

# PRENATAL TARAMA TESTLERİ VE HÜCRE DEN BAĞIMSIZ FETAL DNA

## PRENATAL SCREENING TESTS AND CELL FREE FETAL DNA

Fevziye Burcu ŞİRİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Çünür, Isparta, Türkiye

**Cite this article as:** Şirin FB. Prenatal Screening Tests and Cell Free Fetal DNA. Med J SDU 2020; 27(2): 254-260.

### Öz

Kromozomal anomaliler tüm gebeliklerin % 0,4'ünü etkilemektedir. Bunun % 50'sini Trizomi 21 oluştururken, % 15'ini Trizomi 18, % 5'ini Trizomi 13 oluşturmaktadır. Prenatal tarama testlerinin temel kullanım amacı gebeliğin erken haftalarında kromozomal anöplöidi açısından yüksek risk taşıyan gebelerin tesbit edilmesi ve her gebenin mevcut riskleri ve tercihleri göz önünde bulundurularak bilgilendirilmesidir. Son yıllarda prenatal tarama testleri geleneksel prenatal tarama testleri ve hücreden bağımsız fetal DNA (cffDNA, fetal DNA, NIPT) testi olarak ikiye ayrılmaktadır. Maternal kandan biyobelirteçlerin ölçülüp ultrasonografik bulgularla kombine edildiği geleneksel prenatal tarama testleri halen birinci tercih olarak önerilmektedir. cffDNA ile gebeliğin 10. haftasından itibaren maternal kanda yeni nesil sekanslama teknikleri kullanılarak fetal DNA fragmanları analiz edilmektedir. cffDNA testinin hangi popülasyona önerileceği, klinik kullanımda faydası, maliyet etkinliği, limitasyonları ve avantajları güncel olarak tartışılan konulardır.

**Anahtar Kelimeler:** Prenatal tarama testleri, fetal DNA, cffDNA

### Abstract

Chromosomal abnormalities effect 0.4 % of pregnancies. 50 % of these abnormalities are Trisomy 21, 15% Trisomy 18, 5% Trisomy 13 respectively. The

major purpose of using prenatal screening tests is; to determine the pregnant women at high risk for chromosomal aneuploidy at early gestational weeks and to give information about the risks associated with each pregnant woman. In recent years, prenatal screening tests are divided into two as traditional prenatal screening tests and cell free fetal DNA (cffDNA, fetal DNA, NIPT). The traditional prenatal screening tests which use certain maternal serum biomarkers that is combined with ultrasonographic findings are used as first line screening test. From the beginning of 10th week of pregnancy, fetal DNA fragments in maternal blood are analyzed using new generation sequencing techniques. In which population fetal DNA would be recommended, its usefulness in clinical use, and its cost effectivity, limitations and advantages are still controversial.

**Keywords:** Prenatal screening test, fetal DNA, cffDNA

### Giriş

Tarama testleri sağlıklı görünen toplumda belirli bir hastalık için riske sahip bireyleri belirlemek amacıyla yapılır. Tarama testi sonucunun pozitif olması durumunda bireyin yönlendirilebileceği bir tanı testi olmalı ve hastalığı erken tesbit etmenin kişiye faydası olmalıdır. Bir tarama testinin ucuz ve kolay uygulanabilir olması geniş kitleleri tarama imkanı sağlar (1,2). Gebelik döneminde de aynı ilkeler doğrultusunda prenatal tarama testleri sıklıkla kullanılmaktadır

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** fbsirin@gmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 16.08.2019 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 25.10.2019

Available online at <http://dergipark.gov.tr/sdutfd>

Makaleye <http://dergipark.gov.tr/sdutfd> web sayfasından ulaşılabilir.

Kromozomal anomaliler tüm gebeliklerin % 0,4'ünü etkilemektedir. Bunun % 50'sini Trizomi 21 (Down sendromu) oluştururken, % 15'ini Trizomi 18 (Edward's sendromu), % 5'ini Trizomi 13 (Patau sendromu) oluşturmaktadır (3). Down sendromu toplumda en sık görülen kromozomal anomali olup (1:500 gebelikte, 1:740 canlı doğumda) en önemli mental retardasyon nedenidir. Diğer trizomilere göre canlı doğum ihtimali (Trizomi 18; 1:2000 gebelikte-1:6600 canlı doğumda, Trizomi 13; 1:5000 gebelikte-1:12000 canlı doğumda) ve yaşam beklentisi yüksek olması nedeniyle Down sendromu prenatal tarama testlerinin odağındadır (4,5). Trizomi dışında seks kromozom anomali, anöplöidi olmayan (poliploidi, delesyon, duplikasyon vb) kromozom anomalileri de görülebilmektedir (6).

Maternal yaş artışı ile (özellikle 35 yaş sonrası) trizomi 21 riskinin arttığı bilinmektedir. Yaklaşık otuz yıl öncesine kadar 35 yaş ve üzerindeki gebelik prevalansı yaklaşık % 5 iken, günümüzde % 15'in üzerindedir (7). Amerikan Jinekoloji ve Obstetrik Derneği (The American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) ve Maternal-Fetal Tıp Derneği (The Society for Maternal-Fetal Medicine, SMFM)'nin 2015 yılında ortak yayınladığı 640 sayılı Komite Görüşü'nde 'Maternal yaşa bakılmaksızın tüm gebelere tarama testi ve tanılabilir test seçenekleri (test yapmama seçeneği de dahil olmak üzere) sunulmalı, kısıtlılıkları ve faydaları anlatılmalı' olarak vurgulanmıştır (8). Prenatal tarama testlerinin kullanma amacı; erken gebelik haftalarında kromozomal anöplöidi açısından yüksek risk taşıyan gebelerin tesbit edilmesidir. Her gebeye kendine ait riskleriyle birlikte kişisel tercihleri göz önünde bulundurularak bilgi verilmesi gebenin gebelik sürecindeki yol haritasının erken dönemde belirlenmesini sağlar.

### Prenatal Tarama Testlerinin Gelişim Süreci

Prenatal tarama testlerinin kullanımı 1970'lerde maternal kanda alfa fetoprotein (AFP) düzeyinin yüksekliğinin nöral tüp defekti ile ilişkilendirilmesiyle başlamıştır (9). Maternal serumda düşük AFP (9) yüksek insan koryonik gonadotropin (hCG) (10) ve düşük ankonjuge östriol (uE3) (11) düzeyleri Down sendromu ile ilişkilendirilmiştir ve 1980'lerde ikinci trimester testi olan üçlü test kullanıma girmiştir (12). 1990'larda ise maternal serumda ölçülen gebelikle ilişkili plazma protein A (pregnancy-associated plasma protein A/PAPP-A) ve serbest beta hCG düzeyleri ile birlikte ultrasonografik bir belirteç olan fetal ense kalınlığının (NT) Down Sendromu ile ilişkilendirilmesi birinci trimester kombine testin kullanıma girmesini sağlamıştır (13). Üçlü test parametrelerine maternal serum dimerik inhibin A düzeyi de eklenerek dördümlü test (14) tanımlanmıştır. Diğer yandan 1997 yılında maternal plazmada fetal DNA varlığı saptanmış (15) ve sonrasında 2011 yılın-

dan itibaren fetal DNA testi (NIPT: non invazif prenatal tarama) klinik kullanıma geçmiştir (16, 17).

### Günümüzde Prenatal Tarama Test Seçenekleri

Son dönemde çıkan yayınlarda birinci ve ikinci trimester testlerine 'geleneksel'/ 'konvansiyonel' testler denilmektedir. Bu tanım hücre dışı fetal DNA (cell free fetal DNA:cffDNA) ile yapılan tarama testi ile alışagelmış prenatal tarama testlerini ayırt etmek için kullanılmaktadır. Geleneksel testler ile maternal kandan hormon düzeyi ölçülürken, diğerinde DNA fragmanları tesbit edilerek genetik analiz yapılmaktadır (8).

### Geleneksel Prenatal Tarama Testleri

-Birinci trimester tarama (kombine) testi (NT+hCG+PAPP-A)

-İkinci trimester tarama testi (üçlü-dördümlü test) (AFP+hCG+uE3±Inhibin A)

Geleneksel prenatal tarama testlerinin saptama oranlarına bakıldığında sırasıyla üçlü test % 69, dördümlü test % 81, kombine test % 85 iken, kombine test ve dördümlü testin tek raporda birleştirildiği entegre testin DS saptama oranı % 96'yı bulmaktadır (% 5'lik yanlış pozitiflikle). Amaç, çoklu belirteçlerin kullanımı ile saptama oranını artırırken, yanlış pozitiflik oranını düşürmek ve tanı amaçlı girişimsel işlemi azaltmaktır. Bununla birlikte en yüksek saptama oranı % 99 ile hücre dışı fetal DNA ile yapılan prenatal taramaya aittir (18). Ancak obstetrisyenler tarafından geleneksel tarama metodlarının uygulanması halen birincil seçenek olarak yer almaktadır (8). Günümüzde prenatal taramada kullanılmak üzere yeni biyokimyasal belirteçler tanımlamak için araştırmalar devam etmektedir. Birinci trimester serum parametreleri arasına AFP ve PIGF (plasental growth faktör) eklenmesi önerilmektedir (19,20).

### Birinci Trimester Tarama Testi- Kombine Test (Serum Belirteçleri + NT)

Maternal serum Total/Serbest hCG, PAPP-A düzeylerine ultrasonografi ile ölçümü yapılan fetal ense kalınlığı (NT) değeri dahil edilerek risk hesaplaması yapılır. Bu testin 11+1 - 13+6 hafta aralığında uygulanması nedeniyle gebeliğin erken döneminde fetüs hakkında bilgi edinilmesi en önemli avantajıdır.

NT ölçümü CRL (baş-popo mesafesi) değerinin 38/45-80 mm olduğu 11+1 -13+6 hafta arasında ölçülür ve 2.5 mm'den küçük olması normal olarak değerlendirilir. İlk olarak Nicolaidis tarafından yüksek NT değeri anöplöidi ile ilişkilendirilmiştir ve tek başına NT ölçümünün Down Sendromu saptama oranının % 5'lik yanlış pozitiflikle % 70 olduğu belirtilmiştir (21). NT değeri anöplöidi olmadan konjenital kalp defekti, diyafram hernisi, abdominal duvar defekti gibi konje-

nital fetal defektlerde ve diğer kromozomal anomalilerde de artabilmektedir (22). NT ölçümünde görüntünün midsagittal olması zorunlu olup; deneyimli, NT ölçümü sertifikalı uzman tarafından ultrasonografik ölçüm yapılmalıdır. NT ölçümü sertifikasyonu veren organizasyonlar 'Fetal Medicine Foundation ve Nuchal Translucency Quality Review Programı'dır (23). Fetal Medicine Foundation (FMF) aynı zamanda birinci trimester tarama testi sertifikasyon programına sahip olup, bu program şu an için sadece AutoDELFIA (PerkinElmer) ve BRAHMS Kryptor (Thermo Scientific) cihazlarında çalışılan serum belirteçlerini (serbest  $\beta$ -hCG + PAPP-A) kabul etmektedir. Adı geçen cihazlarda serum belirteçleri için; üç seviye iç kalite kontrol beraberinde dış kalite kontrol (UKNEQAS dış kalite programına en az 6 aylık üyelik olması) sonuçlarının var olmasını ve ultrasonografi yapan kişinin NT sertifikasyonunun varyasyon katsayısının % 10'u geçmesini istemektedir (24).

Son yıllarda klinisyenler tarafından uygun haftada başvuran gebelere birinci trimester prenatal tarama testi yapılması tercih edilmektedir. Birinci trimesterde yapılan ultrasonografi ile erken dönemde yapısal anomalilerin tesbit edilebilirken ek olarak olası gebelik komplikasyonları (preeklampsi, gelişme geriliği vb) hakkında erken bilgi edinilebilir (25).

### Birinci Trimester Taramada Serbest Ya da Total Beta hCG'nin Kullanımı

Serbest beta hCG'nin erken haftada kullanımının daha ayırt edici olduğu ifade edilmiş olsa da Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Maternal Serum Tarama ile ilgili yayınladığı güncel standart I/LA25-A2; serbest ya da total hCG'nin birbirinin yerine kullanılabileceğini belirtmektedir (23). Serbest beta hCG Avrupa ülkelerinde sıklıkla kullanılırken, total beta hCG ise Amerika'da daha sıklıkla kullanılmaktadır. Bu durum daha çok patent kaynaklı bir problem

gibi görünmektedir. Bununla birlikte alanda çıkan ilk yayınların serbest beta hCG ile olması, bu nedenle daha çok veri birikmesi ve sertifikasyon programlarında serbest beta hCG'nin yer alması da serbest beta hCG'nin kullanımını daha yaygın kılmıştır.

### İkinci Trimester Tarama Testi

Gebeliğin 15.-22. haftaları arasında uygulanmaktadır. 16-18 hafta aralığında yapılması idealdir. Trizomi 21 ve Trizomi 18'in yanı sıra nöral tüp defekti için risk hesabı yapılabilmesi bu testin avantajıdır. Üçlü testin (AFP+hCG+uE3) Down sendromu saptama oranı % 69 iken, dördü testin (AFP+hCG+uE3+inhibin A) % 81'dir (18).

Down sendromu saptanan gebeliklerde AFP ve östriol değerleri % 25-30 azalırken (~0.7 MoM), inhibin A ve hCG değerleri yaklaşık 2 kat (~2 MoM) artmaktadır. Trizomi 18 varlığında ise AFP-hCG-Östriol'ün üçü de düşük değerlerde (~<0,5 MoM) gözlenmiştir (23). İzole düşük östriol seviyeleri ile birlikte olduğu gösterilen Smith Lemli Opitz sendromu (SLOS) bazı risk hesaplama programlarında mevcuttur ve istenildiği takdirde raporlanabilmektedir.

İkinci trimester testi yapılmayan gebe nöral tüp defekti açısından 16-18. haftada maternal serum AFP ölçümü ve / veya 18-22. haftada detaylı ultrasonografi ile incelenmelidir (23). Gebeliğin 17. haftasında maternal serum AFP MoM değeri 2.5 iken open spida bifida saptama oranı % 86 (yanlış pozitiflik oranı % 0.3) 'dir (26).

### Birinci Trimester ve İkinci Trimester Tarama Testinde Risk Hesaplaması

Risk hesaplaması yapılırken ticari yazılım programları kullanılır. Tablo 1'de tıbbi cihaz, test parametreleri, risk hesaplama programı seçenekleri özetlenmiştir.

Tablo 1

Geleneksel tarama testleri için tıbbi cihaz, risk analiz programı, serbest/ total hCG kullanımı durumu ve analiz yöntemi

CİHAZ MARKASI	PROGRAM	1.TRİMESTER	2.TRİMESTER	YÖNTEM
Siemens (Immolute)	Prisca	serbest $\beta$ hCG	Mevcut	Kemilüminesans
Beckman-Coulter	Benetech-PRA	total $\beta$ hCG	Mevcut	Kemilüminesans
Roche Diagnostics	SsdwLab	serbest $\beta$ hCG	Yok	Elektrokemilüminesans (ECLIA)
Thermo Scientific (BRAHMS Kryptor)	BRAHMS Fast Screen pre I plus	serbest $\beta$ hCG	Mevcut	Floresans immunoasay
Perkin Elmer (AutoDELFIA)	LifeCycle	serbest $\beta$ hCG	Mevcut (serbest $\beta$ hCG)	Floresans immunoasay

Risk hesaplama programlarında bazal risk olarak maternal yaşa bağlı risk kullanılır. Olabilirlik oranı (LR; likelihood ratio) ile hastaya spesifik risk hesabı yapılır. 'Anne yaşına bağlı risk x LR' formülü kullanılır. Olabilirlik oranı bir popülasyonda taranan bireylerde saptama oranının yanlış pozitif oranına bölünmesi ile bulunur (LR=saptama oranı /yanlış pozitiflik oranı). Bu hesaplama ile pozitif sonuca sahip olanların hastalığa sahip olma ihtimalinin tarama yapılmayanlara göre kaç kat daha fazla olduğu tahmin edilmiş olur (23).

MoM (multiples of median, median katları): Bir testin gebelik haftasına göre medyandan sapma miktarıdır. MoM değerleri belirteçlerin gebelik haftasına göre normalizasyonu için kullanılır (MoM = ölçülen analit değeri / gebelik haftasına ait median değeri). Her laboratuvarın kullandığı belirteçlerin gebelik haftalarına göre kendi MoM değerlerini hesaplaması ve belirli aralıklarla saptamaları takip edip güncellemesi önerilmektedir. Ancak gebelik haftalarının MoM değerlerini hesaplama için her gebelik haftasında en az 200 veri olmalı ve yılda en az bir kere bu değerlendirme yapılmalı, periyodik olarak takip edilmelidir. Eski ve yeni MoM değerleri arasındaki sapma % 10'u geçmemelidir (23).

İrk, etnik köken, vücut ağırlığı artışı (yüksek kan volümünde dilüsyon nedeni), ikiz gebelik (belirteç miktarlarında 2 kat artış nedeni hesaplanan risk psödorisk olarak belirtilir), in vitro fertilizasyon yöntemi ile oluşan gebelik (serbest  $\beta$ hCG  $\uparrow$  PAPP-A $\downarrow$ , uE3  $\downarrow$ , hCG $\uparrow$ ), sigara içimi (uE3, PAPP-A ve free  $\beta$ hCG $\downarrow$ , AFP  $\uparrow$ ), Tip 1 Diyabet (AFP % 20  $\downarrow$ ) MoM hesabını etkiler. MoM hesabını etkileyen bu faktörler raporda düzeltme yapılan faktörler olarak yer alır (23).

Birinci trimester risk hesaplamasına eklenebilecek ultrasonografi belirteçleri; nazal kemik yokluğu, triküspid kapak yetmezliği, ductus venosus ters akımı, uzun kemiklerin (humerus/femur) kısalığı iken, yeni serum belirteçleri PIGF ve AFP'dir. Böylelikle genişletilmiş geleneksel tarama testi ile düşük yanlış pozitiflik oranı ile oldukça yüksek saptama oranları yakalanabilir. Ek olarak preeklampsi gelişimi için riske sahip gebelikler erken tespit edilebilir (27).

CLSI I/LA25-A2'ye göre maternal serumda ölçülen analitlerin birimleri, MoM değerleri, düzeltilmiş MoM değerleri, kullanılan düzeltme faktörleri ve kullanılan kesme değeri (cut off) laboratuvarından çıkan raporda belirtilmeli ve rapor belirlenen kesme değerine göre düzenlenmeli olarak belirtilmiştir. Bu kılavuza göre Down sendromu için sınır değer kombine test ve üçlü/dörtlü testte 1:250, entegre testte 1:150 iken Trizomi 18 için sınır değer 1:100 kullanımı önerilmektedir.

(23). Fakat klinik kullanımda özellikle birinci trimester tarama testi risk değerlendirilmesinde kesme değeri (cut-off) kullanılmama eğilimi öne çıkmaktadır. Örneğin, 1:250 kesme değeri kullanıldığında 1/240 değerinin riskli olarak ele alınırken, pratikte fazla bir risk azalması içermeyecek olan 1/400 riskinin normal ele alınması gibi sakıncaları mevcut olabilir.

Birinci ve ikinci trimester tarama testlerinin kombinasyonları 'entegre', 'ardışık basamaklı' ve 'ardışık koşullu' olarak adlandırılmaktadır. Entegre test; birinci trimester ve ikinci trimester tarama testlerinin uygun haftada uygulanıp tek bir rapor halinde Down sendromu riskinin verildiği formattır. Bu yöntem ile yanlış pozitiflik oranı % 2-5 iken DS saptama oranı % 90-96'ya yükselmektedir. Fakat teste birinci trimesterde başlanıp sonucun ikinci trimesterde verilmesi nedeniyle sonuç bekleme süresi uzundur. Tarama sonucu pozitif bulunan gebelerde birinci trimesterdeki prenatal tanı seçeneklerinin kullanılamayacak olması yöntemin en önemli kısıtlılığıdır ve pratikte kullanılmamaktadır (18). Ardışık basamaklı olanda birinci trimester tarama testinde risk pozitif ise sonuç rapor edilip hasta girişimsel tanı testine yönlendirilir. Risk yok ise ikinci trimester tarama testi haftasında yapıp sonuç tek rapor olarak verilir. Ardışık koşulluda ise birinci trimester tarama testi yapıp sonuçlar, 'yüksek risk', 'orta risk', 'düşük risk' şeklinde üç gruba ayrılır. Yüksek risk grubu doğrudan girişimsel tanı testine ve orta risk grubu ikinci trimester tarama testine yönlendirilirken, düşük risk grubuna başka test yapılması önerilmez. Ardışık tarama yöntemiyle saptama oranı % 88-94' tür (% 5 yanlış pozitiflik) (18).

#### **Maternal Kanda Hücre Dışı Fetal DNA (cffDNA) İle Prenatal Tarama (Non-İnvazif Prenatal Test-NIPT)**

Lo ve ark.'nın 1997'de (15) gebe kadınların plazmasında cfDNA'nın bir kısmının fetal orijinli olduğunu tesbit etmesinin ardından yapılan çok sayıda çalışma neticesinde NIPT 2011'den itibaren klinik kullanıma girmiştir. Bu test 9-10 haftadan itibaren doğuma kadarki süreçte yapılabilmektedir (16, 28, 29). Trizomi 21, Trizomi 18, Trizomi 13 ve seks kromozom anöplöidilerin taramasında kullanılmaktadır. Ayrıca fetal cinsiyet belirlemenin önem arz ettiği hastalıklarda (konjenital adrenal hiperplazide erken cinsiyet belirleme ile virilizasyon önleme tedavisi başlanması gibi), Rh grup belirleme (Rh- anne ve Rh+ fetus durumu) ve preeklampsinin erken tanısında da kullanılabilir (30-33). Mikrodelesyonlarla ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen henüz klinik validasyon yapılamamıştır (8,34). 2015'te yayınlanan komite görüşünde ikiz gebeliklere NIPT testi önerilmez iken (8) yeni yapılan çalışmalar ikiz gebeliklerde de kullanılabileceği

yönünde görüş bildirilmektedir (35).

Gebe bir kadında maternal dolaşımdaki cfDNA maternal ve plasental kaynaklıdır. Maternal cfDNA kaynağı annenin hematopoetik hücreleridir ve daha büyük baz çiftine sahiptir. Plasental kaynaklı cffDNA ise gebeliğin 7. haftasından itibaren (döllenme sonrası 18. gün) plasentanın apoptotik trofoblastlarından anne kanına salınmaya başlayıp, salınımı gebeliğin sonuna kadar devam eder. 10. haftadan itibaren anne kanındaki fetal fraksiyon % 10-15 oranındadır ve 20. haftadan doğuma kadar haftada % 1 artış ile gebeliğin sonunda % 50 civarına ulaşır. Yarı ömrü 2-3 saat olup, doğumdan sonraki 2 gün içinde tüm cffDNA maternal kandan temizlenir. (36-38).

### Hücre Dışı Fetal DNA İçin Numune Tipi Ve Hazırlığı

Hücre dışı fetal DNA için plazma numunesi kullanımı tercih edilmektedir. Plazmanın içerdiği ortalama fraksiyonel cffDNA miktarının seruma (% 0,13-1,0) göre daha fazla olduğu tesbit edilmiştir bunun altında yatan neden, pıhtılaşma sırasında seruma maternal beyaz kan hücrelerinden DNA fragmanlarının çıkması ve bunun maternal cfDNA miktarını artırırken fetal yüzdesini düşürmesidir (39). K3EDTA içeren tüpler ya da özel üretilmiş 'Cell free DNA' tüpü numune alınımında kullanılabilir. K3EDTA içeren tüplere alınan kan 2-6 saat içinde santrifüj sonrası plazma hemen ayrılıp, -20°/-80°'de saklanmalıdır. Cell free DNA tüpü çekirdekli hücre stabilizasyonu ve nükleaz inhibisyonu ile beyaz kan hücrelerinin lizis olmasını engelleyerek 18°-25°'de 7 gün stabilite sağlamaktadır. Bu da çalışılacak laboratuvara numunenin gönderiminde kolaylık ve stabilite güvencesi sağlamaktadır. Plazma elde etmek için 1. santrifüj maksimum 1200-1600 g'de 10 dakika ve 2. santrifüj 16000 g'de 10 dakika olacak şekilde çift santrifüj yapılması ve hemolizden kaçınılması önerilmektedir (40).

### Hücre Dışı Fetal DNA Çalışma Yöntemi

cffDNA çalışma yöntemi olarak yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılmaktadır. Anöplöidi saptanması için yeni nesil dizileme temelli üç yaklaşım öne çıkmaktadır: (18,41).

1. Masif paralel dizileme (Massively Parallel Sequencing-MPS) yöntemlerinden sıklıkla Shotgun MPS kullanılır. Maternal plazmadaki büyük miktardaki DNA fragmanlarının tümünün sekanslanması ve elde edilen milyonlarca küçük dizinin kromozomdaki yerinin saptanması esasına dayanır. Beklenen sayımdan düşük ya da yüksek olan bölgeler tesbit edilir.

2. Targeted MPS (t-MPS) ise sadece ilgilenilen kromozom bölgelerinin çoğaltılmasıdır. Fazladan DNA

fragmanlarının sekanslanması önüne geçer.

3. Targeted MPS ile tek nükleotid polimorfizm (SNP) analizi ise kandaki anne ve fetal DNA'ya ait tek nükleotid dizilim değişikliklerini, allelerin dağılımını analiz eder. Referans kromozoma ihtiyaç duymaz. Çalışma için paternal DNA gerekliliği bulunmaktadır. Bu yöntemi kullanan NIPT için babanın da kan vermesi gereklidir (41). Bu üç yöntem dışında metillenmiş DNA ya da RNA bazlı yaklaşımlar da mevcuttur. Tüm bu yöntemler biyoenformatik algoritmalara ihtiyaç duyar (41). Şu an için dünyada MPS yöntemi ile çalışan başlıca ticari firma ve ürünleri Sequenom- MaterniT21/USA, Verinata-Verifi/USA, t-MPS ile Ariosa-Harmony/USA, SNP ile Natera-Panorama/USA'dır.

### NIPT Sonuç Raporu ve Değerlendirilmesi

Sonuç raporunda pozitif prediktif değer/negatif prediktif değer ve fetal fraksiyon yüzdesi belirtilmiş olmalıdır (34). Geçerli sonuç elde etmek için cfDNA fetal fraksiyonu en az % 4 olmalıdır (16). Yeterli fetal fraksiyon olmadığında sonuç alınamamaktadır. Fetal fraksiyon azlığının nedeni erken gebelik haftasında (<10 hafta) numune alınması, uygunsuz numune hazırlama-saklama koşulları, maternal obezite, fetal trizomi varlığı olabilir. Raporlarda sonuç 'Pozitif (>% 99)', 'Negatif (<1:10000)', 'Sonuç alınamadı' şeklinde raporlanır. NIPT testinde 'sonuç alınamadı' şeklinde rapor % 1-8 kadardır. Sonuç alınamaması durumunda altta yatan nedenin artmış anöplödi riski olması nedeni genetik danışmanlık, ileri ultrasonografik inceleme ve tanısal test uygulanmalıdır (8). Diğer taraftan Maternal Robertsonian translokasyon, kaybolan ikiz sendromu, plasental mozaiklik, maternal malignite varlığı yanlış pozitiflik nedeni olabilir. Gebeliği sonlandırma kararı tek başına cffDNA prenatal tarama sonucu ile alınmamalı, sonucu pozitif olan hasta mutlaka tanısal teste yönlendirilmelidir (8). Negatif test sonucu fetüste herhangi bir anomali olmadığı anlamına gelmemektedir ve plasental mozaikliğin yanlış negatifliğe de neden olabileceği akılda tutulmalıdır (8,34).

Yapılan bir metaanalizde Down sendromu, Trizomi 18 ve Trizomi 13 açısından cffDNA'nın saptama oranı yüksek iken (sırasıyla % 99.7, 97.9, 99) yanlış pozitifliğinin (% 0.04, 0.04, 0.04) düşük olduğu belirtilmiştir (42). Yüksek saptama oranına sahip olması NIPT kullanımının % 0.1-0.2 oranında prosedürel fetal kayıp riski olan girişimsel tanı testlerinin kullanımını azaltabileceği düşünülmektedir (43). Ancak NIPT bir tarama testi olup (44) henüz tanısal bir test değildir (45). Çünkü raporlanamayan sonuçlar olduğu gibi yanlış pozitif, yanlış negatif sonuçlar da olabilmektedir (46, 47). Nöral tüp defekti açısından bu testin bir fikir vermemesi nedeniyle detaylı ultrasonografik değerlendirme ve ek

olarak AFP düzey ölçümleri yapılması gerekliliğini ko- rumaktadır (8). Geleneksel birinci trimester taraması esnasında çok çeşitli fetal defektlerin saptanabilmesi cffDNA'nın geleneksel tarama testlerinin yerini alma- sına engel olmaktadır. Ancak geleneksel tarama ile yüksek riskli olanlara koşullu bir strateji ile cffDNA'nın istenmesinin maliyet etkin bir yaklaşım olabileceği be- lirtilmiştir (25).

Güncel olarak önerilen ilk seçenek prenatal tarama testi olarak 1.trimester kombine test istenmesidir. Kombine test sonucunda Down sendromu açısından yüksek riski (1:50 veya 1:100) olan gebelerin girişim- sel tanı testine yönlendirilmesi, orta risk grubuna cffD- NA önerilmesi, düşük risk grubuna ise (1:1000) ek test yapılmaması gibi bir protokol izlenerek; cffDNA'nın sekonder ya da refleks test olarak koşullu kullanımın- ın daha doğru olacağı belirtilmektedir (27).

Günümüzde Türkiye'de ikili, üçlü, dörtlü testin ve ta- nısal testlerin Sağlık Uygulama Tebliği'nde fiyatlandır- ması mevcuttur. Ancak cffDNA analizi özel ticari labo- ratuvarlar tarafından belirlenen ücretler karşılığında sağlanmaktadır. Yeni nesil dizileme tekniklerinin kul- lanımı ve biyoenformatik sistemlerin gerekliliği cffDNA ile prenatal taramanın pahalı (yaklaşık 550 euro) ve komplike bir test olmasının altında yatan nedenlerdir. NIPT'in birinci tercih tarama veya koşullu tarama testi olma durumunda Down sendromu saptamada mali- yet etkinliğini inceleyen bir çalışma; NIPT kullanımının her iki durumda da geleneksel testlere kuvvetli bir al- ternatif olduğunu fakat bunun ancak fiyatının düşmesi ile gerçekleştirilebileceğini belirtmektedir (48).

## Sonuç

cffDNA henüz ileri bir prenatal tarama testidir, pozitif sonuçlar mutlaka tanısal teste yönlendirilmelidir. Gü- venli olması (diğer non invazif tarama testlerine göre saptama oranının yüksek, yanlış pozitifliğin düşük olması) nedeniyle tarama testi olarak kullanımı giri- şimsel işlem sayısını ve fetal kayıp riskini azaltmada faydalıdır. Birincil tarama aracı olarak yaygın kullanı- labilmesi ve tanısal bir test olabilmesi için daha çok veri ve klinik deneyime ihtiyaç bulunmaktadır.

## Kaynaklar

1. Hayran M. Sağlık Araştırmaları İçin Temel İstatistik. Hayran M, editör. Art Ofset Matbaacılık, Ankara: 2011; 25-29.
2. Kanıtı Dayalı Laboratuvar Tıbbı Editörler: Christopher P. Price and Robert H. Christenson Çeviri editörü: Diler Aslan Palme Yayıncılık, 2010 Ankara
3. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Ne- len V, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital ano- maly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012;20:521-6.

4. Loane M, Morris JK, Addor M, Arriola L, Budd J, Doray B, et al. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet* 2013;21:27-33.
5. Parker SE, Mai CT, Canfield MA, Rickard R, Wang Y, Meyer RE, et al. Updated national birth prevalence estimates for se- lected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defe- cts Res A Clin Mol Teratol* 2010;88:1008-16.
6. Dashe JS. Aneuploidy Screening in Pregnancy *Obstetrics & Gynecology*. 2016;128(1):181-94.
7. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Births in the United States, 2014. NCHS Data Brief No. 216. Hyattsville (MD): Nati- onal Center for Health Statistics; 2015.
8. Committee opinion no 640: cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2015;126(3):e31-7
9. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An asso- ciation between low maternal serum alpha fetoprotein and fetal chromosome abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;148(7):886-94.
10. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromo- some abnormalities. *Prenat Diagn*. 1987;7(9):623-30
11. Jorgensen PI, Trolle D. Low urinary estriol excretion during pregnancy in women giving birth to infants with Down syndro- me. *Lancet*. 1972;2(7781):782-4.
12. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gy- naecol* 1988;95:330-3
13. Nicolades KH, Azar G, Bryne D, Mansur C, Marks K. Fetal nu- chal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *BMJ* 1992;304:867-9.
14. Wallace EM, Swanston IA, Mc Neilly AS, Ashby JP, Blundell G, Calder AA, et al. Second trimester screening for Down syndro- me using maternal serum dimeric inhibin A. *Clin Endocrinol*. 1996;44(1):17-21.
15. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Red- man CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7
16. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Non-invasive detection of fetal trisomy 21 by sequen- cing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:205.e201-205.e211.
17. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plas- ma to detect down syndrome an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011;13(11):913-20
18. Rink BD, Norton NE. Screening for fetal aneuploidy. *Seminars in Perinatology*. 2016;40(1):35-43.
19. Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies 21,18 and 13 by ultra- sound and biochemical testing. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:118-26.
20. Kagan KO, Hoopmann M, Abele H, Alkier R, Lüthgens K. First-trimester combined screening for trisomy 21 with different combinations of placental growth factor, free  $\beta$ -human chorio- nic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;40:530-5.
21. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003;21(4):313-21.
22. Souka AP, Kaisenberg Von CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(4):1005-21.
23. CLSI. Maternal Serum Screening; Approved Standard-Second Edition. CLSI document I/LA25-A2.Wayne, PA: Clinical and La- boratory Standards Institute; 2011.
24. <https://fetalmedicine.org>
25. Sonek JD, Kagan KO, Nicolaides KH. Inverted Pyramid of Care. *Clin Lab Med* 2016;36(2):305-17

26. Wald NJ, Hacksawh A. Neural tube defects. In Wald N, LACK I eds. *Antenatal and Neonatal Screening*. 2nd ed Oxford: Oxford University Press; 2000 p.23-57.
27. Carmichael JB, Liu HP, Janik D, Hallahan TW, Nicolaides KH, Krantz DA. Expanded conventional first trimester screening. *Prenat Diagn*. 2017;37(8):802-7
28. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011;342:c7401.
29. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem*. 2011;57(7):1042-9.
30. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *ClinChem*. 2005;51(9):1598-604.
31. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011;306(6):627-36.
32. Kolialexi A, Tounta G, Mavrou A. Noninvasive fetal Rh D genotyping from maternal blood. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(3):285-96.
33. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011; 32:17-20
34. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf BL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2016;18:1056-65
35. Le Conte G, Letourneau A, Jani J, Kleinfinger P, Lohmann L, Costa JM et al. Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as screening test for trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;52(3):318-24.
36. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma *Am J Hum Genet* 1999;64:218–24.
37. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415-8
38. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem*. 1999;45(10):1747-51
39. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
40. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta* 2013; 424:222-30.
41. Everett TR, Chitty LS. Cell free fetal DNA: the new tool in fetal medicine. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:499-507.
42. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50:302-14.
43. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45:16-26.
44. Benn P, Borrell A, Chiu R, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society For Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn*. 2015;35:725-34.
45. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015;372:1589–97.)
46. Wang Y, Zhu J, Chen Y, Lu S, Chen B, Zhao X, et al. Two cases of placental T21 mosaicism: challenging the detection limits of non-invasive prenatal testing. *Prenat Diagn*. 2013;33:1207–10.
47. Dugo N, Padula F, Mobili L, Brizzi C, D'Emidio L, Cignini P, et al. Six consecutive false positive cases from cell-free fetal DNA testing in a single referring centre. *J Prenat Med*. 2014;8:31–5.
48. Bayon JC, Orruno E, Portillo MI, Asua J. The consequences of implementing non-invasive prenatal testing with cell-free foetal DNA for the detection of Down syndrome in the Spanish National Health Service: a cost-effectiveness analysis. *Cost Eff Resour Alloc* 2019;17:6