

Fetal Anöplöidi Açısından Yüksek Riskli Gebeliklerin QF-PCR İle Analizi

Analysis of Fetal Aneuploidy in High Risk Patients with QF-PCR

Ayşe Nur Çakır Güngör¹, Servet Hacıvelioğlu¹, Ahmet Uludağ², Meryem Gencer¹, Ahmet Uysal¹, Sinem Atik², Emine Coşar¹, Fatma Sılan², Öztürk Özdemir²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Çanakkale.

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıbbi Genetik AD., Çanakkale.

Özet

Kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyon (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction, QF-PCR) yöntemi yaygın kromozom anormalliklerine yönelik yapılan düşük maliyetli, hızlı ve otomasyon sağlayan avantajlı bir prenatal tanı yöntemidir. Hastanemizde prenatal anöplöidi taramasında aktif olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda 2011 Haziran- 2012 Temmuz ayları arasında ileri anne yaşı, ikili, üçlü yada dörtlü taramada riskli sonuç çıkan hastalar veya ailenin anksiyetesi nedeniyle başvuran hastalardan amniyosentez yapılanların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Değerlendirilen 98 hastanın ortalama yaşı 32.98'di. Hastaların 94'ünün (%95,9) amniyosentez sonucu normal, 3'ünün (%3,1) sonucu Trisomi 21 olarak değerlendirildi. Uninformatif sonuç 1 hastada görüldü. Kliniğimizde uygun hastalarda QF-PCR ile etkin olarak amniyosentez mayiinden 13,18, 21, X ve Y kromozomları taranmaktadır.

Anahtar kelimeler: Amniyosentez, fetal anomali, kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu.

Abstract

Quantitative fluorescent chain reaction (QF-PCR) is a cheap, rapid and automatized prenatal diagnosis method that is used for prevalent chromosomal abnormalities. We use prenatal aneuploidy screening in an active manner in our hospital. In the study we evaluate retrospectively the amniocentesis results of women that applied to our hospital for advanced maternal age, positive resulted prenatal aneuploidy screening tests or maternal anxiety between June 2011 and July 2012. Mean age of the evaluated 98 patient was 32.98. Ninetyfour (95.9%) of them had normal results and 3 (3.1%) of them had trisomy 21. One patient had uninformative result. We use QF-PCR effectively in selected patients for evaluating amniocentesis material for chromosomes 13, 18, 21, X and Y.

Key words: Amniocentesis, fetal anomaly, quantitative fluorescent polymerase chain reaction

Giriş

Canlı yenidoğanlarda 21, 18, 13, X ve Y kromozomlarını içeren anöplöidler bütün kromozom anormalliklerinin % 95 'ini kapsamaktadır. Bu anormalliklerin prenatal teşhisi, genellikle amniyon, koriyon veya fetal kan hücrelerinin kültüre edilmesiyle yapılan konvansiyonel sitogenetik analizlere dayanmaktadır. Bu yöntem oldukça uzun zaman alan ve teknik olarak deneyim gerektiren bir yöntemdir.

Son yıllarda, QF-PCR ve oldukça polimorfik olan küçük ardıl tekrar (Short Tandem Repeat, STR) analizleriyle sık görülen anöplöidilerin hızlı bir şekilde teşhisi veya ekarte edilmeleri mümkün olmuştur [1-3]. Biz de hastanemizde çeşitli neden-

lerle hastanemizde yapılan amniyosentezlerin QF-PCR sonuçlarını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Bu retrospektif çalışmaya, Haziran 2011-Temmuz 2012 tarihleri arasında hastanemizde prenatal tanı önerilen ve amniyosentez işlemi yapılan 98 hasta dahil edildi. Prenatal test öncesi bütün hastalara genetik danışmanlık verildi ve testin doğruluk oranı, sınırlamaları ve faydaları anlatıldı. İnvazif prenatal tanı için bütün hastalardan işlemi kabul ettiğine dair imza alındı. Analiz için amniyosentez işlemi esnasında yaklaşık 1-2 mL amniyon sıvısı aspire edildi. 0.5-1.5 mL örnekten total DNA izolasyonları yapıldı (InstaGene™ Matrix kit Bio-Rad

Sorumlu yazar / Corresponding Author: Ayşe Nur Çakır Güngör

Adres: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD., Çanakkale.

E-posta: dr_aysecakir@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 22.10.2012

Kabul Tarihi / Accepted: 02.02.2013

ABI310 USA) ve elde edilen DNA ürünleri kromozomlara özgü fluoresan işaretli primerler kullanılarak PCR yöntemiyle amplifiye edildi. PCR koşulları (28 döngü için); 95 °C'de 15 dk, 95 °C'de 40 sn, 60 °C'de 90 sn, 72 °C'de 40 sn, 60 °C'de 30 dk olarak düzenlendi. Denatürasyondan sonra (96 °C'de 2 dk) 1 µL PCR ürünleri alınıp daha önce 40 µL formamid (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, UK) ve 1 µL -500 liz size standart tamponuna (GeneScan™ -500 LIZ™ Size Standart, Applied Biosystems, UK) eklendi. Sonuç için gen haritalama programı kullanılarak fragman analizi yapıldı (Gene Mapper Software, versiyon 4.0, ABI 310, USA).

Tablo 1 ve 2 'de hedef kromozom genotiplendirilmesinde kullanılan STR markerları ve kromozom lokalizasyonları gösterilmektedir. İleri anne yaşı (≥35) veya anormal prenatal tarama testi sonuçları riski gösteren ya da maternal anksiyetesi olan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamızda her bir kromozom için 5 STR bölgesi kullanıldı ve en az 2 STR bölgesinin

anlamli(informatif) pikler vermesi durumunda sonuç verildi. İlk çalışmada 2 anlamli STR sonucu olmayan hastalarda ilgili kromozom için ek STR paneli ile çalışma yapıldı. STR dağılımları trizomi ve normal kromozomlarda farklılık gösterdiğinden, benzer fluoresan intensite (1:1) ve açık bir şekilde disomik diallelik dağılımlar gösteren kromozomlar normal kabul edildi. Buna karşın, benzer fluoresan intensite gösteren (1:1:1) triallelik sinyal veya iki kat fazla doz cevabı (2:1) gösteren diallelik dağılımlar trizomi olarak değerlendirildi.

Sonuçlar

Çalışmamızda 98 adet amniyon sıvısı örneği QF-PCR ile değerlendirildi. Değerlendirilen 98 hastanın ortalama yaşı 32,98±6.03'di. Hastaların %16,9'una ileri anne taşı, %22,5'ine ikili tarama testindeki riskli sonuç nedeniyle, %49,4'üne üçlü tarama testindeki riskli sonuç nedeniyle, %10.1'ine dördü tarama testindeki riskli sonuç nedeniyle, %1.1'ine ise maternal anksiyete nedeniyle amniyosentez yapıldı. Hastaların 94'ünün (%95,9) amniyosentez sonucu normal (Şekil 1) olarak değerlendirildi. 3'ünün (%3,1) so-

Tablo 1. Çalışmada hedef kromozom (13, 18, 21, X ve Y) genotiplendirmesinde rutin kullanılan STR markerları ve kromozom lokalizasyonları

Kromozom no	Marker	Lokalizasyon
13	D13S742	13q12.12
	D13S628	13q31-q32
	D13S631	13q31-32
	D13S634	13q14.3
	D13S742	13q12.12
18	D18S386	18q22.1
	D18S391	18qpter-18p11.22
	D18S858	18q21.1
	D18S499	18q21.32
	D18S1002	18q11.2
	D18S386	18q22.1
21	D21S1411	18qpter-18p11.22
	D21S1435	21q22.3
	D21S1437	21q21
	D21S1412	21q21.1
	D21S1809	21q22.2
X ve Y	AMXY	21q22.1
	SRY	Xp22.1-22.31-Yp11.2
	HPRT	Yp11.2
	TAF9L	Xq26.1
	DXYS156	Xq13 3p24
	SBMA	Xq21.31 Yp11.31
	DXS6803	Xq11.2- Xq12
	DXS6809	Xq12-Xq21.33
DXS8377	Xq	
		Xq28

nucu Trisomi 21 olarak geldi (Şekil 2). 1 hastanın sonucu ise uninformatif olarak değerlendirildi (Şekil 3). Trisomi 21 sonucu veren hastaların demografik özellikleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tartışma

Hastanemizde ultrasonografik bulgusu olmayan ve çeşitli nedenlerle amniyosentez yapılan hastalarda etkili olarak QF-PCR yöntemiyle kromozomal anomalilerin taraması yapılmaktadır. Bu yöntemin 24 saat içinde sonuç vermesi prenatal dönemde özellikle önem kazanmaktadır çünkü bu dönemde konvansiyonel sitogenetik değerlendirmenin sonucu için

hastanın haftalarca beklemesi ailenin endişesini ve stresini artırmaktadır. Yine sonucun erken çıkması ile anormal sonuçlu fetüslerde eğer gebelik sonlanacaksa gebeliğin sonlandırılması daha erken gebelik haftalarında olabilmektedir.

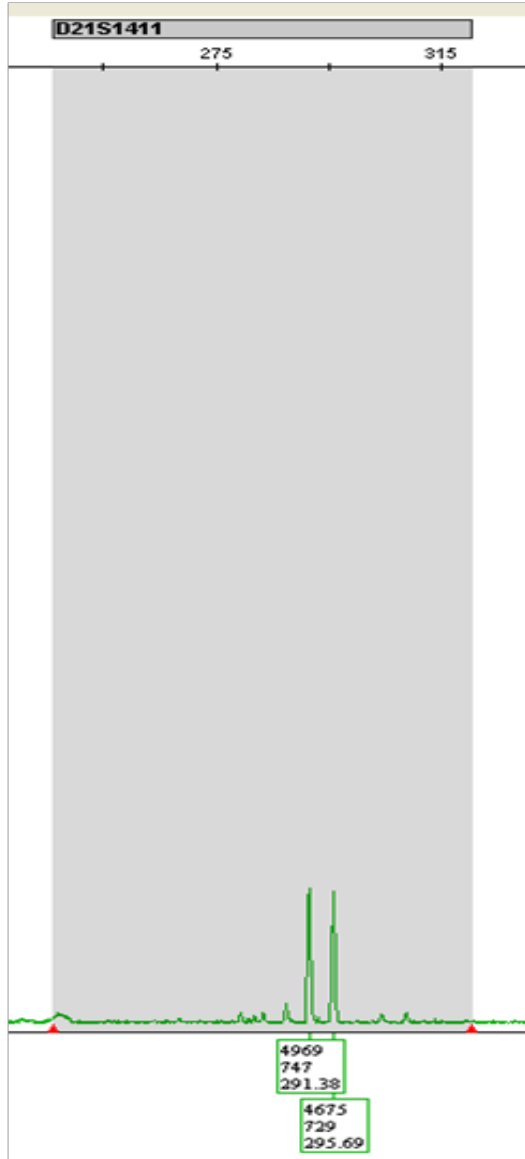
43.000 prenatal tanı işlemi yapılan hastalarda yapılan bir çalışmada (1 nolu çalışma), QF-PCR yönteminin 21, 18, 13, X ve Y kromozomlarındaki anöplöidileri belirlemedeki spesifitesinin %100 olduğu ve karyotipi normal olan fetüslerine %99,6'sında QF-PCR sonucu normal bulunmuş. Aynı çalışmada, anormal QF-PCR sonucu saptanan gebeliklerin

Tablo 2. Çalışmada şüpheli olgularda ve kromozom anomalisi varlığında kullanılan STR markerları ve kromozom lokalizasyonları

Kromozom no	Marker	Lokalizasyon
13	D13S742	13q12.12
	D13S628	13q31-q32
	D13S631	13q31-32
	D13S634	13q14.3
18	D18S386	18q22.1
	D18S391	18qpter-18p11.22
	D18S858	18q21.1
	D18S499	18q21.32
21	D18S1002	18q11.2
	D21S1411	21q22.3
	D21S1435	21q21
	D21S1437	21q21.1
	D21S1412	21q22.2
X ve Y	D21S1809	21q22.1
	AMXY	Xp22.1-22.31-Yp11.2
	SRY	Yp11.2
	HPRT	Xq26.1
	TAF9L	Xq13 3p24
	DXYS156	Xq21.31 Yp11.31
	SBMA	Xq11.2- Xq12
	DXS6803	Xq12-Xq21.33
	DXS6809	Xq
	DXS8377	Xq28
DXS6803	Xq12-Xq21.33	
DXS6809	Xq	
DXS8377	Xq28	

Tablo 3. Tespit edilen Trisomi 21 vakalarının özellikleri

	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3
Anne yaşı	37	20	45
Amniyosentez endikasyonu	İkili test	Üçlü test	İkili test
Amniyosentez zamanı	19 4/7	18+2/7 hafta	17+1/7 hafta
Tahliye zamanı	21 hafta	19+2/7 hafta	18 hafta
Amniyosentez sonucu için geçen süre	10 gün	7 gün	6 gün

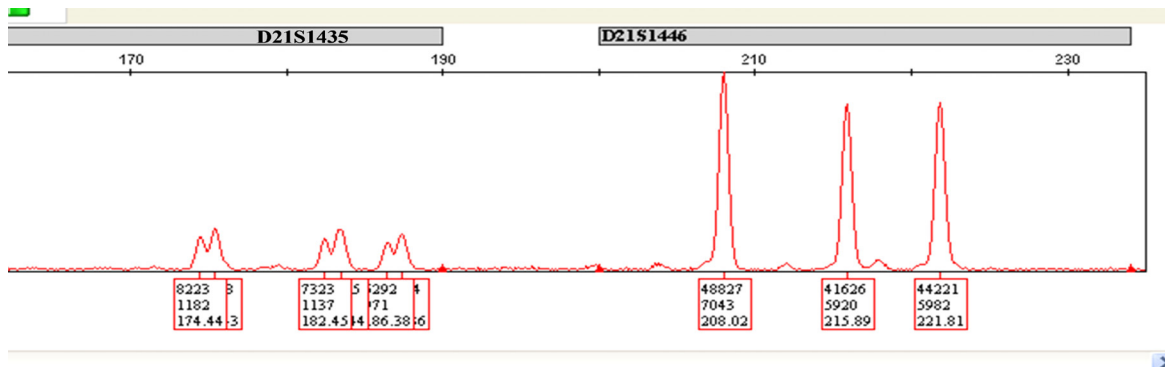


Şekil 1. Amniyosentez sonrası normal bir fetüse ait QF-PCR profilleri. D21S1435 ve D21S1446 problemlerine ait normal kısa tandem tekrarlı (STR) profilleri izlenmektedir.

hemen sonlandırılabilir ve normal sonuçlu hastalarda sadece anormal ultrason bulguları olanlarda sitogenetik analiz yapılması gerektiğini belirtilmiş ve sonuç olarak konvensiyonel sitogenetik analiz için olanak bulunmayan merkezlerde QF-PCR yönteminin tek başına kullanılabilirliği belirtilmiştir [4]. Crigliano ve ark 18000 vakalık çalışmasında QF-PCR'in ucuz, hızlı ve otomasyona izin veren bir teknik olduğu ve QF-PCR'in prenatal tanı testi olarak kullanılabilirliği sonucuna varmışlardır [2].

2007'de Onay ve ark 576 amniyotik mayinin değerlendirildiği çalışmada 19 anomalinin QF-PCR tarafından yakalandığını 2 yapısal kromozomal anomalinin ise saptanamadığını, 17 örnek çok kanlı olduğu için 1 örnek de enfekte olduğu için değerlendirilemediğini rapor etmişler ve QF-PCR'in hızlı anöploidi taramasında kullanılabilirliği sonucuna varmışlardır [5]. Nicolini ve ark 2004'te yazdıkları bir derlemede QF-PCR'in anöploidi taramasında değerli, ucuz ve neredeyse tamamen otomasyonla yapılan bir yöntem olduğunu ve yöntemin anöploidiyi yakalama oranının %98.6 (%95 güvenlik aralığında 97.8-99.3) söylemişlerdir [3]. 400 amniyon mayinin değerlendirildiği bir çalışmada qf-pcr yöntemiyle hastaların 4 (%1)'ünde sonuç elde edilemediğini QF-PCR'in hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir [6].

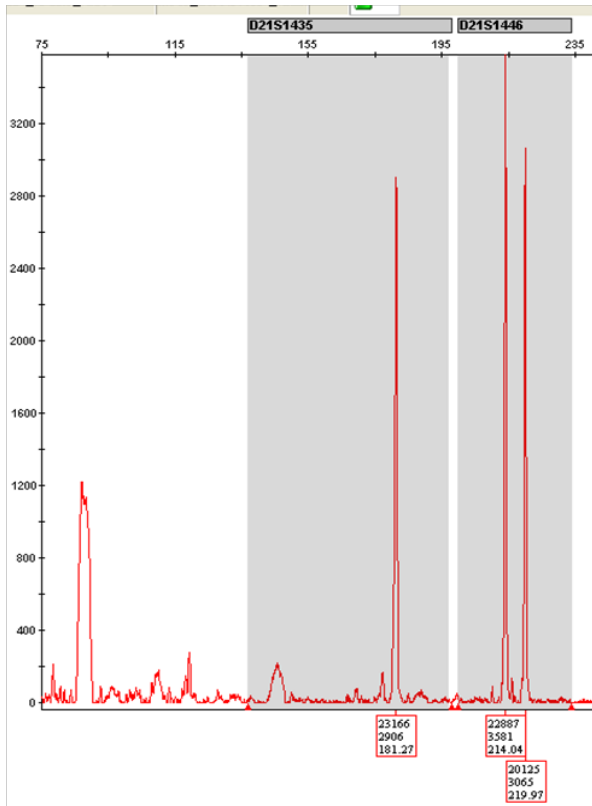
2011'de yayınlanan bir makalede 300 vaka değerlendirilmiş ve QF-PCR'in güvenilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [7]. Pertl ve ark da çalışmalarında QF-PCR'in hızlı ve güvenilir olduğuna vurgu yapmışlardır [8,9]. Öte yandan literatürde QF-PCR'in tek başına yeterli olmadığını savunan yazılar da mevcuttur. 2009'da yayınlanan ve 40 vakanın değerlendirildiği bir çalışmada artmış trisomi 21 riski nedeniyle hastalara QF-PCR yapılmış ve QF-PCR'in sensitivitesinin %50, spesifitesinin %83.7, PPD'nin %14.3 ve NPD'nin %96.9 olduğu görülmüş ve kültürün altın standart olduğu vurgulanmıştır [10]. 2005'te yayınlanan çok merkezli büyük bir çalışmada yazarlar en iyi protokolün PCR+karyotipleme veya FISH+karyotipleme şeklinde olduğu sonucuna varmışlardır [11]. İleri anne yaşı nedeniyle 19517 hastanın değerlendirildiği retrospektif bir çalışma-



Şekil 2. Amniyosentez sonrası Trizomi 21 (Down sendromu) tanısı alan bir fetüse ait QF-PCR profilleri. D21S1435 ve D21S1446 problemlerine ait trizomik kısa tandem tekrarlı (STR) profilleri izlenmektedir.

da kültürle tespit edilen 333 anormal vakadan klinik önemi olan 63 (%18.9) tanesi QF-PCR'la tespit edilememiştir. Yazarlar ileri anne yaşı nedeniyle yapılacak olan amniyosentezlerde seçimin aileye bırakılması gerektiği sonucuna varmışlardır [12].

QF PCR ile analizi yapılan 13,18 ve 21. kromozomların trizomileri canlı doğanlarda saptanabilen ve yaşarla bağdaşabilen ancak kesin olarak mental retardasyonun ve sıklıkla kardiyolojik, GIS, nörolojik anomalilerin eşlik ettiği hastalıklardır. Karyotipleme hem daha uzun zaman alan ve daha fazla yetişmiş insan gücüne ihtiyaç duyulan bir yöntemdir, hem de kültürde yeterli üreme olmaması durumunda sonuç alamama riski %1 civarındadır. QF PCR yöntemi ile sık görülen, yaşarla bağdaşan, zeka geriliği ve multipl konjenital anomali riski bulunan kromozomal anöplöidlere hızlı ve güvenilir şekilde tanı konması mümkün olmaktadır. Özellikle ileri anne yaşı ve 2'li 3'lü, 4'lü tarama testlerinde artmış risk endikasyonu olan gebeliklerde, amniyosentez öncesi testlerin avantaj ve dezavantajlarını açıklayan genetik danışma verilerek güvenilir bir şekilde uygulanabilecek kesin tanı yöntemidir. Ultrasonda anomali saptanması nedeniyle yapılacak amniyosentezlerde ise, QF PCR'ın 13,18,21,X ve Y kromozomlarının anöplöidileri ve triploidi ile sınırlı bir tanı testi olduğu göz önünde bulundurularak ek olarak karyotip analizi yapılması tercih edilmelidir.



Şekil 3. Amniyosentez sonrası uninformatif olarak değerlendirilen fetüse ait QF-PCR profili. D21S1435 ve D21S1446 problemlerine ait uninformatif kısa tandem tekrarlı (STR) profilleri izlenmektedir.

Kaynaklar

1. Rahil H, Solassol J, Philippe C, Lefort G, Jonveaux P. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet* 2002;10(8):462-466.
2. Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod* 2004;10(11):839-846.
3. Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update* 2004;10(6):541-548.
4. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, Rueda L, Lloveras E, Fuster C, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn* 2009;29(1):40-49.
5. Onay H, Ugurlu T, Aykut A, Pehlivan S, Inal M, Tinar S, Ozkinay C, Ozkinay F. Rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in amniotic fluid using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66(2):104-110.
6. Rahil H, Solassol J, Philippe C, Lefort G, Jonveaux P. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet* 2002;10(8):462-466.
7. Çitli Ş, Köksal B, Küçük Kurtulgan H, Akkuş N, Özdemir Ö, Sezgin İ. Prenatal dönemde multiplex kantitatif floresan PCR (QF-PCR) tekniği ile yaygın kromozomal anöplöidilerin tespiti: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi deneyimi Cumhuriyet Tıp Dergisi 2011;33:389-395.
8. Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Häusler M, Sherlock J, Winter R, Adinolfi M. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):899-906.
9. Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Häusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 1999;5(12):1176-1179.
10. Aydoğmuş S, Keskin HL, Baykal Gökçe S, Avşar AF, Çelen E. Prenatal anöplöidi saptanmasında kantitatif floresan-polimeraz zincir reaksiyonu(QF-PCR) yönteminin etkinliği. *Turk J Med Sci* 2009;39(5):741-716.
11. Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA; UK Association of Clinical Cytogeneticists (ACC). Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet*. 2005 Jul 9-15;366(9480):123-128.
12. Leung WC, Lau ET, Lau WL, Tang R, Wong SF, Lau TK, Tse KT, Wong SF, To WK, Ng LK, Lao TT, Tang MH; Working Group on Prenatal Diagnosis and Counselling, Hospital Authority. Rapid aneuploidy testing (knowing less) versus traditional karyotyping (knowing more) for advanced maternal age: what would be missed, who should decide? *Hong Kong Med J* 2008;14(1):6-13.