydatności polimorfizmu markerów DIP-STR wchodzących w skład nowo opracowanych multipleksów w oznaczaniu zygotywności ciąży bliźniaczych w oparciu o DNA pozakomórkowy izolowany z krwi matki.
- Porównanie markerów STR i DIP-STR pod kątem przydatności w prenatalnym badaniu zygotywności ciąży bliźniaczych.
- Porównanie skuteczności prenatalnych badań DNA i ultrasonograficznych w różnicowaniu ciąży bliźniaczych wysokiego i niskiego ryzyka.



## **Material i metody badawcze**

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę od Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/419/2014).

Do badań od ciężarnych kobiet do próbek Vacutainer Plus Blood Collection Tubes (BD), zawierających K3-EDTA, pobierano 3 ml krwi obwodowej, którą przechowywano w temperaturze 2–8 °C do czasu dalszej obróbki. Następnie z każdej próbki krwi obwodowej oddzielano 0,6 ml krwi pełnej jako materiał porównawczy do późniejszego oznaczenia czystego profilu DNA matki i przechowywano w temperaturze –20 °C do czasu izolacji DNA. Pozostałą część (2,4 ml krwi) w przeciągu 8 godzin od pobrania [63] wirowano w celu oddzielenia osocza od elementów komórkowych, a tym samym zatrzymania uwalniania DNA matki do osocza, które zmniejszałoby udział DNA pochodzenia płodowego w cfDNA osocza. Dodatkowo bezpośrednio po porodzie pobierano od każdego z bliźniąt ok. 1,5 ml krwi pępowinowej po przecięciu pępowiny od strony łożyskowej (odpad medyczny). Materiał pobierano przez okres 3 lat od pacjentek Oddziału Ginekologicznego Kliniki Położnictwa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Oddziału Ginekologiczno-Położniczego Szpitala św. Wojciecha w Gdańsku COPERNICUS Podmiot Leczniczy Sp. z o.o. Do pierwszej publikacji z puli 89 pacjentek w ciąży bliźniaczej zebrano komplet materiału badawczego (krew obwodową matki i pępowinową bliźniąt) oraz danych od 28 kobiet, do drugiej publikacji zgromadzono wszystkie niezbędne dane (w tym informację o wyniku badania USG w pierwszym trymestrze ciąży) dla 42 kobiet. Dla 23 pacjentek, które zostały włączone do pierwszej publikacji, zebrano dane, które wykorzystano w drugiej publikacji. Dodatkowo pod kątem opracowania i optymalizacji metod badawczych zebrano na początku projektu materiał (próbki krwi obwodowej) pochodzący z 15 ciąż z pojedynczym płodem męskim. Wszystkie pacjentki w ciąży pojedynczej i bliźniaczej (23.–41. tydzień ciąży, wiek: 22–46 lat) zostały szczegółowo poinformowane o celu prowadzonych badań i podpisały świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Kosmówkowość i owodniowość ciąży była określana przez lekarza prowadzącego, zajmującego się ultrasonografią położniczą, podczas rutynowego badania ultrasonograficznego o wysokiej rozdzielczości między 10. a 14. tygodniem ciąży na podstawie liczby mas (dysków) łożyska, grubości błony (przegrody) rozdzielającej płody oraz obecności lub braku znaku lambda lub znaku T [16].

DNA pozakomórkowy osocza izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu QIAamp DSP Virus Spin Kit (Qiagen) w oparciu o instrukcję producenta. DNA z oddzielonej porcji krwi obwodowej matki (0,6 ml) i DNA bliźniąt z krwi pępowinowej izolowano przy użyciu metody nieenzymatycznej [64]. Stężenie DNA w izolatach z osocza mierzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) przy użyciu zestawu Plexor HY (Promega; czułość:  $>0,0064$  ng/ $\mu$ l). Stężenie DNA z pełnej krwi obwodowej i krwi pępowinowej mierzono metodą spektrofotometryczną (czułość:  $>0,5$  ng/ $\mu$ l).

Do badania polimorfizmu STR wykorzystano komercyjny zestaw PowerPlex Fusion (Promega), obejmujący 22 markery autosomalne (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX, vWA), jeden marker chromosomu Y (DYS391) i marker płci (amelogenina). Startery służące do amplifikacji tym zestawem były znakowane 4 różnymi barwnikami fluorescencyjnymi.

Polimorfizm DIP-STR analizowano z wykorzystaniem stworzonych we własnym zakresie dwóch zestawów kompleksowej reakcji PCR (multipleksów), opracowanych osobno do amplifikacji alleli z delecją (S) i alleli z insercją (L). Analizie poddano opisane dotąd markery DIP-STR o 3- i 4-nukleotyдовых powtórzeniach jednostki repetytywnej [60, 62], odrzucając markery 2-nukleotyдовые z powodu wysokich produktów typu *stutter* i związanych z tym trudności w interpretacji mieszanin DNA. Przy projektowaniu multipleksów zweryfikowano możliwość tworzenia dimerów przez startery przy użyciu programu AutoDimer [65] oraz nachodzenie na siebie zakresów wielkości alleli. Z każdej pary markerów o starterach tworzących dimery do dalszych badań wybierano marker o wyższym polimorfizmie (wyższej obserwowanej heterozygotyczności). Startery o nachodzących na siebie zakresach wielkości znakowano 3 różnymi barwnikami fluorescencyjnymi: 6-FAM, VIC, PET. Na ostatnim etapie projektowania multipleksów odrzucono markery DIP-STR, których startery po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej generowały liczne produkty niespecyficzne. Ostatecznie w każdym z opracowanych multipleksów znalazło się 7 markerów DIP-STR oraz locus amelogeniny jako marker płci (tabela 1 w publikacji 1).

Reakcję PCR w przypadku markerów STR i DIP-STR prowadzono w całkowitej objętości 5  $\mu$ l zawierającej 1 ng genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej/pępowinowej lub 1 ng cfDNA izolowanego z osocza. Reakcję PCR

proawdzono w termocyklerle Mastercycler Gradient (Eppendorf). Produkty amplifikacji rozdzielano przy użyciu elektroforezy kapilarnej w aparacie 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uzyskane profile cfDNA osocza porównywano z profilem matki. Obecność dwóch alleli płodowych interpretowano jako wynik wskazujący na ciążę bliźniaczą dizygotyczną. Uzyskane wyniki porównywano z zygotycznością bliźniąt oznaczoną po porodzie w oparciu o krew pępowinową oraz z kosmówkowością ciąży, określoną w rutynowym badaniu ultrasonograficznym pod kątem zapewnienia odpowiedniej opieki prenatalnej.

Uzyskane dane gromadzono w arkuszu MS Excel z zachowaniem poufności danych osobowych. W oparciu o uzyskane wyniki obliczono czułość, swoistość i dokładność opracowanej metody prenatalnego oznaczenia zygotyczności ciąż bliźniaczych. Analizę statystyczną wyników prowadzono przy pomocy programu komputerowego STATISTICA 12 (StatSoft). **Szczegółowy opis poboru, obróbki, a także metody badawcze zostały opisane w artykułach 1 i 2.**

## Omówienie wyników badań

W pierwszej publikacji badanie DNA izolowanego z krwi pępowinowej bliźniąt pochodzących z 28 ciąż wykazało 15 par bliźniąt o różnych genotypach (ciąże dizygotyczne; 53,6%) i 13 par bliźniąt o identycznych genotypach (ciąże monozygotyczne; 46,4%). W przypadku ciąż dizygotycznych w 10 próbkach osocza (66,7%) badanych z użyciem markerów STR i w 2 próbkach osocza (13,3%) badanych z użyciem markerów DIP-STR wykryto 2 dodatkowe allele niemaczyne, jednoznacznie wskazujące na ciążę bliźniaczą dizygotyczną. Wśród markerów STR najbardziej przydatnym markerem do wykrywania alleli płodowych w cfDNA osocza był marker D12S391 (w 79% ciąż bliźniaczych wykryto w tym markerze co najmniej jeden allel pochodzący od płodu/płodów), zaś do wykrywania dizygotyczności ciąży najbardziej przydatne były markery D8S1179 i D12S391 (w 27% ciąż bliźniaczych DZ wykryto w tych markerach dwa allele płodowe). Wśród markerów DIP-STR najbardziej użytecznym markerem do wykrywania alleli płodowych w cfDNA osocza oraz do wykrywania dizygotyczności ciąży był marker rs2308142-STR (w markerze tym wykryto co najmniej jeden allel płodowy w 54% ciąż bliźniaczych i dwa allele płodowe w 13% ciąż bliźniaczych DZ). Szczegółowe zestawienie wyników przedstawiono w artykule w tabeli 2. Przykłady profili DNA wskazujących na dizygotyczność ciąży bliźniaczej dla markerów STR i DIP-STR przedstawiono w artykule na rycinach 1 i 2.

Test U Manna i Whitneya nie wykazał statystycznie istotnych różnic pomiędzy markerami STR i DIP-STR w wykrywaniu alleli płodowych, jak i w zdolności do rozpoznania ciąży dizygotycznej (odpowiednio  $p = 0,57$  i  $p = 0,67$ ). Średnie stężenie cfDNA wyizolowanego z osocza wynosiło 0,56 ng/μl w przypadku ciąż bliźniaczych oraz 0,38 ng/μl w przypadku ciąż pojedynczych. W przypadku ciąż pojedynczych lub bliźniaczych z co najmniej jednym płodem męskim, męski DNA stanowił średnio 6,0% całkowitego cfDNA, co odpowiadało średniemu stężeniu męskiego DNA wynoszącemu 0,031 ng/μl. Istotnie wyższy udział DNA płodu (odpowiadającego męskiemu DNA, mierzonemu metodą qPCR w ciążach bez płodów żeńskich) obserwowano w ciążach bliźniaczych z dwoma płodami męskimi (średnio 9,3%) w porównaniu z ciążami pojedynczymi z jednym płodem męskim (średnio 4,6%; test U Manna i Whitneya:  $p = 0,04$ ). Nie zaobserwowano korelacji między frakcją męskiego DNA w cfDNA osocza (odpowiadającego DNA płodu) a liczbą markerów STR, w których wykryto co najmniej jeden allel płodowy, w 10 ciążach bliźniaczych z dwoma płodami męskimi o różnej

zygotyczności ( $R^2 = 0,36$ ;  $p = 0,07$ ) oraz w 5 ciążach bliźniaczych z jednym płodem męskim ( $R^2 = 0,75$ ;  $p = 0,06$ ). Obie wartości  $p$  były jednak bliskie istotności statystycznej. Nie stwierdzono również korelacji między frakcją męskiego DNA w cfDNA osocza a liczbą markerów DIP-STR, w których wykryto co najmniej jeden allel płodowy, w ciążach bliźniaczych z dwoma płodami męskimi ( $R^2 = 0,28$ ;  $p = 0,12$ ) oraz w ciążach bliźniaczych z jednym płodem męskim ( $R^2 = 0,03$ ;  $p = 0,79$ ). Zestaw 22 autosomalnych loci STR posiadał 67% czułość, 100% swoistość i 82% dokładność w prenatalnym wykrywaniu dizygotyczności bliźniąt. Wartości te dla zestawu 7 markerów DIP-STR wynosiły odpowiednio 13%, 100% i 54%. **Wszystkie wyniki badań opisano dokładnie w publikacji 1.**

Gdy przyszli rodzice dowiadują się podczas pierwszego rutynowego badania USG w pierwszym trymestrze ciąży, że spodziewają się bliźniąt, mają zwykle bardzo wiele pytań. Dla ginekologa położnika dla przebiegu ciąży bliźniaczej najważniejsze w takim momencie jest trafne określenie kosmówkowości w celu zapewnienia jak najlepszej opieki medycznej w czasie ciąży [23, 66]. Czy jest to ciąża jednokosmówkowa o podwyższonym ryzyku? Jak często trzeba będzie przeprowadzać badania kontrolne wzrastania płodów? Diagnoza kosmówkowości wykonana w 10.-14. tygodniu ciąży przy użyciu USG o wysokiej rozdzielczości na podstawie liczby mas łożyska, grubości błony rozdzielającej płody, obecności lub braku znaku lambda lub T [16] powinna dostarczyć jasny przekaz, z jaką ciążą będziemy mieć do czynienia, lecz w połowie ciąży ta ocena staje się niejasna. Określenie kosmówkowości w ciąży bliźniaczej w badaniu ultrasonograficznym może być problematyczne ze względu na techniczne ograniczenia aparaturowe, stłoczenie wewnątrzmaciczne płodów, obniżoną objętość płynu owodniowego, otyłość ciężarnej lub pominięcie badania we wczesnej ciąży [67]. Przewidywanie ryzyka powikłań w ciąży bliźniaczej może być jeszcze bardziej skomplikowane z powodu wyników fałszywie dodatnich, wskazujących na dwukosmówkowość w badaniu ultrasonograficznym [68], a także z powodu takich zjawisk jak fuzja kosmówki w ciąży DZ lub podział kosmówki w ciąży MZ [9, 18, 19, 20, 69]. We wszystkich wyżej wymienionych przypadkach wartość prognostyczną może mieć badanie DNA określające zygotyczność ciąży [31, 32].

Chociaż około 50% ciąż DZ można zidentyfikować za pomocą badania ultrasonograficznego ze względu na różną płeć bliźniąt, opisano liczne przypadki niezgodności płci bliźniąt MZ [70, 71]. Diagnoza dizygotyczności wskazuje na wyjątkowo niskie ryzyko TTTS, który dotyka aż 5–10% ciąż MZ [27] i który

zaobserwowano zaledwie w kilku przypadkach ciąży DZ na świecie [72, 73]. Ponadto wykazanie dizygotyczności ciąży w przypadku zaobserwowania wad rozwojowych tylko u jednego z bliźniąt pozwala na ograniczenie inwazyjnych procedur diagnostycznych tylko do jednego płodu.

Nowe możliwości w diagnostyce zygotyczności ciąży otworzyły się wraz z badaniami wolnego DNA płodowego, który krąży w krwi matki. Smid et al. [74] oznaczali ilościowo gen *SRY* zlokalizowany na chromosomie Y w osoczu kobiet ciężarnych i wykazali, że ilość DNA męskiego w cfDNA koreluje z liczbą płodów męskich. Te ustalenia są zgodne z wynikami moich badań opartych na qPCR męskiego DNA, które wykazały, że ilość DNA płodu w osoczu kobiet z ciąż bliźniaczych jest w przybliżeniu dwa razy większa niż w przypadku ciąż pojedynczych, co potwierdza możliwość wykorzystania cfDNA z osocza matki w prenatalnej analizie genetycznej bliźniąt.

Ponieważ nie znalazłam żadnych doniesień dotyczących badania zygotyczności ciąży opartych na polimorfizmie STR w cfDNA izolowanym z osocza kobiet ciężarnych, celem mojej rozprawy doktorskiej stała się ocena przydatności markerów mikrosatelitarnych w diagnostyce zygotyczności ciąż bliźniaczych. Moje wstępne wyniki, oparte na 22 loci STR, wykazały znaczną przydatność genotypowania markerów STR w cfDNA osocza matki do diagnostyki prenatalnej zygotyczności ciąż bliźniaczych. Jeśli chodzi o wykrywanie dizygotyczności ciąż bliźniaczych, zestaw 22 markerów STR posiadał 67% czułość, 100% swoistość i 82% dokładność. Oznacza to, że po genotypowaniu 22 markerów STR ok. 2/3 ciąż bliźniaczych DZ można sklasyfikować jako ciążę niskiego ryzyka, ograniczając liczbę pacjentek wymagających częstych wizyt kontrolnych oraz obniżając koszty opieki prenatalnej.

Większość cfDNA izolowanego z osocza kobiet ciężarnych stanowi matczyne DNA, podczas gdy składnik mniejszościowy (w tym przypadku DNA płodu) może zostać niewykryty w badaniu markerów STR, jeśli stanowi mniej niż 5% mieszaniny (stosunek 1:20 [75]). Jako że DNA płodu stanowi średnio 3–20% całkowitego cfDNA w osoczu, allele płodu mogą zostać niewykryte w analizie polimorfizmu STR techniką QF-PCR. Z tego powodu moją uwagę zwróciły markery DIP-STR, które umożliwiają wykrycie alleli składnika mniejszościowego (w tym przypadku DNA płodu) w obecności składnika większościowego (w tym przypadku DNA matki), nawet gdy stosunek obu składników wynosi zaledwie 1:1000 [60]. Castella i wsp. [60] wykazali przydatność genotypowania markerów DIP-STR w mieszaninach DNA również w przypadku mikrochimeryzmu

plodowo-matczyne. Wyniki analizy polimorfizmu DIP-STR w próbkach osocza kobiet w ciąży bliźniaczej wykazały mniejszą przydatność analizowanego zestawu markerów DIP-STR w wykrywaniu dizygotyczności ciąży (czułość 13%, swoistość 100%, dokładność 54%) w porównaniu z zestawem PowerPlex Fusion. Jednak analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi markerami STR i DIP-STR w zdolności do rozpoznania dizygotyczności ciąży bliźniaczych, co sugeruje, że wyższa użyteczność zestawu PowerPlex Fusion w porównaniu z opracowanymi we własnym zakresie multipleksami do analizy polimorfizmu DIP-STR wynikała z większej liczby markerów zawartych w zestawie PowerPlex Fusion (22 markery STR vs. 7 markerów DIP-STR). Należy jednak zaznaczyć, że opisane w pracy doktorskiej badania zostały przeprowadzone na kobietach aż do 41. tygodnia ciąży, kiedy zawartość DNA płodu w osoczu jest najwyższa. W przyszłości warto by ograniczyć badaną grupę do kobiet we wczesnej ciąży, kiedy DNA płodu stanowi tylko 3–10% osocza cfDNA, co mogłoby wykazać przewagę markerów DIP-STR nad typowymi markerami mikrosatelitarnymi. Mimo że nie zaobserwowano korelacji między frakcją męskiego DNA w cfDNA osocza matki (odpowiadającą frakcji DNA płodu w ciążach bliźniaczych bez płodów żeńskich) z liczbą wykrytych alleli płodu, była ona bardzo bliska istotności statystycznej w przypadku markerów STR, ale nie w przypadku markerów DIP-STR, co sugeruje zależność możliwości wykrycia dizygotyczności ciąży w badaniu polimorfizmu STR od udziału płodowego DNA w cfDNA osocza. Oznacza to, że czułość badania polimorfizmu STR w diagnostyce dizygotyczności ciąży bliźniaczych będzie rosła wraz z wiekiem ciąży.

Bardzo istotną czynnością dla podwyższenia czułości testu STR jest pobranie krwi obwodowej matki do probówek z K3-EDTA, zwirowanie krwi i oddzielenie osocza do 8 godzin od pobrania do dalszej izolacji cfDNA z osocza [63]. Zapobiega to nadmiernemu uwalnianiu matczynej frakcji do cfDNA osocza poprzez stabilizację komórek krwi matki.

Określenie zygotyczności ciąży bliźniaczych na podstawie cfDNA z osocza kobiet ciężarnych jest obecnie możliwe również poprzez analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów przy zastosowaniu masowego sekwencjonowania równoległego (MPS; [52, 53]). Jednak metoda ta wymaga użycia stosunkowo dużych ilości cfDNA, dochodzących do 30 ng [52], podczas gdy ilość DNA uzyskanego z osocza matki jest często znikoma (w niniejszym badaniu z 200  $\mu$ l osocza uzyskiwano średnio 10 ng cfDNA) i w wielu przypadkach nie pozwoliłaby na określenie zygotyczności za pomocą MPS, nawet jeśli

cfDNA wyizolowano by z 600 µl osocza tak jak w badaniu Zheng i wsp. [53]. Co więcej, zastosowanie MPS wiąże się z wysokimi kosztami, sięgającymi kilkuset USD na jedną pacjentkę. Całkowity koszt oceny zygotywności z użyciem badanych zestawów markerów STR lub DIP-STR nie przekracza 10 USD na jedną pacjentkę w ciąży bliźniaczej. Ponadto badanie zygotywności metodą analizy polimorfizmu STR i DIP-STR jest bardzo szybkie i proste, podczas gdy MPS wymaga czasochłonnego przygotowania próbek i zaawansowanej analizy bioinformatycznej. Jak zademonstrowano na rycinach 1 i 2, interpretacja profili STR i DIP-STR jest prosta i jednoznaczna, z 4 allelami wykrytymi w jednym lub więcej markerów STR/DIP-STR wskazującymi na bliźnięta DZ. Należy również podkreślić, że dotychczas opublikowane badania zygotywności z użyciem MPS, opierały się tylko na kilku przypadkach ciąży bliźniaczych (8 przypadków badanych przez Qu i wsp. oraz 4 przypadki badane przez Zheng i wsp. [52, 53]), podczas gdy moje badania opierały się na 28 ciążach bliźniaczych.

Pewnym ograniczeniem opracowanej metody jest ryzyko wyniku fałszywie dodatniego (błędne wykrycie ciąży DZ) w przypadku trisomii wynikającej z ojcowskiej nondysjunkcji. Z tego względu należy interpretować 4 allele w markerach STR lub DIP-STR zlokalizowanych na jednym chromosomie, zwłaszcza na chromosomie 21, 18 lub 13, jako wynik wskazujący na ciążę bliźniaczą DZ tylko wtedy, gdy w innych testach prenatalnych wykluczona została trisomia. Wykrycie 4 alleli jest również możliwe w ciążach bliźniaczych MZ, jeśli ciąża jest wynikiem zapłodnienia *in vitro* z dawstwem komórek jajowych. Dlatego rozpoznanie zygotywności ciąży bliźniaczej w badaniu genetycznym zawsze powinno być poprzedzone wywiadem medycznym w kierunku zastosowania technik wspomaganego rozrodu.

**W drugiej publikacji** rutynowe badanie ultrasonograficzne 42 ciąż bliźniaczych w pierwszym trymestrze wykazało 21 ciąż dwukosmówkowych niskiego ryzyka (50%) i 21 ciąż jednokosmówkowych wysokiego ryzyka (50%). Badanie DNA krwi pępowinowej wykazało 23 pary bliźniąt o różnych genotypach (cięższe dizygotyczne niskiego ryzyka, 55%) i 19 par bliźniąt o identycznych genotypach (cięższe monozygotyczne wysokiego ryzyka, 45%). Wykryto 4 cięższe (10%), które zostały zdiagnozowane ultrasonograficznie jako jednokosmówkowe dwuowodniowe (MC DA) wysokiego ryzyka, natomiast badania DNA po porodzie wykazały, że były to cięższe dizygotyczne niskiego ryzyka. Stanowiły one 19% wszystkich ciąż jednokosmówkowych wysokiego ryzyka wykrytych w badaniu ultrasonograficznym. **Szczegółowy rozkład wyników przedstawiono w tabeli 1 w publikacji 2.**



Kosmówkowość jest uznawana za najważniejszy wyznacznik przebiegu ciąży bliźniaczej, jako że ryzyko powikłań i zgonu okołoporodowego jest znacznie wyższe w ciąży MC. Wynika to głównie z komplikacji związanych z rozwojem bliźniaczych zespołów naczyniowych (anastomoz) we wspólnym łożysku i obejmujących zespół przetoczenia krwi pomiędzy płodami, zespół odwróconej perfuzji tętniczej i ograniczone do jednego z bliźniąt wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu. Z tego względu dokładna diagnostyka prenatalna kosmówkowości ma duże znaczenie kliniczne w postępowaniu w ciążach bliźniaczych, ponieważ wskazuje na konieczność zapewnienia odpowiedniego nadzoru nad ciążami MC i umożliwia wykrycie powikłań na wczesnym etapie [17]. Badanie ultrasonograficzne wykonywane co dwa tygodnie ciąży MC umożliwia wczesne rozpoznanie zespołu TTTS w porównaniu z tradycyjną kontrolą comiesięczną, uważaną za wystarczającą do nadzoru nad ciążą DC [12]. Ponadto, aby zminimalizować liczbę zgonów okołoporodowych, poród należy rozważyć wcześniej w ciążach MC niż DC (36. vs. 37. tydzień ciąży) [76]. Jednakże określenie kosmówkowości w ciąży bliźniaczej w badaniu ultrasonograficznym może być problematyczne, gdy ciężarna nie wykona badania w pierwszym trymestrze ciąży, jest otyła lub gdy objętość płynu owodniowego jest zmniejszona [67]. Ponadto zdarzają się przypadki ciąż MC z uwidocznionym znakiem lambda między 10. a 14. tygodniem ciąży, a więc błędnie diagnozowanych jako ciążę DC niskiego ryzyka [68]. Odwrotne błędne diagnozy ciąż DC jako MC przed 14. tygodniem ciąży są również spotykane w praktyce medycznej [77]. W naszym badaniu aż 10% ciąż (4 przypadki) zostało błędnie zdiagnozowanych we wczesnym badaniu ultrasonograficznym jako ciążę MC wysokiego ryzyka, natomiast badanie DNA wykazało, iż były to ciążę DZ. Rozbieżność tą można wytłumaczyć zjawiskiem fuzji łożysk w ciąży DZ [78]. Te 4 błędne wyniki badania kosmówkowości zostały uzyskane na dwóch różnych oddziałach położniczych w Gdańsku przez różnych lekarzy zajmujących się ultrasonografią położniczą i przy użyciu innego sprzętu, co wyklucza błąd systematyczny jednego lekarza jako wyjaśnienie zaobserwowanych rozbieżności. Należy zauważyć, że dizygotyczność wykryta prenatalnie eliminuje potrzebę dokładnej oceny ultrasonograficznej kosmówkowości i częstych wizyt prenatalnych, jako że bliźnięta DZ są DC nawet w przypadku zrośniętych łożysk, które z reguły nie tworzą anastomoz skutkujących zespołem przetoczenia krwi między płodami jak w przypadku ciąż MC [79]. Z drugiej strony, jeśli nie da się jednoznacznie określić kosmówkowości, wynik badania DNA wskazujący na monozygotyczność ciąży nie rozwiązuje problemu planowej opieki nad ciężarną.

W takich przypadkach zawsze należy założyć bardziej pesymistyczny wariant ciąży MC, ponieważ bezpieczniej jest badać ciężarną pacjentkę co dwa tygodnie niż zbyt późno wykryć powikłania.

Jeśli ocena kosmówkowości jest niemożliwa, około 50% ciąż DZ można zidentyfikować w badaniu ultrasonograficznym w połowie ciąży jako ciążę DC niskiego ryzyka na podstawie różnej płci bliźniąt. Chociaż określenie płci płodów jest możliwe także w I trymestrze, charakteryzuje się dużym ryzykiem błędu [80]. Dwie oddzielne masy łożyska również wskazują na ciążę DC niskiego ryzyka, ale obserwuje się je tylko w ok. 1/3 ciąż bliźniaczych [12]. Swoją drogą w populacjach europejskich aż 2/3 ciąż bliźniaczych stanowią ciążę DZ [6, 11]. W związku z tym czuły i swoisty test DNA określający zygotyczność ciąży, wykonany niezależnie we wczesnej lub średnio zaawansowanej ciąży, ogranicza diagnozę ciąży bliźniaczej wysokiego ryzyka do 33% ciąż, które są MZ. Chociaż ultrasonograficzna ocena kosmówkowości lepiej rozróżnia ciążę bliźniacze wysokiego i niskiego ryzyka, ograniczając rozpoznanie ciąży bliźniaczej wysokiego ryzyka do 25% ciąż bliźniaczych, które są MC [12], moje badania wykryły aż 10% przypadków ciąż bliźniaczych błędnie zdiagnozowanych ultrasonograficznie jako ciążę MC wysokiego ryzyka, które od samego początku można by traktować jako ciążę niskiego ryzyka, gdyby prenatalne badanie DNA w kierunku zygotyczności ciąży było dostępne i zostałyby przeprowadzone.

Pewnym ograniczeniem moich badań jest fakt, że zygotyczność bliźniąt była oceniana po urodzeniu, podczas gdy obecnie dostępne prenatalne testy DNA do oceny zygotyczności mogą charakteryzować się niższą czułością prawidłowego rozpoznania zygotyczności oraz wyższymi wymaganiami dotyczącymi ilości DNA niezbędnej do przeprowadzenia badania [24, 52, 53]. Jednak celem badań opisanych w publikacji 2 nie była ocena przydatności wybranej techniki prenatalnego badania DNA pod kątem określenia zygotyczności ciąży, ale zaprezentowanie potencjalnych możliwości prenatalnych testów genetycznych do nieinwazyjnej oceny ryzyka powikłań w ciążach bliźniaczych.

## Wnioski

1. Stosunkowo wysoka czułość, swoistość i dokładność w wykrywaniu dizygotyczności ciąż bliźniaczych, niewielka ilość DNA niezbędna do przeprowadzenia badania, niskie koszty i prostota analizy czynią markery STR używane w genetycznej identyfikacji osobniczej przydatnym narzędziem do prenatalnego, nieinwazyjnego oznaczania zygotyczności ciąży.
2. Przedstawione w rozprawie doktorskiej nowo opracowane zestawy do badania polimorfizmu DNA przy użyciu kompleksowej reakcji PCR i elektroforezy kapilarnej umożliwiają jednoczesną analizę (amplifikację, rozdział, detekcję i oznaczanie alleli) 7 markerów DIP-STR i markera płci, osobno dla alleli z delecją (S) i alleli z insercją (L).
3. Nowo opracowane zestawy do badania polimorfizmu DIP-STR posiadają ograniczoną przydatność w prenatalnym oznaczaniu zygotyczności ciąż bliźniaczych.
4. Markery STR i DIP-STR posiadają podobną przydatność w różnicowaniu ciąż bliźniaczych wysokiego i niskiego ryzyka w przypadku pacjentek w drugiej połowie ciąży. Wyższa czułość w wykrywaniu dizygotyczności ciąż zestawu PowerPlex Fusion w porównaniu do opracowanych we własnym zakresie zestawów do analizy polimorfizmu DIP-STR wynika z trzykrotnie wyższej liczby markerów STR wchodzących w skład zestawu PowerPlex Fusion.
5. Prenatalne badanie zygotyczności ciąż bliźniaczych w oparciu o cfDNA osocza matki posiada duży potencjał w różnicowaniu ciąż bliźniaczych wysokiego i niskiego ryzyka, zwłaszcza w przypadkach, gdy kosmówkowości i zygotyczności nie można wiarygodnie określić za pomocą badania ultrasonograficznego, oraz jako badanie uzupełniające, umożliwiające wykrycie ciąż błędnie zdiagnozowanych ultrasonograficznie jako ciążę MC.

## Piśmiennictwo

1. Gall SA. *Multiple pregnancy and delivery*. St. Louis, MO: Mosby 1996.
2. Smits J, Monden C. Twinning across the developing world. *PLoS One*. 2011; 6, e25239.
3. Pison G, D'Addato AV. Frequency of twin births in developed countries. *Twin Research and Human Genetics*. 2006; 9: 250–259.
4. Pison G, Monden C, Smits J. Twinning rates in developed countries: Trends and explanations. *Population and Development Review*. 2015; 41: 629–649.
5. Heino A, Gissler M, Hindori-Mohangoo AD, et al. Variations in multiple birth rates and impact on perinatal outcomes in Europe. *PLoS One*. 2016; 11: e0149252.
6. Blickstein I, Verhoeven HC, Keith LG. Zygotic splitting after assisted reproduction. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340: 738–739.
7. Doyle P. The outcome of multiple pregnancy. *Human Reproduction*. 1996; 11: 110–117.
8. Wimalasundera R, Fisk N. In-vitro fertilization and risk of multiple pregnancy. *The Lancet*. 2002; 360: 414.
9. Benson CB, Doubilet PM. Ultrasound in/of multiple gestations. *Seminars in Roentgenology*. 1991; 26: 50–62.
10. Golan A, Amit A, Baram A, et al. Unusual cord intertwinning in monoamniotic twins. *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1981; 22: 165–167.
11. Machin GA. Conjoined twins: Implications for blastogenesis. *Birth Defects: Original Article Series*. 1993; 29: 141–179.
12. Moise KJ, Argoti PS. Society for Maternal-Fetal Medicine. The importance of determining chorionicity in twin gestations. *Contemporary Obstetrics & Gynecology*. 2013; 58: 35–43.
13. Fuchs K, D'Alton M. Dichorionic diamniotic twin gestations. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*. 2018: 648–650.e1.
14. Derom C, Derom R, Vlietinck R, et al. Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *The Lancet*. 1987; 1: 1236–1238.
15. Edwards R, Mettler L, Walters D. Identical twins and in vitro fertilization. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF*. 1986; 3: 114–117.

16. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, et al. The lambda sign at 10-14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstetrics Gynecology*. 1996; 7: 421–423.
17. D’Addario V, Rossi C. Diagnosis of chorionicity: the role of ultrasound. *Diagnostico Prenatal*. 2014; 25: 58–64.
18. Benson CB, Doubilet PM. Cięża wielopłodowa. *Medycyna Praktyczna*. 2000; 1: 51–63.
19. Hickey J, Goldberg F. *Ultrasound review of obstetrics and gynecology* (1st ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 1996.
20. Dalton M, Dudley D. The ultrasonographic prediction of chorionicity in twin gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1989; 160: 557–561.
21. Baldwin VJ. *Pathology of multiple pregnancy* (1st ed.). New York, NY: Springer-Verlag 1994.
22. Campbell DM. Cięża mnoga-epidemiologia. *Wiadomości Położniczo-Ginekologiczne*. 2000; 3: 224–239.
23. Bajoria R, Kingdom J. The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy. *Prenatal Diagnosis*. 1997; 17: 1207–1225.
24. Dziennik A, Preis K, Świątkowska-Freund M, et al. Genotyping of STR and DIP-STR markers in plasma cell-free DNA for simple and rapid noninvasive prenatal diagnosis of zygosity of twin pregnancies. *Twin Research and Human Genetics*. 2019; 22: 321–329.
25. Monteagudo A, Timor-Tritsch IE, Sharma S. Early and simple determination of chorionic and amniotic type of multifetal gestations in the first fourteen weeks by high-frequency transvaginal ultrasonography. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994; 170: 824–829.
26. Landy HJ, Nies BM. The vanishing twin. In: Keith LG, Papiernik E, Keith DM, et al. (eds.). *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation and Perinatal Outcome*, 1st ed. The Parthenon Publishing Group, New York 1995: 59–71.
27. Simpson LL, Miller RS. Twin-twin transfusion syndrome. In: Copel JA, D’Alton ME, Feltovich H, et al. (eds.). *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*, 2nd ed. Elsevier, Philadelphia 2018: 651–659.
28. Craig JM, Segal NL, Umstad MP, et al. Zygosity testing should be encouraged for all same-sex twins: FOR: A genetic test is essential to determine zygosity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2015; 122: 1641.

29. Brown R. Zygosity testing should be encouraged for all same-sex twins: AGAINST: Benefit of this knowledge should be weighed against the potential pitfalls. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2015; 122: 1641.
30. Derom R, Bryan E, Derom C, et al. Twins, chorionicity and zygosity. *Twin Research*. 2001; 4: 134–136.
31. Appelman Z, Manor M, Magal N, et al. Prenatal diagnosis of twin zygosity by DNA ‘fingerprint’ analysis. *Prenatal Diagnosis*. 1994; 14: 307–309.
32. Norton ME, D'Alton ME, Bianchi DW. Molecular zygosity studies aid in the management of discordant multiple gestations. *Journal of Perinatology*. 1997; 17: 202–207.
33. Kovacs B, Shahbahrani B, Platt LD, et al. Molecular genetic prenatal determination of twin zygosity. *Obstetrics and Gynecology*. 1988; 72: 954–956.
34. Chen CP, Chern SR, Wang W. Rapid determination of zygosity and common aneuploidies from amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Human Reproduction*. 2000; 15: 929–934.
35. Levy R, Mirlesse V, Jacquemard F, et al. Prenatal diagnosis of zygosity by fetal DNA analysis, a contribution to the management of multiple pregnancies: A series of 31 cases. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2002; 17: 339–342.
36. Cirigliano V, Canadas P, Plaja A, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies and zygosity in multiple pregnancies by amniocentesis with single insertion of the needle and quantitative fluorescent PCR. *Prenatal Diagnosis*. 2003; 23: 629–633.
37. Fang Q, An N, Wu XY, et al. Short tandem repeat polymerase chain reaction used in prenatal diagnoses of the zygosity and common chromosomal trisomies in multiple pregnancies. *National Medical Journal of China*. 2004; 84: 667–670.
38. Azuma C, Kamiura S, Nobunaga T, et al. Zygosity determination of multiple pregnancy by deoxyribonucleic acid fingerprints. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1989; 160: 734–736.
39. Allyse M, Sayres LC, King JS, et al. Cell-free fetal DNA testing for fetal aneuploidy and beyond: Clinical integration challenges in the US context. *Human Reproduction*. 2012; 27: 3123–3131.
40. Lo YM. Fetal nucleic acids in maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137: 140–143.

41. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 1734–1738.
42. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*. 2007; 110: 687–694.
43. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update*. 2008; 15, 139–151.
44. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012, 12: S19–S26.
45. Flori E, Doray B, Gautier E, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Human Reproduction*. 2004; 19: 723–724.
46. Hochstenbach R, Nikkels PG, Elferink MG, et al. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast: Proof from a unique case. *Clinical Case Reports*. 2015; 3: 489–491.
47. Evans PC, Lambert N, Maloney S, et al. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*. 1999; 93: 2033–2037.
48. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 62: 768–775.
49. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, et al. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *American Journal of Pathology*. 2006; 169: 400–404.
50. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105: 19920–19925.
51. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*. 2013; 33: 662–666.

52. Qu JZZ, Leung TY, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clinical Chemistry*. 2013; 59: 427–435.
53. Zheng J, Xu C, Guo J, et al. Effective noninvasive zygosity determination by maternal plasma target region sequencing. *PLoS One*. 2013; 8: e65050.
54. Norwitz ER, McNeill G, Kalyan A, et al. Validation of a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test in twin gestations: determination of zygosity, individual fetal sex, and fetal aneuploidy. *Journal of Clinical Medicine*. 2019; 8: 937.
55. Bai Z, Zhao H, Lin S, et al. Evaluation of a microhaplotype-based noninvasive prenatal test in twin gestations: determination of paternity, zygosity, and fetal fraction. *Genes*. 2020; 12.
56. Butler JM. *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology* (1st ed.). Waltham, MA: Elsevier 2012.
57. Gill P, Kimpton C, d'Aloja E, et al. Report of the European DNA profiling group (EDNAP)—Towards standardization of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International*. 1994; 65: 51–59.
58. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5: 739–751.
59. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, et al. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences*. 2001; 46: 647–660.
60. Castella V, Gervaix J, Hall D. DIP-STR: Highly sensitive markers for the analysis of unbalanced genomic mixtures. *Human Mutation*. 2013; 34: 644–654.
61. Cereda G, Biedermann A, Hall D, et al. An investigation of the potential of DIP-STR markers for DNA mixture analyses. *Forensic Science International: Genetics*. 2014; 11: 229–240.
62. Oldoni F, Castella V, Hall D. A novel set of DIP-STR markers for improved analysis of challenging DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 19: 156–164.
63. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, et al. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: Accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One*. 2011; 6: e25202.



64. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19: 5444.
65. Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*. 2004; 37: 226–231.
66. Carroll SG, Tyfield L, Reeve L, et al. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005; 193: 757–761.
67. Lee AK, Oh KJ, Lee SM, et al. The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. *Twin Research and Human Genetics*. 2010; 13: 609-619.
68. Yamashita A, Ishii K, Hidaka N, et al. Monochorionic monozygotic twin pregnancy complicated with twin-twin transfusion syndrome presenting with an obvious lambda sign in the first trimester. *Fetal Diagnosis Therapy*. 2015; 37: 154-156.
69. Arabin B, van Eyck J. The role of ultrasound in multiple pregnancy. *Twin Research*. 2001; 4: 141–145.
70. Bohec C, Douet-Guilbert N, Basinko A, et al. Difficult diagnosis and management of an heterokaryotypic monochorionic twin pregnancy with discordant fetal sex and 45,X/47,XYX karyotypes. *Fetal Pediatric Pathology*. 2010; 29: 424–430.
71. Wachtel SS, Somkuti SG, Schinfeld JS. Monozygotic twins of opposite sex. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2000; 91: 293–295.
72. Chen K, Chmait RH, Vanderbilt D, et al. Chimerism in monochorionic dizygotic twins: Case study and review. *American Journal Of Medical Genetics Part A*, 2013; 161A: 1817–1824.
73. McNamara HC, Kane SC, Craig JM, et al. A review of the mechanisms and evidence for typical and atypical twinning. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016; 214: 172–191.
74. Smid M, Galbiati S, Vassallo A, et al. Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clinical Chemistry*. 2003; 49: 1526–1528.
75. Butler JM. *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation* (1st ed.). Kidlington, UK: Elsevier 2015.

76. Cheong-See F, Schuit E, Arroyo-Manzano D, et al. Prospective risk of stillbirth and neonatal complications in twin pregnancies: systematic review and meta-analysis. *The BMJ*. 2016; 354: i4353.
77. Stenhouse E, Hardwick C, Maharaj S, et al. Chorionicity determination in twin pregnancies: how accurate are we? *Ultrasound Obstetrics Gynecology*. 2002; 19: 350–352.
78. Calomfirescu-Avramescu A, Demetrian M, Grecu G, et al. Placental fusion in a dichorionic-diamniotic IVF twin pregnancy-case presentation. *Romanian Journal of Medical Practise*. 2020; 15: 97–100.
79. Benirschke K. The biology of the twinning process: how placentation influences outcome. *Seminars in Perinatology*. 1995; 19: 342–350.
80. Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaides KH. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 1999; 13: 305–307.

## **Publikacje będące przedmiotem dysertacji**

## Article

# Genotyping of STR and DIP–STR Markers in Plasma Cell-Free DNA for Simple and Rapid Noninvasive Prenatal Diagnosis of Zygosity of Twin Pregnancies

Agnieszka Dziennik<sup>1</sup>, Krzysztof Preis<sup>2</sup>, Małgorzata Świątkowska-Freund<sup>2</sup> and Krzysztof Rębała<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland and <sup>2</sup>Department of Obstetrics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

## Abstract

Due to the high rate of complications, special medical care must be provided especially for monozygotic twin pregnancies, which are characterized as having 2.5 times higher mortality of fetuses. In recent years, examination of cell-free DNA (cfDNA) circulating in maternal plasma has become a useful noninvasive method of prenatal diagnosis. However, fetal DNA constitutes only 3–20% of plasma cfDNA during pregnancy. Short tandem repeats (STRs) are routinely used in forensic examination of DNA mixtures and are able to identify 5% minority components. Haplotypes of deletion/insertion polymorphisms and STRs (DIP–STRs) are able to detect even 0.1% minority components of DNA mixtures. Thus, STRs and DIP–STRs seem to be a perfect tool for detection of fetal alleles in DNA isolated from maternal plasma. Here, we present a novel noninvasive prenatal diagnosis technique of determination of pregnancy zygosity based on examination of fetomaternal microchimerism of plasma cfDNA with the use of STRs and DIP–STRs. Our preliminary results based on 22 STR loci showed 67% sensitivity, 100% specificity and 82% accuracy for prenatal detection of twin dizygosity. The corresponding values for seven DIP–STRs were 13%, 100% and 54%, respectively. Owing to assay performance, low DNA input requirements, low costs (below 10 USD per patient) and simplicity of analysis, genotyping of STR/DIP–STR markers in maternal plasma cfDNA may become a useful supplementary test for noninvasive prenatal diagnosis of twin zygosity in cases when chorionicity and zygosity cannot be reliably determined by ultrasound examination and prognostic value may be provided by a DNA test determining pregnancy zygosity.

**Keywords:** Twin pregnancy; prenatal diagnosis; twin zygosity; plasma cell-free DNA; short tandem repeats (STRs); deletion and insertion polymorphism (DIP)

(Received 1 June 2019; accepted 10 September 2019; First published online 17 October 2019)

Twin pregnancy is a common phenomenon. According to Hellin's law discovered in 1895, it used to occur, on average, once per 80 births (Gall, 1996). Later studies revealed strong variation in frequency of twin births among different populations. The lowest twinning rate of less than 0.9% is found in populations of South America and East, Southeast and South Asia, whereas the highest values of more than 1.8% are characteristic of many African populations (Smits & Monden, 2011). The frequency of twin pregnancies in developed countries of Europe, Oceania and North America used to fall in between, but it has grown dramatically over the last four decades, reaching values observed in sub-Saharan Africa (Pison & D'Addato, 2006; Pison et al., 2015). The increase of occurrence of twin pregnancies is assumed to result from a shift in age at first reproduction (the share of twin pregnancies grows with the age of a mother) and from more and more common use of assisted reproduction technology (Blickstein et al., 1999; Doyle, 1996; Wimalasundera & Fisk, 2002).

Twin pregnancies are classified as dizygotic (DZ; resulting from fertilization of two ova by two sperms) and monozygotic (MZ;

resulting from division of an embryo to two identical embryonic structures within the first 14–16 days from fertilization of one ovum by one sperm; Benson & Doubilet, 1991; Golan et al., 1981; Machin, 1993). In European populations, MZ and DZ pregnancies constitute 30% and 70% of twin pregnancies, respectively (Blickstein et al., 1999; Machin, 1993). While pharmacological ovarian stimulation and multiple embryo transfer are related to higher frequency of polyzygotic pregnancies, *in vitro* technology is suspected to provoke later divisions of embryos due to manipulation of the zona pellucida (Blickstein et al., 1999; Derom et al., 1987; Edwards et al., 1986).

Multiple pregnancies, including twin pregnancies, are regarded as pathological in humans as far as they are related to 4–10 times higher rates of complications (including fatal outcomes) for a pregnant woman and for fetuses (Baldwin, 1994; Campbell, 2000). Thus, they require special medical care during pregnancy. It concerns especially MZ twin pregnancies, which are characterized by at least 2.5 times higher mortality of fetuses (Landy & Nies, 1995; Monteagudo et al., 1994), mainly due to twin-to-twin transfusion syndrome (TTTS) in monochorionic diamniotic pregnancies, which constitute about two-thirds of MZ twin pregnancies (Simpson & Miller, 2018).

In recent years, testing of cell-free DNA (cfDNA) circulating in the plasma of pregnant women has become another, besides

**Author for correspondence:** Krzysztof Rębała, Email: [k.rebala@gumed.edu.pl](mailto:k.rebala@gumed.edu.pl)

**Cite this article:** Dziennik A, Preis K, Świątkowska-Freund M, and Rębała K. (2019) Genotyping of STR and DIP–STR Markers in Plasma Cell-Free DNA for Simple and Rapid Noninvasive Prenatal Diagnosis of Zygosity of Twin Pregnancies. *Twin Research and Human Genetics* 22: 321–329, <https://doi.org/10.1017/thg.2019.89>

© The Author(s) 2019.

ultrasound examination, very useful, noninvasive method of prenatal screening, which is safe for both the mother and the fetus (Allyse *et al.*, 2012; Lo, 2008; Lo, Hjelm *et al.*, 1998; Mujezinovic & Alfrevic, 2007; Wright & Burton, 2008). Apoptosis of placental cells leads to the presence of placental DNA in the mother's bloodstream (Faas *et al.*, 2012; Flori *et al.*, 2004; Hochstenbach *et al.*, 2015), which is known as feto-maternal microchimerism (Evans *et al.*, 1999; Lo, Tien *et al.*, 1998; Tjoa *et al.*, 2006). The content of placental DNA, commonly referred to in plasma cfDNA studies as fetal DNA, increases with gestational age, and according to various authors, it may constitute on average 3–10% of cfDNA circulating in plasma in early pregnancy and 6–20% of cfDNA in late pregnancy (Lo, Tien *et al.*, 1998; Lun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Microsatellites, commonly known as short tandem repeats (STRs), constitute genome fragments with a variable number of tandem repeats of short repetitive units of 1–6 bp (Butler, 2012). Due to a high level of polymorphism, these markers have found wide applications in forensic medicine for genetic human identification (Gill *et al.*, 1994; Jobling & Gill, 2004; Moretti *et al.*, 2001). Capillary electrophoresis is a technique used routinely in forensic genetics for separation and detection of STRs and enables differentiation of alleles differing in size by only one nucleotide. A significant number of observed alleles makes STR markers a perfect tool for analysis and differentiation of DNA mixtures coming from at least two individuals, which suggests their potential usefulness in detecting fetal alleles in the case of feto-maternal microchimerism.

Deletion/insertion polymorphism–STR (DIP–STR) markers constitute haplotypes comprising two polymorphic regions: deletion or insertion (DIP) and a microsatellite. In the case of DIP–STR markers, one of the primers recognizes a sequence complementary to deletion or insertion so that only an allele with deletion (S) or insertion (L) is amplified. In comparison to standard analysis of STR polymorphism, analysis of DIP–STR markers enables detection of an allele of a subject whose DNA constitutes a minority component in the mixture of DNA from two subjects, even if the content of this subject's DNA is very low (Castella *et al.*, 2013; Cereda *et al.*, 2014; Oldoni *et al.*, 2015). One or two DIP–STR alleles of the minority component of highly unbalanced DNA mixtures can be identified when the major DNA contributor is DIP homozygous (SS or LL) and the minor DNA contributor is DIP heterozygous (SL), or when the major and minor DNA contributors are opposite DIP homozygous (SS/LL or LL/SS). When the minor DNA contributor has no unique S or L allele, DIP–STR typing of DNA mixtures resembles standard STR typing. Owing to the ability to detect alleles of the minority component in highly unbalanced DNA mixtures, DIP–STRs seem to be an even better tool for the detection of fetal alleles in DNA isolated from the plasma of pregnant women.

Every child inherits one allele from its mother and one from its father. The plasma of women with singleton pregnancies should contain one additional STR or DIP–STR allele inherited from a father, assuming that it is different to maternal alleles. Thus, detection of two additional nonmaternal STR or DIP–STR alleles in a plasma sample of a pregnant woman indicates a DZ twin pregnancy. The aim of our study was to assess usefulness of genotyping of STR and DIP–STR polymorphism in maternal plasma cfDNA as a cost-effective supplementary test for noninvasive prenatal diagnosis of twin zygosity in cases when chorionicity and zygosity cannot be reliably determined by ultrasound examination and a prognostic value may be provided by a DNA test determining pregnancy zygosity.

## Materials and Methods

### Materials

Samples from 28 twin pregnancies, obtained from the patients of the Department of Obstetrics at the Medical University of Gdańsk and from the patients of the Department of Obstetrics and Gynaecology at the St. Adalbert Hospital in Gdańsk, Copernicus Podmiot Leczniczy Sp. z o.o., were used in the study. For additional comparison of the amount of fetal DNA in singleton and twin pregnancies, samples from 15 singleton pregnancies with a male fetus were used. Samples of 3 mL of peripheral blood were collected from pregnant women (23–41 weeks of gestation, age: 22–46 years) into BD Vacutainer Plus Blood Collection Tubes (BD, Plymouth, UK) with K3-EDTA and stored at 2–8 °C for further processing. All samples of maternal peripheral blood were divided into two portions: 0.6 and 2.4 mL. The first portion (0.6 mL) was stored at –20 °C as reference material for determination of maternal DNA profile, while the remaining part (2.4 mL) was centrifuged within 8 h of sampling (Barrett *et al.*, 2011) in order to separate plasma (10 min at 1600 × g). The obtained plasma was centrifuged again in order to separate the remaining cell components (10 min at 16,000 × g; Ying *et al.*, 2004). Immediately after delivery, about 1.5 mL of umbilical cord blood was collected from each twin (56 samples in total) from the side of placenta after removal of the umbilical cord and stored at –20 °C until the time of DNA isolation. The study was approved by the Independent Bioethics Commission for Research at the Medical University of Gdańsk, and all patients provided their informed written consent for participation in the study.

### DNA Isolation and Measurement of DNA Concentration

cfDNA was isolated from plasma with the use of QIAamp DSP Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's manual, while DNA from maternal whole peripheral blood (the frozen portions of 0.6 mL) and from umbilical cord blood was isolated with the use of a nonenzymatic method (Lahiri & Nurnberger, 1991). Concentration of total human and male DNA isolated from plasma samples for singleton and twin pregnancies was measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with the use of Plexor HY assay (Promega; sensitivity > 0.0064 ng/μL) and 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Concentration of DNA isolated from whole peripheral blood and umbilical cord blood was measured spectrophotometrically with the use of ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA; sensitivity > 0.5 ng/μL).

### Amplification of STR and DIP–STR Markers

Commercial PowerPlex Fusion kit (Promega, Madison, WI, USA) was used to analyze polymorphism of 22 autosomal STRs (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX, vWA), one Y-chromosomal STR (DYS391) and a sex marker (amelogenin), with primers labeled with four different fluorescent dyes. PCR was conducted in Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in the total volume of 5 μL, containing 1 ng of genomic DNA from whole peripheral/umbilical cord blood or 1 ng of cfDNA isolated from plasma. For low cfDNA concentrations (<0.4 ng/μL), in order to allow addition of 1 ng of cfDNA to the reaction, the total volume of reaction mixture was increased to 10 μL. Except for the aforementioned modifications,

**Table 1.** DIP-STR markers used in the study

Marker	STR size (bp)	Chromosomal location	Fluorescent label	Allele size range (bp)	Primer concentration in multiplex S ( $\mu$ M)	Primer concentration in multiplex L ( $\mu$ M)
Amelogenin	–	X, Y	6-FAM	106–112	0.04	0.04
rs34212659-STR	4	7	6-FAM	182–194	0.16	0.12
rs142543564-STR	4	2	6-FAM	210–234	0.4	0.3
rs35032587-STR	4	15	6-FAM	239–271	0.08	0.24
rs60194384-STR	4	15	6-FAM	281–309	2.4	0.9
rs2308142-STR	3	20	VIC	213–231	0.18	0.3
rs145423446-STR	4	16	VIC	234–256	0.08	0.08
rs111478323-STR	4	2	PET	240–260	0.2	0.12

DNA amplification performed with the use of PowerPlex Fusion kit was carried out in accordance with the manufacturer's manual.

DIP-STR polymorphism was analyzed with the use of two homemade multiplex PCR systems, developed separately for amplification of deletion alleles (S) and insertion alleles (L). The analysis included DIP-STR markers with tri- and tetranucleotide repeats described so far (Castella et al., 2013; Oldoni et al., 2015), rejecting dinucleotide markers due to high stutter ratio and resulting difficulties in interpreting DNA mixtures. While designing multiplex systems, a possibility of primer dimer formation (by AutoDimer software; Vallone & Butler, 2004) and of overlapping of allele size ranges was verified. From each pair of markers with primers forming dimers, a marker with higher polymorphism (higher observed heterozygosity) was selected. Primers with overlapping allele size ranges were labeled with different fluorescent dyes. The last stage of multiplex design involved rejection of DIP-STR markers whose primers generated numerous non-specific products, that is, rs71070706-STR, rs72406828-STR and rs146332920-STR, when added to the reaction mixture. Finally, each developed multiplex included seven DIP-STR markers and the amelogenin locus as the sex marker (Table 1).

For both homemade DIP-STR multiplex systems, PCR was conducted with the use of Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen) in GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) in the total volume of 5  $\mu$ L containing 1 ng of genomic DNA from peripheral/umbilical cord blood or 1 ng of cfDNA isolated from plasma and primers with the final concentrations presented in Table 1. The 5' ends of forward primers were labeled with three different fluorescent dyes (Table 1). For low cfDNA concentrations (<0.4 ng/ $\mu$ L), in order to allow addition of 1 ng of cfDNA to the reaction, the total volume of reaction mixture was increased to 10  $\mu$ L. The thermal profile included 5 min of initial denaturation at 95 °C, 30 cycles of amplification (1 min at 94 °C, 1 min at 62 °C, 1 min at 72 °C) and 60 min of final elongation at 72 °C.

#### Capillary Electrophoresis of Amplification Products

A total of 9  $\mu$ L of Super-DI Formamide (MCLAB, South San Francisco, CA, USA) were supplemented with 1  $\mu$ L of amplification products and with 0.4  $\mu$ L of ILS 500 size standard (Promega) for PowerPlex Fusion kit or 0.4  $\mu$ L of Orange DNA Size Standard (MCLAB) for DIP-STR multiplexes. The samples were denatured for 2 min at 95 °C and immediately cooled for 3 min on ice. Subsequently, PCR products were injected for 5 s at 3 kV and separated by capillary electrophoresis at 60 °C and

15 kV in 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with the use of NanoPOP-4 polymer (MCLAB) and a 36-cm 4-capillary array. Genotypes of the analyzed samples were determined with the use of GeneMapper ID software v3.2 (Applied Biosystems) by comparison to an allelic ladder in case of PowerPlex Fusion kit or to a CEPH 1347-02 reference sample (Applied Biosystems) with a known, published DIP-STR genotype (Castella et al., 2013; Oldoni et al., 2015).

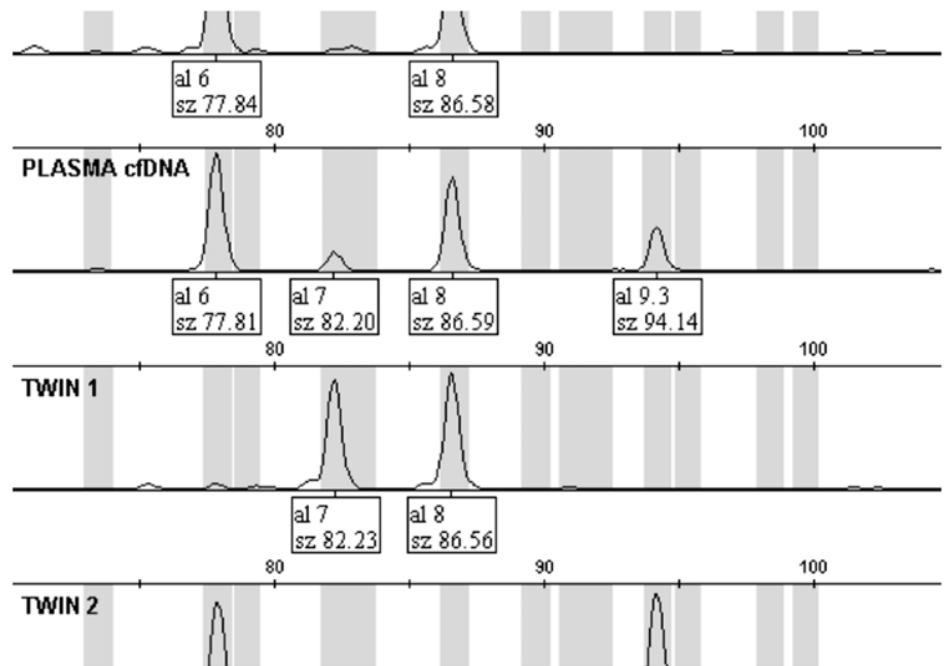
#### Statistical Analysis

Male DNA fraction in plasma cfDNA was calculated as a ratio of male DNA concentration and total human DNA concentration, measured by qPCR. A nonparametric Mann-Whitney *U* test was carried out using STATISTICA 12 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) to test for differences between STR and DIP-STR markers in their ability to detect fetal alleles in maternal plasma and to correctly diagnose dizygosity. The same software was employed to assess correlation between the fraction of male DNA in plasma cfDNA and the number of STR or DIP-STR markers with at least one detected fetal allele.

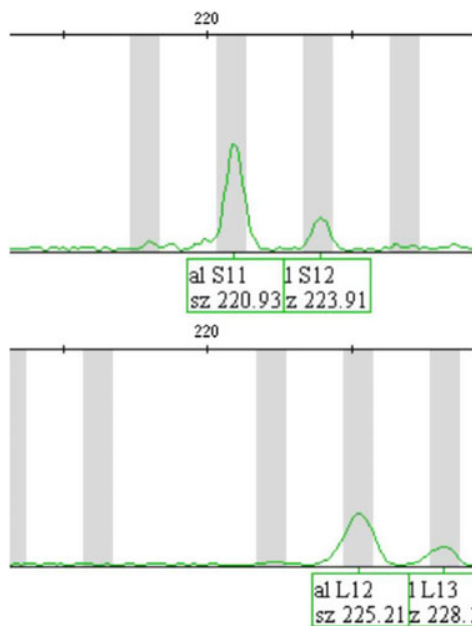
#### Results

At least one fetal STR allele was observed in each of 28 plasma samples obtained from women with twin pregnancies. In case of DIP-STR markers, two pregnancies (7.1%) revealed no fetal alleles. On the average, fetal alleles were detected in 37.2% (range: 4.5–68.2%) and 39.3% (range: 0–71.4%) of the tested 22 STRs and 7 DIP-STRs per twin pregnancy, respectively. Control DNA samples of the umbilical cord blood from twins coming from 28 pregnancies showed 15 twin-pairs with different genotypes (DZ pregnancies, 53.6%) and 13 twin-pairs with identical genotypes (MZ pregnancies, 46.4%). In case of MZ pregnancies, blood plasma collected during pregnancy always contained at most one additional STR or DIP-STR allele in comparison to maternal DNA profile obtained from peripheral blood. In case of DZ pregnancies, two additional nonmaternal alleles, clearly indicating DZ twin pregnancy, were detected in 10 plasma samples (66.7%) for STRs and in 2 plasma samples (13.3%) for DIP-STRs. Both twin pregnancies identified as DZ by DIP-STR typing of plasma cfDNA were also identified as DZ by STR typing. Examples of DNA profiles indicative of DZ twin pregnancy for STR and DIP-STR are shown in Figures 1 and 2.

In order to compare which polymorphic markers, STRs or DIP-STRs, are more robust to detect twin pregnancy dizygosity,



**Fig. 1.** STR typing of cfDNA from maternal plasma, indicating DZ twin pregnancy, collated with DNA profiles of the mother and two twins (results for marker TH01 from PowerPlex Fusion kit). Two higher peaks correspond to maternal alleles (6 and 8), which were also observed in DNA extracted from maternal peripheral blood (genotype of a mother: 6,8). Two lower peaks correspond to fetal alleles (7 and 9.3), which were later detected in umbilical cord blood samples of twins after the birth (genotypes of twins: 7,8 and 6,9.3). Detection of fetal DNA by STR typing is possible when it constitutes at least 5% of cfDNA.



**Fig. 2.** DIP-STR typing of cfDNA from maternal plasma, indicating DZ twin pregnancy (a result for marker rs2308142-STR). The upper panel shows maternal alleles (S11 and S12) amplified by a multiplex PCR system for analysis of alleles with deletion (S alleles), which were also observed in DNA extracted from maternal peripheral blood (genotype of a mother: S11,S12). The lower panel shows fetal alleles (L12 and L13) amplified by a multiplex PCR system for analysis of alleles with insertion (L alleles), which were later detected in umbilical cord blood samples of twins after the birth (genotypes of twins: S12,L12 and S12,L13). As S and L alleles are amplified by different primer pairs in two separate multiplex PCR systems, detection of fetal DNA in this case is possible even when it constitutes only 0.1% of cfDNA.

we counted for each marker the number and percent of twin pregnancies in which at least one fetal allele was detected, and the number and percent of DZ twin pregnancies, in which two fetal alleles (indicating dizygosity of pregnancy) were detected (Table 2).

No statistically significant differences between STRs and DIP-STRs were observed in the ability to detect fetal alleles in plasma cfDNA (37.2% vs. 39.3% of twin pregnancies, on average, respectively; Mann-Whitney  $U$  test:  $p = .57$ ). Fetal alleles in plasma cfDNA were the most frequently observed for D12S391 (78.6% of twin pregnancies), and the least frequently for D5S818 and TPOX (7.1% of twin pregnancies). Among DIP-STRs, the most useful marker to detect fetal alleles in plasma cfDNA was rs2308142-STR (53.6% of twin pregnancies), while the least useful one was rs111478323-STR (25.0% of twin pregnancies). Similarly, no statistically significant differences between STRs and DIP-STRs were observed in the ability to detect DZ pregnancy (5.5% vs. 2.9% of twin pregnancies, on average, respectively; Mann-Whitney  $U$  test:  $p = .67$ ). Two fetal alleles indicating DZ pregnancy were observed the most frequently for D8S1179 and D12S391 (26.7% of DZ twin pregnancies). rs2308142-STR also appeared to be the most useful marker to detect dizygosity among DIP-STRs (13.3% of DZ twin pregnancies).

The mean concentration of cfDNA isolated from plasma was 0.56 ng/ $\mu$ L for twin pregnancies and 0.38 ng/ $\mu$ L for singleton pregnancies. For twin pregnancies with female fetuses, DNA concentration measurement by qPCR did not show presence of male DNA in any of the plasma samples. For singleton or twin pregnancies with at least one male fetus, male DNA constituted on average 6.0% of total cfDNA (range: 0.6–20.9%), corresponding to the mean concentration of male DNA equal to 0.031 ng/ $\mu$ L. A significantly higher fraction of fetal DNA (corresponding to male DNA measured by qPCR in pregnancies without female fetuses) was observed in twin pregnancies with two male fetuses (9.3% on average) in comparison with singleton pregnancies with one male fetus (4.6% on average; the Mann-Whitney  $U$  test:  $p = .04$ ).

No correlation between the fraction of male DNA in plasma cfDNA and the number of STR markers that showed presence of at least one fetal allele was observed for 10 twin pregnancies with two male fetuses, regardless of their zygosity ( $R^2 = .36$ ,  $p = .07$ ), and for 5 twin pregnancies with one male fetus ( $R^2 = .75$ ,  $p = .06$ ),

**Table 2.** Comparison of the tested STR and DIP-STR markers in their ability to detect fetal alleles in maternal plasma cfDNA and to detect dizygosity of twin pregnancy

Polymorphism	Marker	Number and percent of twin pregnancies, in which at least one fetal allele was detected in maternal plasma cfDNA (N=28)	Number and percent of DZ twin pregnancies, in which two fetal alleles (indicating dizygosity of pregnancy) were detected in maternal plasma cfDNA (N=15)
STR	D1S1656	12 (43%)	1 (7%)
	D2S441	9 (32%)	0
	D2S1338	12 (43%)	0
	D3S1358	20 (71%)	2 (13%)
	D5S818	2 (7%)	0
	D7S820	8 (29%)	0
	D8S1179	18 (64%)	4 (27%)
	D10S1248	5 (18%)	0
	D12S391	22 (79%)	4 (27%)
	D13S317	3 (11%)	0
	D16S539	20 (71%)	0
	D18S51	19 (68%)	2 (13%)
	D19S433	7 (25%)	0
	D21S11	13 (46%)	1 (7%)
	D22S1045	3 (11%)	0
	CSF1PO	5 (18%)	0
	FGA	6 (21%)	0
	Penta D	4 (14%)	0
	Penta E	5 (18%)	0
	TH01	19 (68%)	2 (13%)
	TPOX	2 (7%)	0
	vWA	15 (54%)	2 (13%)
DIP-STR	rs2308142-STR	15 (54%)	2 (13%)
	rs34212659-STR	13 (46%)	0
	rs35032587-STR	9 (32%)	0
	rs60194384-STR	12 (43%)	0
	rs111478323-STR	7 (25%)	0
	rs142543564-STR	9 (32%)	0
	rs145423446-STR	12 (43%)	1 (7%)

but, as reflected in *p* values, it was close to statistical significance in both groups of twin pregnancies. Similarly, no correlation between the fraction of male DNA in plasma cfDNA and the number of DIP-STR markers that showed the presence of at least one fetal allele was seen in twin pregnancies with two male fetuses ( $R^2 = .28$ ,  $p = .12$ ) and in twin pregnancies with one male fetus ( $R^2 = .03$ ,  $p = .79$ ).

## Discussion

Zygosity of twins is frequently determined in the postnatal period to satisfy the parents' curiosity, and also for the purpose of potential tissue and organ donation, and to predict the risk of genetic diseases (Brown, 2015; Craig et al., 2015). Determination of zygosity of twins is possible after birth on the basis of the sex of twins, pregnancy chorionicity, dermatoglyphs, serological

examination and DNA typing (Adamski et al., 2016; Derom et al., 1985; Derom et al., 2001). As sex and chorionicity of the twin pregnancy may also be established in the ultrasound prenatal examination, it is possible to assess zygosity before delivery as well.

It is assumed that it is more important for the course of twin pregnancy to know its chorionicity than zygosity (Bajoria & Kingdom, 1997; Carroll et al., 2005). Diagnosis of chorionicity is performed routinely by high-resolution ultrasound examination based on intertwin membrane thickness and the presence or absence of lambda or T sign between 10 and 14 weeks (Sepulveda et al., 1996). However, in the midpregnancy, this evaluation becomes unclear, and there are patients who miss their early pregnancy scan. Moreover, it is not always possible to ascertain chorionicity by ultrasound examination due to technical limitations, intrauterine crowding of fetuses, reduced amount of amniotic fluid and obesity of a pregnant woman (Lee et al.,



2010). Prediction of risk for twin pregnancy is even more complicated by false positive ultrasound diagnoses of dichorionicity (Yamashita *et al.*, 2015) and by such phenomena as fusion of chorions in DZ pregnancy or division of a chorion in MZ pregnancy (Arabin & van Eyck, 2001; Benson & Doubilet, 1991, 2000; Dalton & Dudley, 1989; Hickey & Goldberg, 1996;). In all the aforementioned cases, a DNA test to determine pregnancy zygosity may have a prognostic value (Appelman *et al.*, 1994; Norton *et al.*, 1997). Although circa 50% of DZ pregnancies may be identified by ultrasound examination due to opposite sex of twins, there are known a number of cases of sex-discordant MZ twins (Bohec *et al.*, 2010; Wachtel *et al.*, 2000). Diagnosis of dizygosity indicates an extremely low risk for TTTS, which affects as much as 5–10% of MZ pregnancies (Simpson & Miller, 2018) and was reported only in several cases of DZ pregnancies in the world (Chen *et al.*, 2013; McNamara *et al.*, 2016). Furthermore, observation of malformations in only one twin with confirmed dizygosity of pregnancy could restrict invasive diagnostic procedures to only one fetus.

Initially, prenatal determination of zygosity in multiple pregnancies based on analysis of DNA polymorphism was conducted with the use of biological material collected during amniocentesis, chorionic villus biopsy or cordocentesis (Chen *et al.*, 2000; Cirigliano *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2004; Kovacs *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 2002). In order to determine zygosity on the basis of DNA typing of such samples, molecular probes were used to analyze restriction fragment length polymorphism (Azuma *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1988) or polymorphism of sequences of PCR products (Levy *et al.*, 2002). Later, quantitative fluorescent PCR of STR markers was implemented for this purpose (Chen *et al.*, 2000; Cirigliano *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2004). However, amniocentesis, chorionic villus biopsy and cordocentesis are invasive for pregnancy and are characterized by a high risk of complications. New possibilities for diagnosis of pregnancy zygosity have appeared with studies of free fetal DNA circulating in the mother's blood. Smid *et al.* (2003) performed quantification of the *SRY* gene located on the Y chromosome in plasma of pregnant women and showed that the amount of male DNA in cfDNA is correlated with the number of male fetuses. These findings are in accordance with the results of our study based on qPCR of male DNA, which showed that the amount of fetal DNA in plasma of women with twin pregnancies is approximately twice as high as in singleton pregnancies, which confirms the possibility to use cfDNA from maternal plasma in prenatal genetic analysis of twins.

As we have found no studies of pregnancy zygosity testing based on STR polymorphism in cfDNA isolated from plasma of pregnant women, the aim of our study was to analyze the usefulness of microsatellite markers in the diagnosis of zygosity of twin pregnancies. Our preliminary results based on 22 STR loci have shown significant usefulness of STR genotyping in cfDNA of maternal plasma for prenatal diagnosis of zygosity of twin pregnancies. Regarding detection of dizygosity of twin pregnancies, the set of 22 STR markers showed 67% sensitivity, 100% specificity and 82% accuracy. It means that after genotyping of 22 STRs, roughly two-thirds of DZ twin pregnancies may be classified as low-risk twin pregnancies, narrowing the number of cases for strict and frequent ultrasound supervision and reducing costs of prenatal care. Also, as discussed later, it should be noted that accuracy of an assay seems to depend on the number of tested markers. The newest capillary electrophoresis instruments, yet unreleased to the market (e.g., Spectrum CE System from Promega), employ 8-dye technology that roughly doubles the number of markers that may be

included in one multiplex PCR system and will allow development of new STR assays with much higher sensitivity for detection of DZ twin pregnancies than the PowerPlex Fusion kit used in our preliminary study.

The majority of cfDNA isolated from the plasma of a pregnant woman is maternal DNA, while the minority component (in this case, fetal DNA) may not be detected by STR typing if it constitutes less than 5% of the mixture (1:20 ratio; Butler, 2015). As fetal DNA constitutes on the average 3–20% of the total plasma cfDNA, fetal alleles may remain undetected in analysis of STR polymorphism by quantitative fluorescent PCR. For this reason, our attention was turned to DIP-STR markers, which enable detection of alleles of the minority component (in our case, fetal DNA) in the presence of the majority component (in our case, maternal DNA) even when the ratio of both components is 1:1000 (Castella *et al.*, 2013). Castella *et al.* (2013) demonstrated the usefulness of genotyping of DIP-STR markers in DNA mixtures also in the case of fetomaternal microchimerism. Our results of DIP-STR polymorphism analysis in plasma samples from women with twin pregnancies showed lower usefulness of the analyzed set of DIP-STR markers in detecting dizygosity of pregnancy (13% sensitivity, 100% specificity, 54% accuracy) in comparison to the PowerPlex Fusion kit. However, statistical analysis revealed no significant differences between the tested STRs and DIP-STRs in capability to diagnose dizygosity of twin pregnancies, which suggests that the higher usefulness of the PowerPlex Fusion kit in comparison with the homemade multiplexes of DIP-STR markers merely results from a higher number of markers included in the PowerPlex Fusion kit (22 STRs vs. 7 DIP-STRs). It should also be noted that our preliminary study was conducted on women up to 41 weeks of gestation, when the fetal DNA content in plasma is the highest. It is possible that limitation of the studied group to pregnant women in early pregnancy, when fetal DNA constitutes only 3–10% of plasma cfDNA, would show an advantage of DIP-STR markers over typical microsatellites.

Although correlation between the fraction of male DNA (corresponding to the fraction of fetal DNA in twin pregnancies without female fetuses) and the number of detected fetal alleles was not observed, it was very close to statistical significance in the case of STRs, but not in the case of DIP-STRs. It may result from the fact that in the case of the latter, detection of minority alleles does not depend so strongly on the fraction of fetal DNA as far as DIP-STR alleles may be successfully genotyped even if the minority component (fetal DNA) constitutes much less than 5% of the DNA mixture (plasma cfDNA). However, these observations were based on only 10 twin pregnancies with two male fetuses and 5 twin pregnancies with one male fetus, so further studies with larger numbers of cases are required to confirm the higher robustness of DIP-STRs in prenatal zygosity testing of twin pregnancies. Nevertheless, *p* values at the limit of statistical significance for STR markers indicate that detection of twin pregnancy dizygosity by the STR assay is more likely to depend on the fraction of fetal DNA. Thus, sensitivity of the STR assay will grow with gestational age and will be higher if release of maternal cfDNA is prevented; for example, by stabilization of maternal blood cells after sample collection. In our study, blood samples collected in K3-EDTA tubes were used for isolation of plasma cfDNA within 8 h of sample collection (Barrett *et al.*, 2011), so the impact of maternal cfDNA release on the results seems to be negligible.

Determination of zygosity of twin pregnancies on the basis of cfDNA from plasma of pregnant women is also currently possible

with the use of massively parallel sequencing (MPS; Qu et al., 2013; Zheng et al., 2013). However, this method requires relatively large amounts of cfDNA, reaching up to 30 ng (Qu et al., 2013), while the amount of DNA obtained from maternal plasma is often scarce (in our study, 10 ng from 200  $\mu$ L of plasma, on average) and would not allow determination of zygosity with the use of MPS in many our patients, even if cfDNA was isolated from 600  $\mu$ L of plasma, as in the study by Zheng et al. (2013). Moreover, MPS is associated with relatively high costs, reaching several hundred US dollars for one patient. On the contrary, a total cost of zygosity testing with the use of our sets of STR or DIP-STR markers does not exceed USD10 for one patient with a twin pregnancy. Furthermore, twin pregnancy zygosity testing by STR and DIP-STR genotyping is very rapid and simple, whereas MPS requires laborious sample processing and advanced bioinformatic analyses. As shown in Figures 1 and 2, interpretation of STR and DIP-STR profiles is straightforward and unequivocal with four alleles detected at one or more STR/DIP-STR markers indicating DZ twins. It should also be emphasized that studies of zygosity involving the MPS method published so far were based only on a few cases of twin pregnancies (eight cases studied by Qu et al., 2013 and four cases studied by Zheng et al., 2013), while our preliminary study was based on 28 twin pregnancies.

A certain limitation of our assays is the risk of a false positive result (false detection of DZ pregnancy) in the case of trisomy resulting from paternal nondisjunction. Therefore, detection of four alleles at STR or DIP-STR markers located on one chromosome, especially on chromosome 21, 18 or 13, should be diagnosed as a result indicating DZ twin pregnancy only if trisomy is excluded by other tests. Detection of four alleles is also possible in MZ twin pregnancy if pregnancy results from *in vitro* fertilization with egg cell donation. Therefore, diagnosis of zygosity of twin pregnancy should always be preceded by medical history regarding assisted reproduction technology.

Owing to 100% specificity and lower sensitivity, results of genotyping of STR/DIP-STR markers in plasma cfDNA indicate either that a twin pregnancy is DZ or that zygosity status is undetermined. Thus, prenatal diagnosis of twin dizygosity does not need to be confirmed after birth.

In summary, relatively high sensitivity, specificity and accuracy of the assays, low DNA input requirements, low costs and simplicity of the analysis make genotyping of STR/DIP-STR markers a useful tool for noninvasive prenatal diagnosis of zygosity of twin pregnancies.

**Financial support.** This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors.

**Conflict of interest.** None.

**Ethical standards.** The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

## References

- Adamski, P., Ciach, K., Kielbratowska, B., Szczerkowska, Z., & Preis, K. (2016). DNA profiling as a method of zygosity determination in multiple pregnancy. *Ginekologia Polska*, 87, 222–225.
- Allyse, M., Sayres, L. C., King, J. S., Norton, M. E., & Cho, M. K. (2012). Cell-free fetal DNA testing for fetal aneuploidy and beyond: Clinical integration challenges in the US context. *Human Reproduction*, 27, 3123–3131.
- Appelman, Z., Manor, M., Magal, N., Caspi, B., Shohat, M., & Blickstein, I. (1994). Prenatal diagnosis of twin zygosity by DNA 'fingerprint' analysis. *Prenatal Diagnosis*, 14, 307–309.
- Arabin, B., & van Eyck, J. (2001). The role of ultrasound in multiple pregnancy. *Twin Research*, 4, 141–145.
- Azuma, C., Kamiura, S., Nobunaga, T., Negoro, T., Saji, F., & Tanizawa, O. (1989). Zygosity determination of multiple pregnancy by deoxyribonucleic acid fingerprints. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 160, 734–736.
- Bajoria, R., & Kingdom, J. (1997). The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 17, 1207–1225.
- Baldwin, V. J. (1994). *Pathology of multiple pregnancy* (1st ed.). New York, NY: Springer-Verlag.
- Barrett, A. N., Zimmermann, B. G., Wang, D., Holloway, A., & Chitty, L. S. (2011). Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: Accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One*, 6, e25202.
- Benson, C. B., & Doubilet, P. M. (1991). Ultrasound in/of multiple gestations. *Seminars in Roentgenology*, 26, 50–62.
- Benson, C. B., & Doubilet, P. M. (2000). Cięża wielopłodowa. *Medycyna Praktyczna*, 1, 51–63.
- Blickstein, I., Verhoeven, H. C., & Keith, L. G. (1999). Zygotic splitting after associated reproduction. *New England Journal of Medicine*, 340, 738–739.
- Bohec, C., Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Le Bris, M.-J., Marcorelles, P., Audrézet, M.-P., ... De Braekeleer, M. (2010). Difficult diagnosis and management of an heterokaryotypic monochorionic twin pregnancy with discordant fetal sex and 45,X/47,XXY karyotypes. *Fetal and Pediatric Pathology*, 29, 424–430.
- Brown, R. (2015). Zygosity testing should be encouraged for all same-sex twins: AGAINST: Benefit of this knowledge should be weighed against the potential pitfalls. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122, 1641.
- Butler, J. M. (2012). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology* (1st ed.). Waltham, MA: Elsevier.
- Butler, J. M. (2015). *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation* (1st ed.). Kidlington, UK: Elsevier.
- Campbell, D. M. (2000). Cięża mnoga - epidemiologia. *Wiadomości Położniczo-Ginekologiczne*, 3, 224–239.
- Carroll, S. G., Tyfield, L., Reeve, L., Porter, H., Soothill, P., & Kyle, P. M. (2005). Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193, 757–761.
- Castella, V., Gervais, J., & Hall, D. (2013). DIP-STR: Highly sensitive markers for the analysis of unbalanced genomic mixtures. *Human Mutation*, 34, 644–654.
- Cereda, G., Biedermann, A., Hall, D., & Taroni, F. (2014). An investigation of the potential of DIP-STR markers for DNA mixture analyses. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 229–240.
- Chen, C. P., Chern, S. R., & Wang, W. (2000). Rapid determination of zygosity and common aneuploidies from amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Human Reproduction*, 15, 929–934.
- Chen, K., Chmait, R. H., Vanderbilt, D., Wu, S., & Randolph, L. (2013). Chimerism in monochorionic dizygotic twins: Case study and review. *American Journal Of Medical Genetics Part A*, 161A, 1817–1824.
- Cirigliano, V., Cañadas, P., Plaja, A., Ordoñez, E., Mediano, C., Sánchez, A., & Farrán, I. (2003). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies and zygosity in multiple pregnancies by amniocentesis with single insertion of the needle and quantitative fluorescent PCR. *Prenatal Diagnosis*, 23, 629–633.
- Craig, J. M., Segal, N. L., Umstad, M. P., Cutler, T. L., Keogh, L. A., Hopper, J. L., ... Harris, J. R. (2015). Zygosity testing should be encouraged for all same-sex twins: FOR: A genetic test is essential to determine zygosity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122, 1641.
- Dalton, M., & Dudley, D. (1989). The ultrasonographic prediction of chorionicity in twin gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 160, 557–561.

- Derom, C., Bakker, E., Vlietinck, R., Derom, R., van den Berghe, H., Thiery, M., ... Pearson, P. L. (1985). Zygosity determination in newborn twins using DNA variants. *Journal of Medical Genetics*, 22, 279–282.
- Derom, C., Derom, R., Vlietinck, R., Vanden Berghe, H., & Thiery, M. (1987). Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *The Lancet*, 1, 1236–1238.
- Derom, R., Bryan, E., Derom, C., Keith, L., & Vlietinck, R. (2001). Twins, chorionicity and zygosity. *Twin Research*, 4, 134–136.
- Doyle, P. (1996). The outcome of multiple pregnancy. *Human Reproduction*, 11, 110–117.
- Edwards, R., Mettler, L., & Walters, D. (1986). Identical twins and in vitro fertilization. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF*, 3, 114–117.
- Evans, P. C., Lambert, N., Maloney, S., Furst, D. E., Moore, J. M., & Nelson, J. L. (1999). Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*, 93, 2033–2037.
- Faas, B. H., de Ligjt, J., Janssen, I., Eggink, A. J., Wijnberger, L. D., van Vugt, J. M., ... Geurts van Kessel, A. (2012). Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12, S19–S26.
- Fang, Q., An, N., Wu, X. Y., Liu, Q. L., & Feng, S. H. (2004). Short tandem repeat polymerase chain reaction used in prenatal diagnoses of the zygosity and common chromosomal trisomies in multiple pregnancies. *National Medical Journal of China*, 84, 667–670.
- Flori, E., Doray, B., Gautier, E., Kohler, M., Ernault, P., Flori, J., & Costa, J. M. (2004). Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Human Reproduction*, 19, 723–724.
- Gall, S. A. (1996). *Multiple pregnancy and delivery*. St. Louis, MO: Mosby.
- Gill, P., Kimpton, C., d'Aloja, E., Andersen, J. F., Bar, W., Brinkmann, B., ... Stenersen M. (1994). Report of the European DNA profiling group (EDNAP) — Towards standardization of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International*, 65, 51–59.
- Golan, A., Amit, A., Baram, A., & David, M. P. (1981). Unusual cord intertwining in monoamniotic twins. *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 22, 165–167.
- Hickey, J., & Goldberg, F. (1996). *Ultrasound review of obstetrics and gynecology* (1st ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hochstenbach, R., Nikkels, P. G., Elferink, M. G., Oudijk, M. A., van Oppen, C., van Zon, P., ... Page-Christiaens, G. C. M. L. (2015). Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast: Proof from a unique case. *Clinical Case Reports*, 3, 489–491.
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5, 739–751.
- Kovacs, B., Shahbahrami, B., Platt, L. D., & Comings, D. E. (1988). Molecular genetic prenatal determination of twin zygosity. *Obstetrics and Gynecology*, 72, 954–956.
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19, 5444.
- Landy, H. J., & Nies, B. M. (1995). The vanishing twin. In L. G. Keith, E. Papiernik, D. M. Keith, & B. Luke (Eds.), *Multiple pregnancy: Epidemiology, gestation and perinatal outcome* (1st ed., pp. 59–71). New York, NY: The Parthenon Publishing Group.
- Lee, A. K., Oh, K. J., Lee, S. M., Kim A, & Jun, J. K. (2010). The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. *Twin Research and Human Genetics*, 13, 609–619.
- Levy, R., Mirlesse, V., Jacquemard, F., & Daffos, F. (2002). Prenatal diagnosis of zygosity by fetal DNA analysis, a contribution to the management of multiple pregnancies: A series of 31 cases. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 17, 339–342.
- Lo, Y. M. (2008). Fetal nucleic acids in maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 140–143.
- Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., ... Wainscoat, J. S. (1998). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*, 339, 1734–1738.
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., ... Hjelm, N. M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics*, 62, 768–775.
- Lun, F. M., Tsui, N. B., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., Charoenkwan, P., ... Lo, Y. M. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 19920–19925.
- Machin, G. A. (1993). Conjoined twins: Implications for blastogenesis. *Birth Defects: Original Article Series*, 29, 141–179.
- McNamara, H. C., Kane, S. C., Craig, J. M., Short, R. V., & Umstad, M. P. (2016). A review of the mechanisms and evidence for typical and atypical twinning. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214, 172–191.
- Monteagudo, A., Timor-Tritsch, I. E., & Sharma, S. (1994). Early and simple determination of chorionic and amniotic type of multifetal gestations in the first fourteen weeks by high-frequency transvaginal ultrasonography. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170, 824–829.
- Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Smerick, J. B., & Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46, 647–660.
- Mujezinovic, F., & Alfirevic, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 110, 687–694.
- Norton, M. E., D'Alton, M. E., & Bianchi, D. W. (1997). Molecular zygosity studies aid in the management of discordant multiple gestations. *Journal of Perinatology*, 17, 202–207.
- Oldoni, F., Castella, V., & Hall, D. (2015). A novel set of DIP-STR markers for improved analysis of challenging DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 156–164.
- Pison, G., & D'Addato, A. V. (2006). Frequency of twin births in developed countries. *Twin Research and Human Genetics*, 9, 250–259.
- Pison, G., Monden, C., & Smits, J. (2015). Twinning rates in developed countries: Trends and explanations. *Population and Development Review*, 41, 629–649.
- Qu, J. Z. Z., Leung, T. Y., Jiang, P., Liao, G. J. W., Cheng, Y. K. Y., Sun, H., ... Lo D. (2013). Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clinical Chemistry*, 59, 427–435.
- Sepulveda, W., Sebire, N. J., Hughes K, Odibo A., & Nicolaides, K. H. (1996). The lambda sign at 10–14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 7, 421–423.
- Simpson, L. L., & Miller, R. S. (2018). Twin-twin transfusion syndrome. In J. A. Copel, M. E. D'Alton, H. Feltovich, E. Gratacós, D. Krakow, A. O. Odibo, L. Platt, & B. Tutschek (Eds.), *Obstetric imaging: Fetal diagnosis and care* (2nd ed., pp. 651–659). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Smid, M., Galbiati, S., Vassallo, A., Gambini, D., Ferrari, A., Restagno, G., ... Cremonesi, L. (2003). Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clinical Chemistry*, 49, 1526–1528.
- Smits, J., & Monden, C. (2011). Twinning across the developing world. *PLoS One*, 6, e25239.
- Tjoa, M. L., Cindrova-Davies, T., Spasic-Boskovic, O., Bianchi, D. W., & Burton, G. J. (2006). Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *American Journal of Pathology*, 169, 400–404.
- Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2004). AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, 37, 226–231.
- Wachtel, S. S., Somkuti, S. G., & Schinfeld, J. S. (2000). Monozygotic twins of opposite sex. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91, 293–295.
- Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., & Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*, 33, 662–666.
- Wimalasundera, R., & Fisk, N. (2002). In-vitro fertilization and risk of multiple pregnancy. *The Lancet*, 360, 414.

- Wright, C. F., & Burton, H.** (2008). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update, 15*, 139–151.
- Yamashita, A., Ishii, K., Hidaka, N., Yonetani, N., Hayashi, S., Takeuchi, M., & Mitsuda, N.** (2015). Monochorionic monozygotic twin pregnancy complicated with twin-twin transfusion syndrome presenting with an obvious lambda sign in the first trimester. *Fetal Diagnosis and Therapy, 37*, 154–156.
- Ying, L., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., & Hahn, S.** (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical Chemistry, 50*, 1002–1011.
- Zheng, J., Xu, Ch., Guo, J., Wei, Y., Ge, H., Li, X., . . . Jiang, H.** (2013). Effective noninvasive zygosity determination by maternal plasma target region sequencing. *PLoS One, 8*, e65050.

# Potential of DNA zygosity tests for non-invasive evaluation of risk of complications in twin pregnancies

Agnieszka Dziennik<sup>1</sup> , Krzysztof Preis<sup>2</sup> ,  
Malgorzata Swiatkowska-Freund<sup>2</sup> , Krzysztof Rebala<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdansk, Poland

<sup>2</sup>Department of Obstetrics, Medical University of Gdansk, Poland

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate and compare the potential of DNA analysis and ultrasound examination for diagnosis of high-risk and low-risk twin pregnancies.

**Material and methods:** Chorionicity of 42 twin pregnancies was determined by routine high-resolution sonographic examination between 10 and 14 weeks of gestation. Zygosity was analysed in umbilical cord blood samples collected immediately after the birth by genotyping of 22 autosomal short tandem repeats used in human identity testing.

**Results:** Routine ultrasound imaging in the first trimester of twin gestations revealed 21 low-risk dichorionic (50%) and 21 high-risk monochorionic pregnancies (50%). DNA typing of umbilical cord blood showed 23 twin pairs with different genotypes (low-risk dizygotic pregnancies, 55%) and 19 twin pairs with identical genotypes (high-risk monozygotic pregnancies, 45%). We found four pregnancies (10%), which were diagnosed sonographically as monochorionic diamniotic, but were identified as dizygotic in postnatal DNA testing. They constituted 19% of all high-risk monochorionic pregnancies detected by ultrasound imaging.

**Conclusions:** Our results indicate high potential of prenatal DNA testing of zygosity in identification of low-risk and high-risk twin gestations requiring different prenatal care, especially in cases when chorionicity and zygosity cannot be reliably determined by ultrasound examination and as a supplementary test able to detect gestations misdiagnosed as monochorionic, resulting from fusions of dizygotic placentas. In such cases, dizygosity detected prenatally eliminates the need for frequent prenatal visits typical for monochorionic pregnancies. If chorionicity cannot be unequivocally determined and a prenatal DNA test detects monozygotic twins, a more pessimistic variant of monochorionic pregnancy should always be assumed.

**Key words:** twin pregnancy; prenatal diagnosis; ultrasonography; DNA testing; zygosity of twin pregnancy; chorionicity of twin pregnancy

Ginekologia Polska 2022; 93, 4: 310–313

## INTRODUCTION

Owing to a high rate of complications, twin pregnancies are regarded as pathological in humans. In Europe, they are related to nine-fold higher risk of preterm birth, twelve-fold higher risk of very preterm birth and seven-fold higher risk of neonatal death in comparison to singletons [1]. Moreover, incidence of twin pregnancies has grown dramatically over the last several decades as a result of the increase of the maternal age at conception and introduction of assisted reproduction techniques [2, 3]. In 2010, the twinning rate in Europe ranged from 1:110 in Romania up to 1:38 in Cyprus [1], which makes a twin pregnancy a very common challenge of contemporary prenatal medicine.

General classification of twin pregnancies is based on the number of zygotes from which the twin foeti develop (dizygotic/DZ or monozygotic/MZ), the number of placental masses (dichorionic/DC or monochorionic/MC) and the number of amniotic sacs (diamniotic/DA or monoamniotic/MA) [4]. DZ pregnancies are almost always DC DA with each foetus having its own placenta and amniotic cavity. On the other hand, chorionicity and amniocity of MZ pregnancies is determined by the time at which division of an embryo occurs [5]. Thus, fertilisation of one ovum by one sperm leading to MZ twin pregnancy may result in DC DA (division within 4 days of conception), MC DA (division between 4 and 8 days after conception) or MC MA gestation (division between 8 and 12 days after conception) [4].

Corresponding author:

Krzysztof Rebala

Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdansk, Poland

e-mail: k.rebala@gumed.edu.pl

Received: 21.04.2021 Accepted: 19.07.2021 Early publication date: 16.09.2021

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

Chorionicity of twin pregnancies is diagnosed routinely by high-resolution ultrasound examination based on the number of placental masses, intertwin membrane thickness and the presence or absence of lambda or T sign between 10 and 14 weeks [6]. It is assumed that knowledge of chorionicity is paramount when managing a twin pregnancy [7] as far as MC pregnancies have 3–5 times higher perinatal morbidity and mortality in comparison to DC pregnancies [8]. However, as far as MC pregnancies develop only in case of MZ twin foeti, a prognostic value for the course of a twin pregnancy may be provided also by a DNA test determining pregnancy zygosity, especially when chorionicity cannot be reliably determined [9]. Mortality of foeti is at least 2.5 times higher in MZ than in DZ twin pregnancies [10, 11], and this is mainly due to complications in MC pregnancies, which constitute roughly two-thirds of MZ twin pregnancies [12]. Recently, several techniques have been developed for non-invasive prenatal twin zygosity testing of cell-free foetal DNA circulating in maternal plasma, based on sequencing of single nucleotide polymorphisms [13–15], sequencing of microhaplotypes [16] and genotyping of multiallelic microsatellites [9].

### Objectives

The aim of our study was to evaluate and compare the potential of DNA analysis and ultrasound examination for diagnosis of high-risk and low-risk twin pregnancies. For the purpose of our study, zygosity of 42 twin pregnancies was determined immediately after the birth and confronted with results of routine ultrasound examination of pregnancy chorionicity in the first trimester of gestation.

### MATERIAL AND METHODS

A total of 42 women with twin pregnancies were involved in the study. They were patients of the Department of Obstetrics at the Medical University of Gdańsk and of the Department of Obstetrics and Gynaecology at the St. Adalbert Hospital in Gdańsk, Copernicus Podmiot Leczniczy Sp. z o.o. The study was approved by the Independent Bioethics Commission for Research at the Medical University of Gdańsk, and all patients provided their informed written consent for participation in the study. Chorionicity was determined by an attending physician dedicated to obstetric ultrasound during routine high-resolution sonographic examination between 10 and 14 weeks of gestation, based on the number of placental masses, the intertwin membrane thickness and the presence or absence of lambda or T sign [6]. Immediately after delivery, about 1.5 mL of umbilical cord blood was collected from each twin (84 samples in total) from the side of a placenta after cutting an umbilical cord. DNA was isolated from the umbilical cord blood samples with the use of a non-enzymatic method [17]. DNA concentration was measured spectrophotometrically with the use of an ND-

1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA). A total of 22 autosomal short tandem repeats (STRs), one Y-chromosomal STR and a gender marker (amelogenin) were amplified with the use of a commercial PowerPlex Fusion kit (Promega, Madison, WI, USA) and a Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a total volume of 5 µL, containing 1 ng of DNA. Amplification products were suspended in Super-DI Formamide (MCLAB, South San Francisco, CA, USA), mixed with WEN ILS 500 size standard (Promega), denatured and analysed by capillary electrophoresis in a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the use of NanoPOP-4 polymer (MCLAB) and a 36-cm 4-capillary array. Genotypes of the analyzed samples were determined with the use of GeneMapper ID software v3.2 (Applied Biosystems) by comparison to an allelic ladder provided with the PowerPlex Fusion kit.

### RESULTS

Routine ultrasound imaging in the first trimester of twin gestations revealed 21 DC DA (50.0%) and 21 MC pregnancies (50.0%). Among 21 MC pregnancies, there were 17 DA pregnancies (81.0%), 2 MA pregnancies (9.5%) and 2 pregnancies with unknown amniocity.

Human identity testing by STR typing of samples of the umbilical cord blood from twins coming from 42 pregnancies showed 23 twin pairs with different genotypes (DZ pregnancies, 54.8%) and 19 twin pairs with identical genotypes (MZ pregnancies, 45.2%; Tab. 1). Among 19 MZ pregnancies, there were 2 DC DA pregnancies (10.5%) and 17 MC pregnancies (89.5%), including 13 MC DA pregnancies (68.4%), 2 MC MA pregnancies (10.5%) and 2 MC pregnancies with unknown amniocity. On the other hand, among 23 DZ pregnancies, 19 pregnancies were diagnosed by ultrasound examination as DC DA (82.6%). Remaining 4 DZ pregnancies were identified by physicians dedicated to obstetric ultrasound as MC DA (17.4%) and constituted 19.0% of all high-risk MC pregnancies detected by ultrasound imaging.

### DISCUSSION

Chorionicity is the main determinant of the perinatal outcome in twin pregnancies as far as perinatal morbidity and mortality are much higher in MC than DC pregnancies. This is mainly due to complications associated with monochorionicity, resulting from development of intertwin vascular anastomoses in the shared placenta and including twin-to-twin transfusion syndrome, twin reversed arterial perfusion sequence and selective intrauterine growth restriction. Therefore, the accurate prenatal diagnosis of chorionicity is of major clinical importance in the management of twin pregnancies as far as it allows provision of increased surveillance in MC pregnancies and detection of complications in their early stages [7]. Ultrasound exami-

**Table 1. Classification of 42 twin pregnancies by zygosity, chorionicity and amniocity, as revealed by postnatal short tandem repeat typing and routine ultrasound examination in the first trimester of gestation**

Zygosity		Chorionicity		Amniocity	
Dizygotic	23 (55%)	Dichorionic	19 (45%)	Diamniotic	19 (45%)
		Monochorionic	4 (10%)	Diamniotic	4 (10%)
Monozygotic	19 (45%)	Dichorionic	2 (5%)	Diamniotic	2 (5%)
		Monochorionic	17 (40%)	Diamniotic	13 (31%)
				Monoamniotic	2 (5%)
				Unknown	2 (5%)

nation performed every two weeks of MC pregnancy is more likely to result in early diagnosis of twin-to-twin transfusion syndrome in comparison to traditional monthly assessment, regarded as sufficient for management of DC pregnancies [4]. Moreover, in order to minimise perinatal deaths, delivery should be considered earlier in MC than DC pregnancies (36 vs 37 weeks of gestation) [18].

However, ascertainment of twin pregnancy chorionicity by ultrasound examination may be problematic when a pregnant woman misses her early gestation scan, when she is obese or when amniotic fluid volume is reduced [19]. Furthermore, there are cases of MC pregnancies with a visualised lambda sign between 10 and 14 weeks of gestation, thus incorrectly diagnosed as low-risk DC pregnancies [20]. Reverse misdiagnoses of DC as MC pregnancies prior to 14 weeks of gestation are also encountered in medical practice [21]. In our study, as much as 10% of pregnancies (4 cases) were misdiagnosed during the early ultrasound scan as high-risk MC gestations, but were found to be DZ by DNA testing, which may be explained as a result of fusion of DZ placentas [22]. These four misdiagnoses were made at two different obstetric units in Gdańsk by different physicians dedicated to obstetric ultrasound and with the use of different equipment, which excludes systematic error of one examiner as explanation of the observed discrepancies. It should be noted that dizygosity detected prenatally eliminates the need for precise ultrasound chorionicity assessment and frequent prenatal visits as far as DZ twins are DC even in case of fused placentas which generally do not form anastomoses resulting in twin-to-twin transfusion syndrome, as observed in MC pregnancies [23]. On the other hand, if chorionicity cannot be unequivocally determined, prenatal diagnosis of MZ pregnancy does not solve the problem of planned care for a pregnant woman. In such cases, a more pessimistic variant of MC pregnancy should always be assumed as far as it is safer to examine a pregnant woman unnecessarily every two weeks than to detect complications too late.

If evaluation of chorionicity is unclear, approximately 50% of DZ pregnancies may be identified as low-risk DC pregnan-

cies by ultrasound examination in the mid-pregnancy, based on opposite sex of twins. Although determination of sex of foeti is possible also in the first trimester, it is characterised by high risk of incorrect assignments [24]. However, a number of cases of postzygotic genome alterations in MC pregnancies, resulting in twin foeti of opposite sex, have been described [25–27]. Two separate placental masses are also indicative of low-risk DC pregnancy, but they are seen only in about one-third of twin pregnancies [4]. On the other hand, in European populations, as much as two-thirds of twin pregnancies are DZ [28, 29]. Thus, a sensitive and specific DNA test determining pregnancy zygosity, carried out alone in the early or middle pregnancy, restricts high-risk twin gestation diagnosis to 33% of twin pregnancies which are MZ. Although sonographic evaluation of chorionicity distinguishes more accurately high-risk and low-risk twin pregnancies, limiting high-risk twin gestation diagnosis to 25% of twin pregnancies which are MC [4], we have identified in our study as much as 10% of cases misdiagnosed sonographically as high-risk MC pregnancies, which could have been managed from the very beginning as low-risk pregnancies if a prenatal DNA test of zygosity had been available and performed.

A certain limitation of our study is the fact that zygosity of twins was evaluated postnatally, whereas currently available DNA tests for prenatal zygosity testing may be characterised by lower sensitivity of correct diagnosis of zygosity and by higher DNA input requirements [9, 13, 14]. However, the aim of our study was not to assess robustness and accuracy of a chosen DNA-based prenatal zygosity testing technique, but to evaluate general potential of DNA zygosity tests for non-invasive evaluation of risk of complications in twin pregnancies. Our results demonstrate that highly sensitive and specific DNA tests for prenatal diagnostics of twin pregnancy zygosity are needed and should be further developed.

## CONCLUSIONS

Our study based on postnatal twin pregnancy zygosity testing, confronted with results of ultrasound examination in the first trimester, indicates a high potential of prenatal DNA

testing of zygosity in identification of low-risk and high-risk twin gestations requiring different prenatal care in clinical practice, especially in cases when chorionicity and zygosity cannot be reliably determined by ultrasound examination and as a supplementary test able to detect gestations misdiagnosed as MC, resulting from fusions of DZ placentas. In such cases, dizygosity detected prenatally eliminates the need for frequent prenatal visits typical for MC pregnancies. If chorionicity cannot be unequivocally determined and a prenatal DNA test detects MZ twins, a more pessimistic variant of MC pregnancy should always be assumed.

### Funding

Financed by the statutory activity subsidy for the Medical University of Gdansk.

### Conflict of interest

No potential conflicts of interest were reported by the authors.

### REFERENCES

- Heino A, Gissler M, Hindori-Mohangoo AD, et al. Euro-Peristat Scientific Committee. Variations in Multiple Birth Rates and Impact on Perinatal Outcomes in Europe. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0149252, doi: [10.1371/journal.pone.0149252](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149252), indexed in Pubmed: [26930069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26930069/).
- Pison G, D'Addato AV. Frequency of twin births in developed countries. *Twin Res Hum Genet*. 2006; 9(2): 250–259, doi: [10.1375/183242706776382338](https://doi.org/10.1375/183242706776382338), indexed in Pubmed: [16611495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611495/).
- Pison G, Monden C, Smits J. Twinning Rates in Developed Countries: Trends and Explanations. *Population and Development Review*. 2015; 41(4): 629–649, doi: [10.1111/j.1728-4457.2015.00088.x](https://doi.org/10.1111/j.1728-4457.2015.00088.x).
- Moise KJ, Argoti PS. Society for Maternal-Fetal Medicine. The importance of determining chorionicity in twin gestations. *Contemp Ob Gyn*. 2013; 58: 35–43.
- Fuchs K, D'Alton M. Dichorionic Diamniotic Twin Gestations. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*. 2018; 648–650.e1, doi: [10.1016/b978-0-323-44548-1.00161-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44548-1.00161-3).
- Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, et al. The lambda sign at 10–14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1996; 7(6): 421–423, doi: [10.1046/j.1469-0705.1996.07060421.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1996.07060421.x), indexed in Pubmed: [8807758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8807758/).
- D'Addario V, Rossi C. Diagnosis of chorionicity: The role of ultrasound. *Diagnóstico Prenatal*. 2014; 25(2): 58–64, doi: [10.1016/j.diapre.2013.09.004](https://doi.org/10.1016/j.diapre.2013.09.004).
- Bajoria R, Kingdom J. The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy. *Prenat Diagn*. 1997; 17(13): 1207–1225, indexed in Pubmed: [9509540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9509540/).
- Dziennik A, Preis K, Świątkowska-Freund M, et al. Genotyping of STR and DIP-STR Markers in Plasma Cell-Free DNA for Simple and Rapid Noninvasive Prenatal Diagnosis of Zygosity of Twin Pregnancies. *Twin Res Hum Genet*. 2019; 22(5): 321–329, doi: [10.1017/thg.2019.89](https://doi.org/10.1017/thg.2019.89), indexed in Pubmed: [31619303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31619303/).
- Monteagudo A, Timor-Tritsch I, Sharma S. Early and simple determination of chorionic and amniotic type in multifetal gestations in the first fourteen weeks by high-frequency transvaginal ultrasonography. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994; 170(3): 824–829, doi: [10.1016/s0002-9378\(94\)70291-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(94)70291-8).
- Landy HJ, Nies BM. The vanishing twin. In: Keith LG, Papiernik E, Keith DM, ed. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation and Perinatal Outcome*, 1st ed. The Parthenon Publishing Group, New York 1995: 59–71.
- Simpson L, Miller R. Twin-Twin Transfusion Syndrome. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*. 2018; 651–659.e2, doi: [10.1016/b978-0-323-44548-1.00162-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44548-1.00162-5).
- Qu JZ, Leung TY, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clin Chem*. 2013; 59(2): 427–435, doi: [10.1373/clinchem.2012.194068](https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194068), indexed in Pubmed: [23115054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23115054/).
- Zheng J, Xu C, Guo J, et al. Effective noninvasive zygosity determination by maternal plasma target region sequencing. *PLoS One*. 2013; 8(6): e65050, doi: [10.1371/journal.pone.0065050](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065050), indexed in Pubmed: [23762285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23762285/).
- Norwitz ER, McNeill G, Kalyan A, et al. Validation of a Single-Nucleotide Polymorphism-Based Non-Invasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Zygosity, Individual Fetal Sex, and Fetal Aneuploidy. *J Clin Med*. 2019; 8(7), doi: [10.3390/jcm8070937](https://doi.org/10.3390/jcm8070937), indexed in Pubmed: [31261782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31261782/).
- Bai Z, Zhao Hu, Lin S, et al. Evaluation of a Microhaplotype-Based Noninvasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Paternity, Zygosity, and Fetal Fraction. *Genes (Basel)*. 2020; 12(1), doi: [10.3390/genes12010026](https://doi.org/10.3390/genes12010026), indexed in Pubmed: [33375453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375453/).
- Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(19): 5444, doi: [10.1093/nar/19.19.5444](https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444), indexed in Pubmed: [1681511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1681511/).
- Cheong-See F, Schuit E, Arroyo-Manzano D, et al. Global Obstetrics Network (GONet) Collaboration. Prospective risk of stillbirth and neonatal complications in twin pregnancies: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016; 354: i4353, doi: [10.1136/bmj.i4353](https://doi.org/10.1136/bmj.i4353), indexed in Pubmed: [27599496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27599496/).
- Lee KA, Oh KJ, Lee SMi, et al. The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. *Twin Res Hum Genet*. 2010; 13(6): 609–619, doi: [10.1375/twin.13.6.609](https://doi.org/10.1375/twin.13.6.609), indexed in Pubmed: [21142938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21142938/).
- Yamashita A, Ishii K, Hidaka N, et al. Monochorionic monozygotic twin pregnancy complicated with twin-twin transfusion syndrome presenting with an obvious lambda sign in the first trimester. *Fetal Diagn Ther*. 2015; 37(2): 154–156, doi: [10.1159/000367969](https://doi.org/10.1159/000367969), indexed in Pubmed: [25633149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25633149/).
- Stenhouse E, Hardwick C, Maharaj S, et al. Chorionicity determination in twin pregnancies: how accurate are we? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002; 19(4): 350–352, doi: [10.1046/j.1469-0705.2002.00679.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2002.00679.x), indexed in Pubmed: [11952963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952963/).
- Calomfirescu-Avramescu A, Demetrian M, Grecu G, et al. Placental fusion in a dichorionic-diamniotic IVF twin pregnancy – case presentation. *Romanian Journal of Medical Practice*. 2020; 15(1): 97–100, doi: [10.37897/rjmp.2020.1.18](https://doi.org/10.37897/rjmp.2020.1.18).
- Benirschke K. The biology of the twinning process: how placenta influences outcome. *Semin Perinatol*. 1995; 19(5): 342–350, doi: [10.1016/s0146-0005\(05\)80012-6](https://doi.org/10.1016/s0146-0005(05)80012-6), indexed in Pubmed: [8821022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8821022/).
- Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaidis KH. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999; 13(5): 305–307, doi: [10.1046/j.1469-0705.1999.13050305.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1999.13050305.x), indexed in Pubmed: [10380292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10380292/).
- Wachtel SS, Somkuti SG, Schinfeld JS. Monozygotic twins of opposite sex. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 91(1–4): 293–295, doi: [10.1159/000056859](https://doi.org/10.1159/000056859), indexed in Pubmed: [11173871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11173871/).
- Zech NH, Wisser J, Natalucci G, et al. Monochorionic-diamniotic twins discordant in gender from a naturally conceived pregnancy through postzygotic sex chromosome loss in a 47,XXY zygote. *Prenat Diagn*. 2008; 28(8): 759–763, doi: [10.1002/pd.2031](https://doi.org/10.1002/pd.2031), indexed in Pubmed: [18567067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18567067/).
- Bohec C, Douet-Guilbert N, Basinko A, et al. Difficult diagnosis and management of a heterokaryotypic monochorionic twin pregnancy with discordant fetal sex and 45,X/47,XXY karyotypes. *Fetal Pediatr Pathol*. 2010; 29(6): 424–430, doi: [10.3109/15513815.2010.505630](https://doi.org/10.3109/15513815.2010.505630), indexed in Pubmed: [21043568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21043568/).
- Machin GA. Conjoined twins: implications for blastogenesis. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1993; 29(1): 141–179, indexed in Pubmed: [8280870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8280870/).
- Blickstein I, Verhoeven H, Keith L. Zygotic Splitting after Assisted Reproduction. *N Engl J Med*. 1999; 340(9): 738–739, doi: [10.1056/nejm199903043400916](https://doi.org/10.1056/nejm199903043400916).