

Non-İnvaziv Prenatal Tanı

Dr. Murat Erdoğan

*Kayseri Eğitim Araştırma
Hastanesi*

09/02/2016

- Prenatal tanı fetüsdeki genetik veya genetik dışı durumların ve malformasyonların mümkün olabildiğince erken dönemde tanınması için yapılır.
 - Kromozomal anomalilerde fetal kromozom analizi, aCGH, microarray
 - Monogenik hastalıklarda DNA analizleri.....
 - Prenatal tanı yöntemleri:
 - İnvaziv
 - NoninvazivNoninvaziv yöntemlerde;
 - Fetal USG
 - Biyokimyasal tarama testleri
 - Maternal plazmada fetal DNA tayini***
- Amaç girişimsel işlemin azaltılması!.....**

Fetal USG Amaç

- 1-Gebelik kesesinin lokalizasyonunun belirlenmesi (intrauterin-ekstrauterin?)
- 2-Kese-koryon-embriyo sayısının belirlenmesi
- 3-Koryodesidual tabakanın düzenliliğinin izlenmesi
- 4-Kalp aktivitesi-aktivitelerinin belirlenmesi
- 5-Gebelik yaşının tesbiti
- 6-Yolk kesesinin saptanması
- 7-Abortus olasılığının değerlendirilmesi
- 8-Kitle varlığının belirlenmesi (uterus-adneks)
- 9-Douglas boşluğunun değerlendirilmesi
- 10-Mevcut embriyoner ve fetal anomalilerin tanısı

- **NT (nuchal translucency);**

Kombine test olarak 10-13.hafta arasında PAPP-A ve β -hcg ölçümü ile beraber ve integre test olarak bunlara ilaveten 14-22.hf arası α fp,E3 ve inhibin A ile birlikte kullanılır.

NT yüksekliği ile DS ile ilişkisi ilk kez 1990 yılında kuruldu.

- **PAPP-A**

DS'lu fetus varlığında ilk trimester PAPP-A seviyesi ciddi oranda düşmekteyken gebelik ilerledikçe normal ile DS'lu gebelikler arasındaki PAPP-A farkı da giderek azalmaktadır. **Bu nedenle PAPP-A DS'u taraması için ikinci trimesterde marker olarak kullanılamaz.**

Ayrıca yapılan çalışmalarda **Cornelia de Lange sendromlu** bebek doğuran bazı gebelerde de maternal PAPP-A eksikliği bildirildi.

- **hCG**

Down sendromu olgularında birinci trimester esnasında f β -hCG düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Tek başına kullanılırsa, 1.trimester DS taramalarında doğruluk oranı %23-25 olarak bulunmuştur. 2. trimesterde ise bu oran %33 civarındadır.

- **Alfa Feto Protein;**

Tarama testi için en uygun zaman 16. ve 18. haftalardır. Çünkü bu haftalarda normal gebe ile NTD'li gebe arasındaki fark en fazladır.

- **Unkonjuge Estriol (uE3);** anensefali, adrenal hipoplazi, fetal ölüm durumlarında östrojen düzeyleri belirgin olarak azalmıştır.

Down sendromundan etkilenmiş gebeliklerde uE3 düzeyi normal gebeliklere göre düşüktür.

- **İnhibin A;** Down sendromlu fetüslere sahip gebelerde İnhibin-A düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

- **Birleşik tarama testi yakalama oranları (%3 FPR)**
- -AFP, hCG, uE3, İnhA : %60
- -PAPP-A, hCG, NT : %81
- -Sequential PAPP-A, hCG (10), NT(11), AFP, hCG, uE3, İnhA (15-21): %92
- -Integre PAPP-A, hCG(10), NT(11), AFP, hCG, uE3, İnhA (15-21) : %92

Prenatal Screening Perspectives 2009

Table 2. Directly Observed Performance Characteristics of First- and Second-Trimester Screening Tests for Down's Syndrome.

Screening Test	Risk Cutoff	Detection Rate [‡] <i>percent (no. positive/total no.)</i>	False Positive Rate <i>percent</i>
First-trimester combined screening			
Hygroma not included	1:150	77 (71/92)	3.2
Hygroma included	1:150	82 (96/117)	3.2
First-trimester combined screening			
Hygroma not included	1:300	82 (75/92)	5.6
Hygroma included	1:300	86 (100/117)	5.6
Second-trimester quadruple screening	1:300	85 (74/87)	8.5
Sequential screening in both trimesters [†]	1:150 for 1st trimester 1:300 for 2nd trimester	94 (82/87)	11

n engl j med 353;19 www.nejm.org november 10, 2005

FASTER(for the First- and Second-Trimester Evaluation of Risk) Research Consortium

Prenatal Testing Algorithm

WOMEN SHOULD BE OFFERED INVASIVE TESTING
*ACOG PRACTICE BULLETIN #88, 2007 ACMG
 GUIDELINES 2009*

Do not want
further information

Want further information
but do not want risk of
invasive procedures

Women who want to
know everything

**Detailed ultrasound is still
recommended for all patients
regardless of testing
decisions. Nuchal
translucency provides
information beyond fetal
aneuploidy status.**

SCREENING		
Serum Screening	NIPT	
11-13 wks and/or 15-22 wks	≥9 weeks	
5%	<1%	
<u>2-3 Conditions</u> T21 T18 T13	<u>Chromosome Conditions</u> T21 T18 T13 Triploidy X,Y	<u>Microdeletions**</u> 22q11.2 1p36 Angelman Cri-du-chat Prader-Willi

Amniocentesis
or CVS

- *"Non-invasive prenatal testing (NIPT) offers an intermediate step between serum screening and invasive diagnostic testing. "*

International Journal of Women's Health 2015:7 113–126

Maternal serumdan fetal DNA incelemesi;

Anne kanında serbest olarak dolaşan fetal DNA'nın tespiti esasına dayanmaktadır.

Maternal plazmada fetal nükleik asit ilk kez 1997 yılında Lo ve ark.tarafından erkek fetüs sahibi gebe bir kadının kan dolaşımında tespit edilmiştir.

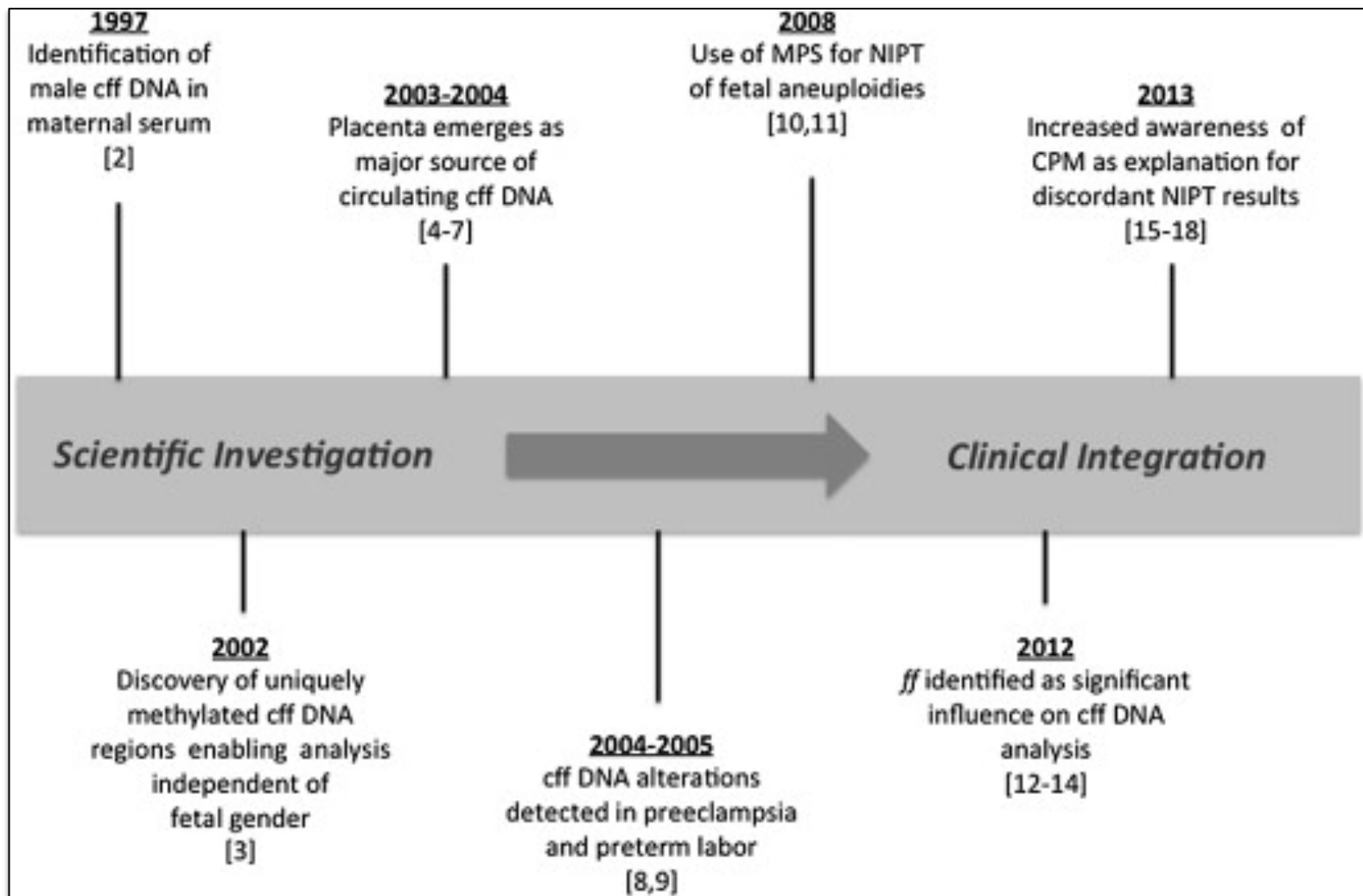
Lancet.1997 Aug 16;350(9076):485-7.

Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS.

Fetal DNA'nın kaynağı plasentayı oluşturan trophoblastlardır ve plazmadaki tüm DNA'nın yaklaşık olarak %3-13 'ünü teşkil eder. Çalışmalarda en erken , gebeliğin 4.haftasında gözlemlendiği belirtilmiştir ayrıca gebelik süresince de miktarı artmaktadır.

Fig. 1. Highlighted studies span initial scientific investigation of cff DNA through its eventual integration into clinical practice. MPS: Massively parallel sequencing; NIPT: Noninvasive prenatal testing; ff: fetal fraction, CPM: Confined placental mosaicism



- Maternal dolaşımdaki fetal DNA maternal DNA'dan belirgin oranda küçüktür .Maternal cf-DNA ort.163 bp iken fetal cf-DNA ort.146 bp'lik boyutlara sahip fragmentler halinde bulunur. Maternal plazma ile dilüe vaziyettedir ve bu fetal fraksiyonlar gestasyonel yaş ile pozitif,**maternal ağırlık ile negatif korelasyon** gösterir. Fetal fraksiyonların yüzdesi real-time quantitative PCR ile belirlenebilir. %8'in üzerinde ise yeterli iken %4-8 arası değerler sınır kabul edilir.
- cf-DNA, ağırlıklı olarak plasenta kaynaklı olduğundan, plasentaya ait özellikleri (plasenta ile sınırlı mozaicism, plasental epigenetik özellikler, vs) yansıtmaktadır ve bu nedenle **cfp-DNA** olarak adlandırılması önerilmektedir.

Fetal Fraction Matters

“An aneuploidy sample with a lower fetal fraction has a higher probability of resulting in a false negative result.”

Thomas Musci, MD

Prenatal Perspectives. Volume 1, No.2 **2013.**

0-4%

4-8%

8%+

**Fetal Fraction too
low to report**

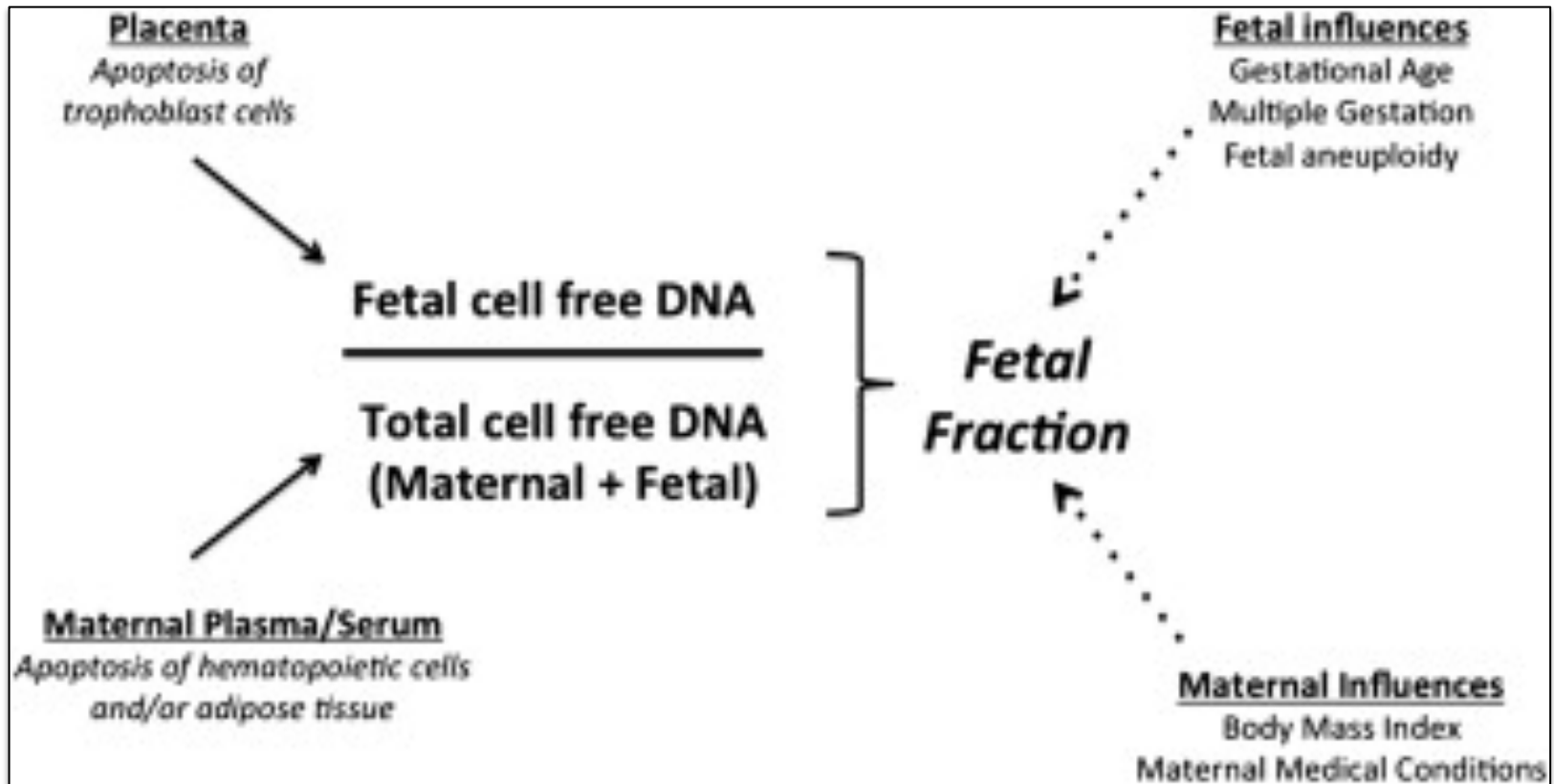
**Intermediate fetal fraction
– decreased sensitivity with
counting methodology**

**Fetal fraction adequate to
achieve best performance**

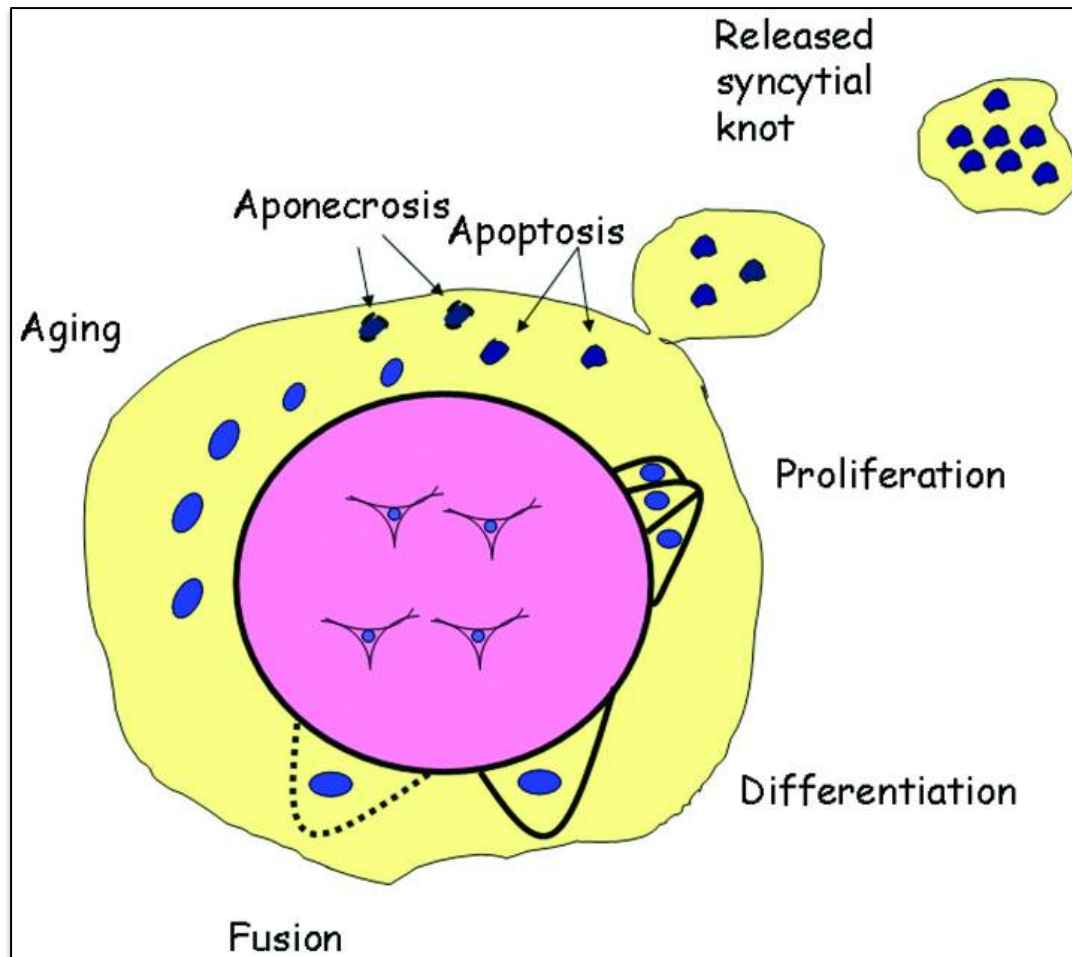
Table 3-1 **Summary of key properties of fetal/placental elements in maternal blood, specifically cell-free fetal nucleic acids and intact fetal cells.**

Properties	cffNA	Fetal Cells
Earliest detection	4 weeks	~ 7 weeks
Proportion	5-10%	0.0001 - 0.01%
Persistence in maternal blood	< 24 hours	> 27 years
Relevant physical properties	Short fragments	Dense nucleus

Fig.: The fetal fraction is the ratio of the fetal to total circulating cell-free DNA. Throughout gestation, the fetal fraction is influenced by many exogenous factors.



- Yarı ömrü kısadır ve kalıcı değildir. Doğumdan sonra saatler içerisinde hızla uzaklaştırılır. Fakat bazı yayınlarda uzun süre kanda saptanabildiği belirtilmiştir.
- Cff-DNA kaynağı tam olarak bilinmemekle birlikte son çalışmalarda major kaynağın "syncytral knots" şeklinde sinsityotrofoblastlardan salınan trofoblastik orjinli hücreler olduğu görülmüştür. Bu hücreler apoptoza ve nekroza uğrarlar (aponecrosis) ve içlerinde paketli halde bulunan nükleik asitler(DNA-RNA) maternal dolaşıma salınır. Bu mekanizma normal olarak gelişebildiği gibi “accidental breakage “ denilen rastlantısal durumlarda da olabilir.



The mechanisms of trophoblast deportation into the maternal circulation.

- Cff-DNA seviyelerinin artışıının bazı çalışmalarda gebelikle ilişkili bazı hastalıkların (preeklampsi, h.gravidarum, preterm doğum, plasenta previa gibi..) erken tanısında da predictive bir marker olarak kullanılabileceği belirtilmiş olmakla birlikte bu hastalıkların progresyonu esnasında cff-DNA miktarlarının azalabildiği de gösterilmiştir. Bu çelişkili bir durum olmakla beraber cff-DNA düzeyleri gebelikle ilişkili bu gibi durumlarda başlangıçta açıkça artış gösterir.

- **Mevcut NIPT Teknikleri:**

Daha önceden de belirtildiği gibi toplam cff-DNA miktarının az olmasından dolayı fetal DNA'yı maternal kökenliden ayırt etmede henüz tam güvenilir bir yöntem bulunamamıştır. Bu zorluk cff-DNA analizine dayalı fetal kromozom kopya sayısı tespitinde PCR amplifikasyonu ve maternal+fetal cf-DNA komplementerlerinin analizi gerektirmektedir. Mevcut metotların çoğunda reaksiyonlar, NGS platformundaki çok sayıda amplifiye olan molekülün masif paralel bağlanması ile hazırlanabilir. Böylece sekanslanabilen DNA molekül sayısı ve buna bağlı üretilen bilginin miktarı Sanger sekanslama ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artış göstermektedir.

- Burada 2 farklı yaklaşım bulunmaktadır: quantitative (shotgun ve targeted) ve qualitative targeted SNP bazlı metodlar.

Maternal kandan alınan plazma örneğinde tüm hücre yapılarının uzaklaştırılması



DNA'nın ekstraksiyonu



Kalitatif Yöntemler;
Maternal ve fetal DNA
polimorfizm/değişimlerini
tanıyır

Kantitatif Yöntemler;
Normal ile karşılaştırma esasına
göre tanıyır

NGS NIPT Yöntemleri:

Quantitative Massively Parallel Shotgun Sequencing (MPSS)

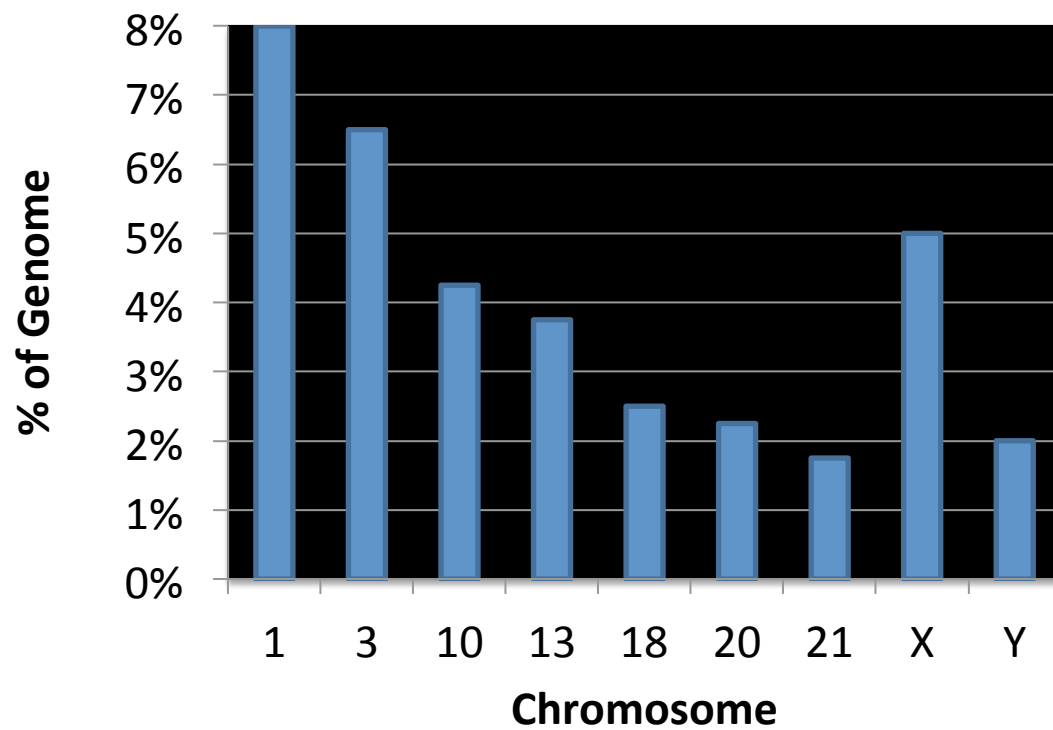
Nonspesifik olarak tüm kromozomlardan DNA dizi okumalarını sağlayan NGS temelli bir tekniktir. Bu teknikle on milyonlarca kısa DNA parçası (25-36 bp) tek bir kerede hızla ve aynı anda dizilenebilir.

Başlangıç amplifikasyonundan ve full cff-DNA karışımının sekanslanmasından sonra her bir fragmanın kromozomal orjini, human genome sequence ile her fragman sekansının karşılaştırılması sonucu elde edilir. Bunuda her bir kromozom dizisinin yoğunluğunun tüm otozomların ort. yoğunluğu üzerinden oran karşılaştırmaları izler. Bu da Z skor analizi olarak ifade edilir.

- Bu metod cff-DNA'yı maternal cf-DNA'dan ayırd etme kabiliyetine sahip değildir. Fetal trizomiden dolayı kaynaklanan dozaj artışı direkt olarak fetal fraksiyon ile ilgilidir. Düşük fetal fraksiyonlarda artış değişkendir. Bu özellik erken gebelik haftalarında önemlidir , gebelik haftası ilerledikçe fetal fraksiyonlarda artış olur. Ayrıca BMI yüksek gebelerde fetal fraksiyonlar daha azdır çünkü BMI ile fetal fraksiyonlar (-) koreledir. Bu minör farklılıkların etkisini azaltmak için ve güvenilirlik için çok sayıda okumaya ihtiyaç vardır.

- MPSS tüm kromozomları sekanslar ve tüm genomdan yaklaşık 6.3 milyon okuma yapar (uniquely mapped read-tam istenilen bölgelerin okunması?) Ancak MPSS okumalarının %25'i bu şekildedir. Kesin analizde yeterli veri elde edebilmek için örnek başına yaklaşık 25 milyon okuma gerekir. Bu durum analizde diğer kromozomlarda hesaba katılınca önem kazanır ve klinik önemli kromozomların genomun tamamında temsiliyeti dikkate alındığında gereksizlik olarak düşünülebilir fakat başka kromozomları taramak ve anöploidilerinin tespitinde engel değildir.

- Bir trizomik fetüs extra kromozomdan kaynaklanan %50 daha fazla genetik materyale sahip olduğu için bu kromozomdaki DNA oranı, varsayılan dizomik referans kromozom ile karşılaştırıldığında , öploid gebeliklerden daha yüksektir. İlgili kromozomdan yapılan sekans okuma sayısının referans kromozomdan yapılabana oranı tespit edilen eşiğı aşarsa fetal trizomi anlamı çıkarılır.Bu yaklaşım “counting” olarak adlandırılır. Bu counting metodlarla cff-DNA miktarındaki kantitatif farklılıklar tespit edilir, cff-DNA total cf-DNA’nın az bir kısmını içerdiği için fetal trizomi durumlarında aradaki fark artar.



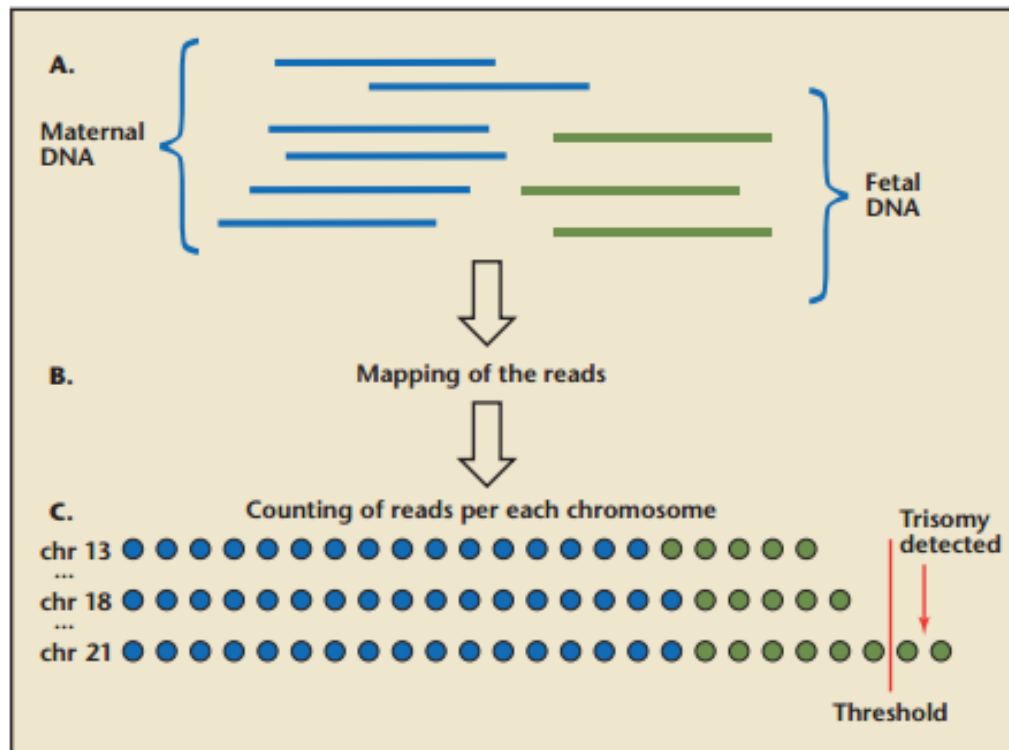


Figure 1. Massively parallel shotgun sequencing for the noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidy. (A) Fetal DNA (*green*) circulates in the maternal plasma as a minor population among a high background of maternal DNA (*blue*). A sample of maternal plasma is obtained. Short fragments of cell-free DNA are then sequenced. (B) The chromosomal origin of each sequence is identified by mapping the reads to the human reference genome. (C) The number of unique sequences mapped to each chromosome is then counted and the number of sequences for the chromosomes of interest is determined in subsequent analysis. Aneuploidy is detected by various statistical techniques based on the number of reads representing the chromosome of interest compared with the other chromosomes. The *blue* and *green* circles represent the reads mapped to each chromosome from maternal and fetal DNA fractions, respectively. However, there is no way to distinguish the origin of the individual reads; the only difference is in the total number of reads that are detected. If the reads exceed that expected, the fetus is trisomic for that chromosome (shown for chr 21 above).

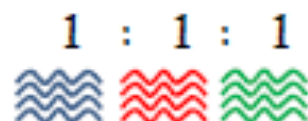
FETUS NORMAL

Başlangıçtaki DNA Havuzu



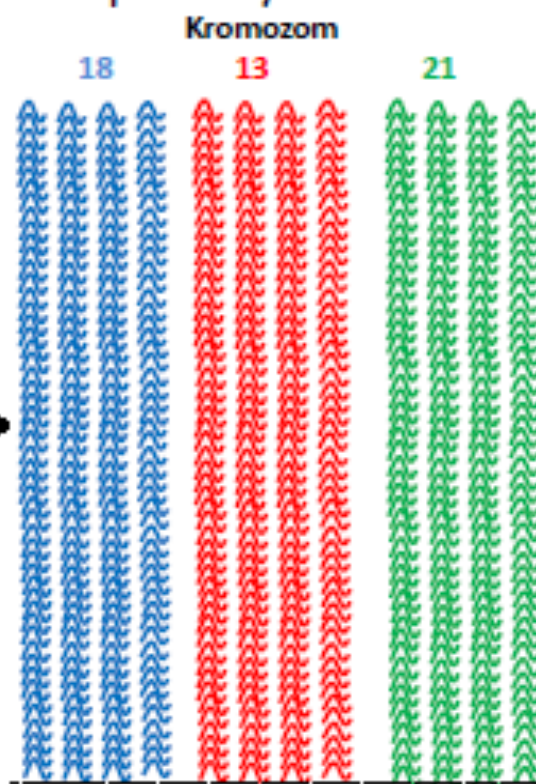
Anneye ait
fragman

amplifikasyon



Fetuse ait
fragman

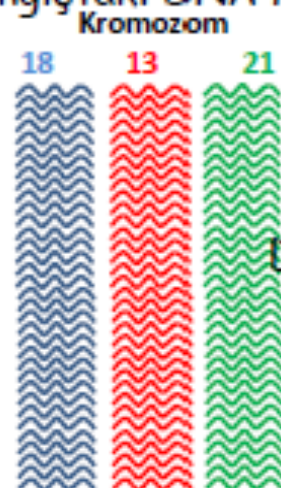
Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



Tüm amplifikonların oranı eşit

FETÜS TRİZOMİK

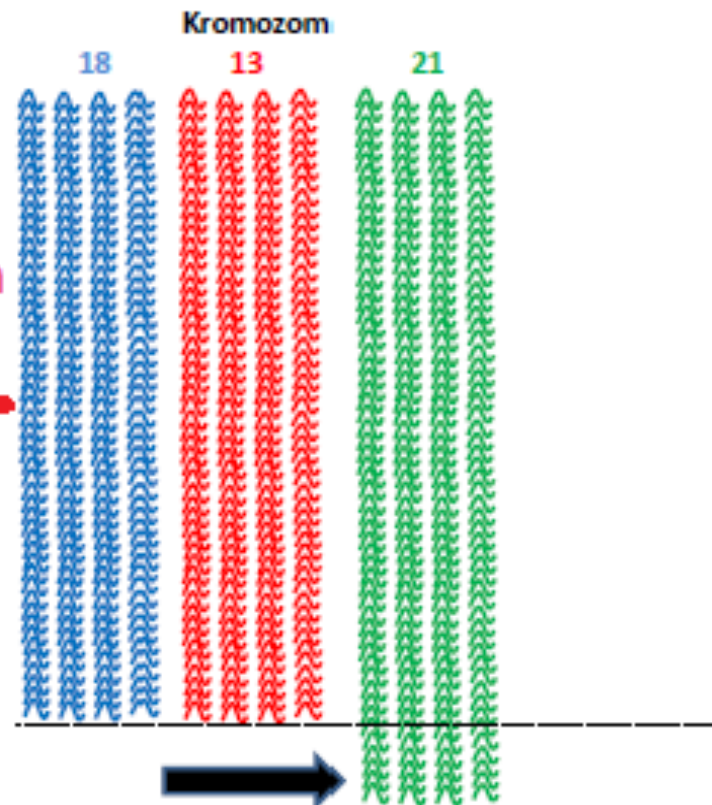
Başlangıçtaki DNA Havuzu



Amplifikasyon



Amplifikasyon sonrası DNA Havuzu



21. Kromozom AMPLİKONLARINDA artış

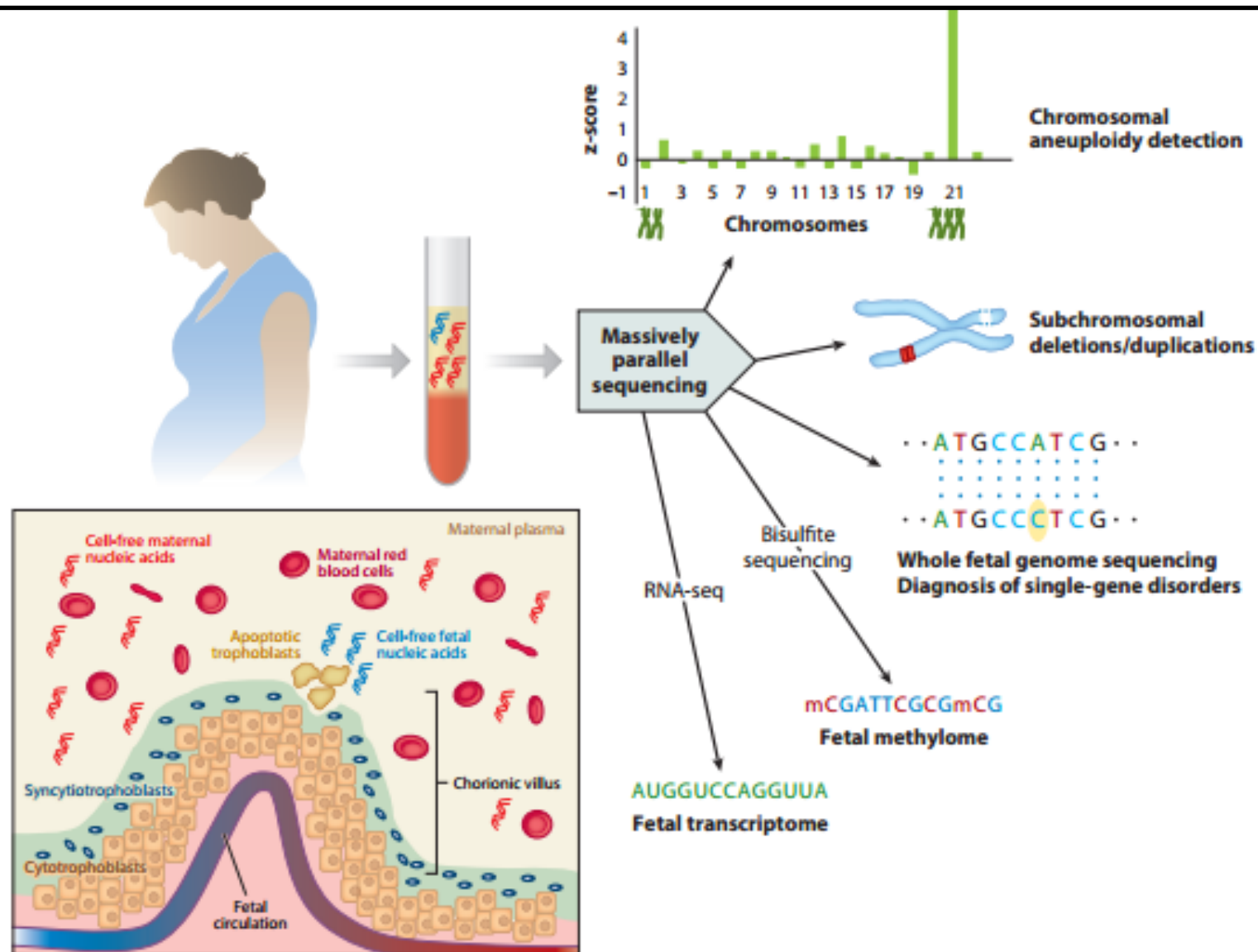


Figure 1

An overview of the currently available applications of MPS-based NIPT. By MPS of cell-free fetal nucleic acids (DNA and RNA) in maternal plasma which likely originate from apoptotic trophoblasts, the fetal genome (from chromosomal to subchromosomal to single-gene levels), methylome and transcriptome may be decoded. Abbreviations: RNA-seq, RNA sequencing; mC, methylated cytosine; MPS, massively parallel sequencing; NIPT, noninvasive prenatal testing; U, uridine; A, adenine; C, cytosine; G, guanosine; T, thymine.

- **Quantitative Targeted MPS:**

T-MPS selektif olarak-tüm kromozomlardan rastgele bölgelerin yerine- spesifik genomik bölgelerin dizilimi ve amplifiye edilmesi ile whole MPSS'den ayrılır. Böylece özellikle analiz edilen okumaların sayısını azaltarak ve verimini artırarak, fetal kromozomal kopya sayısını belirlerken tüm sekanslar faydalı olur. Selektif sekanslama 13,18,21,X,Y gibi klinik önemli kromozomlara odaklı analiz yapar. MPSS tabanlı metodlarla benzer spesifite ve sensitivite oranlarına sahiptir.

Her 2 yöntemde de hala “benchtop “ NGS platformlarında yeteri kadar okuma elde edilebilir fakat yüksek düzeyde verimlilik almak zordur. Whole MPSS yaklaşımına göre büyük platformlarda targeted sekans iyibir alternatif olabilir.

- **Qualitative SNP-based targeted sequencing**

İşin içine genotipik bilginin ilavesi-sıklıkla SNP'ler- daha kompleks bir cff-DNA analizine imkan verir ve fetal kromozomal kopya sayısını tespit için sadece okumaların sayısını hesaba katan NGS metodlara nazaran (counting method) daha fazla bilgi elde edilir. Bu yöntem sekans okumalarına spesifik maternal ve fetal cf-DNA katkısının tespitine olanak sağlayan daha kalitatif yaklaşımlar sunar. İlaveten sayım metodlarını da kullanarak triploidi ve UPD gözden kaçan anomalileride tespit edebilir.

SNP approach Using the Buffy Coat to Sequence Maternal Genotype

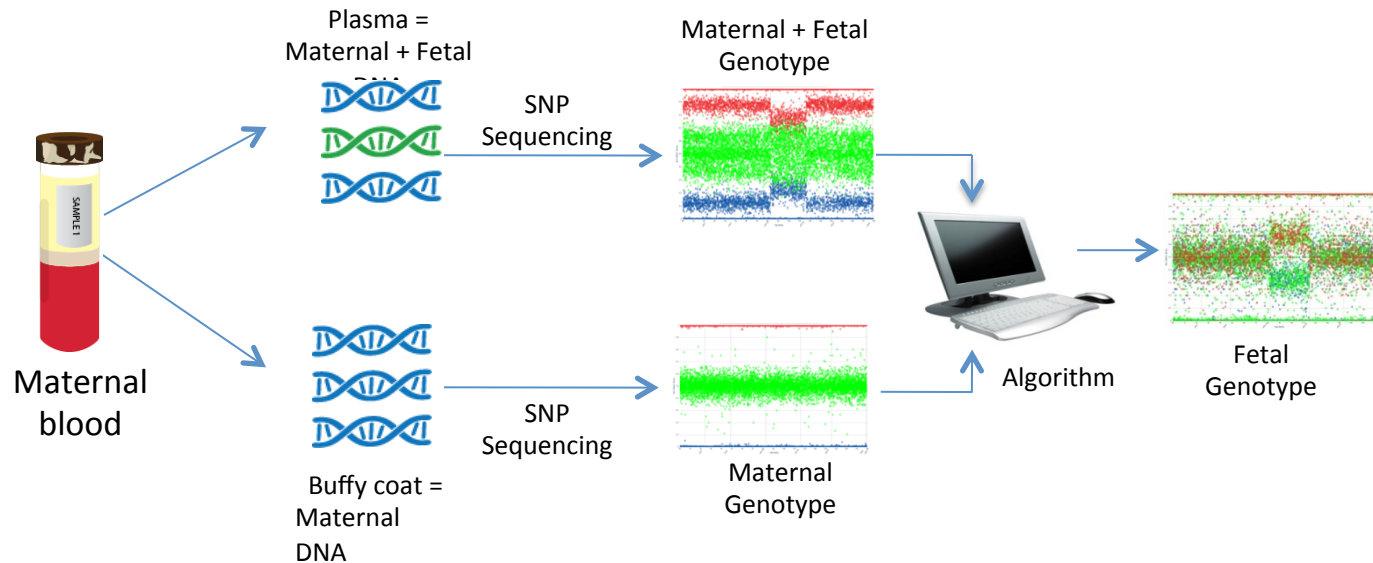


TABLE 2**Comparison of Techniques for Prenatal Diagnosis Using Cell-Free DNA**

Company	Technical Approach	Accuracy of Detection		Depends on Measurement of Specific Loci or Alleles?	Maternal/ Paternal Samples Used?	Study
		Anomaly	Sensitivity (%)	Specificity (%)		
Sequenom Center for Molecular Medicine (San Diego, CA)	MPSS	T21	98.6	99.8	No	Fan HC et al, ⁷² Chiu RW et al, ⁷⁶ Palomaki GE et al, ⁷⁸ Chen EZ et al, ⁷⁹ Ehrich M et al, ⁹⁹ Liao GJ et al, ¹⁰⁰ Palomaki GE et al. ^{73a}
		T18	100	99.7		
		T13	91.7	99.0		
		45,X	—	—		
		47,XXY	—	—		
Verinata Health (Redwood City, CA)	MPSS	T21	100	100	No	Fan and Quake, ⁷⁴ Sehnert AJ et al, ⁸⁴ Bianchi DW et al. ^{77a}
		T18	97.2	99.8		
		T13	78.6	99.4		
		45,X	93.8	99.8		
		47,XXY	—	—		
Ariosa Diagnostics (San Jose, CA)	Targeted sequencing + DANSR + FORTE	T21	100	100	Yes (chromosome 21, 18 and 13)	Sparks AB et al, ⁷⁵ Sparks AB et al, ⁸⁰ Ashoor G et al, ⁸² Ashoor G et al. ⁸⁶
		T18	98	100		
		T13	—	—		
		45,X	—	—		
		47,XXY	—	—		
Natera (San Carlos, CA)	Targeted sequencing + PS	T21	100	100	Yes (SNPs)	Zimmermann B et al, ⁸⁵ Rabinowitz M et al, ⁹¹ Nicolaides et al. ⁹²
		T18	100	100		
		T13	100	100		
		45,X	100	100		
		47,XXY	100	100		

*Prospective study.

DANSR, Digital Analysis of Selected Regions; FORTE, Fetal Fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; PS, Parental Support™ (Natera); SNPs, single nucleotide polymorphisms; T13, trisomy 13; T18, trisomy 18; T21, trisomy 21.

Klinik Pratikte NIPT



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS



Society for
Maternal-Fetal
Medicine

COMMITTEE OPINION

Number 640 • September 2015

(This Committee Opinion Replaces Committee Opinion Number 545)

**Committee on Genetics
Society for Maternal-Fetal Medicine**

This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy

- *The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetisc ve Society of Maternal-Fetal Medicine Publications Committee -2015* tarafından fetal anöploidi riski artmış bulunan kadınlarda tarama seçeneği olarak önerilmiştir. Buna göre bu grupta;
 - 35 yaş ve üstü,
 - USG'de fetal anöploidi riski artışı bulgularına sahip fetuslu olguları olan,
 - Önceki gebeliklerinde trizomili fetus sahibi olan,
 - 21 ve 13. kromozom trizomileri için risk artışı yaratan dengeli robertsonian translokasyon taşıyıcıları,
 - 1.ve2. trimester tarama testlerinde artmış riski olan gebeler bulunur.

- Hangi teknik kullanılırsa kullanılsın tüm testler trizomi 21 ve 18 için yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir. 13 trizomisi ve sex kromozom anomalileri için sensitivitesi daha düşük ,ort. %80-90 civarındadır. Ama spesifikliğı %99'dan fazladır.
- Tüm testlerde sonuç süresi 7-10 gündür.
- Test için **fetal fraksiyon oranı** oldukça önemlidir. Bazı yerlerde fetal fraksiyonun en az%4 olması raporlama için zorunlu iken bazı yerler fetal fraksiyonu ölçmez yada raporlamaz.
- Düşük fetal fraksiyonu olanlarda ve anöploidili fetüs taşıyan obez gebelerde sonuç elde edilemeyebilir.

COMMITTEE OPINION

Table 1. Cell-free DNA Test Performance Characteristics in Patients Who Receive an Interpretable Result*

			Age 25 years	Age 40 years
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	PPV (%)
Trisomy 21	99.3	99.8	33	87
Trisomy 18	97.4	99.8	13	68
Trisomy 13	91.6	99.9	9	57
Sex chromosome aneuploidy	91.0	99.6	--†	--

*Tablo 25-40 y arası kadınlarda 16.gebelik haftasındaki anöploidi prevalansı gözönüne alınarak düzenlenmiştir.

Performance Parameters of Noninvasive Screening Tests for Fetal Trisomy 21

Risk Factor/ Biomarker ^a	GA (wks)	Sensitivity (%)	Screen Positive (%)	Specificity	DR ^b (for a 5% FPR) (%)	FPR ^c (for an 85% DR) (%)	Study
Age ≥ 35 y	—	30	5	1 in 100	30-50	48-55	ACOG, ⁹ Driscoll DA et al, ¹⁰ Haddow JE et al, ¹⁹ Wald NJ et al, ²⁵ Wald NJ et al, ²⁶ Wapner R et al. ²⁸
First trimester risk assessment	11-14	82-87	5	1 in 25	79-90	5-9	ACOG, ⁹ Driscoll DA et al, ¹⁰ Malone FD et al, ²⁰ Nicolaides KH, ²² Spencer K et al, ²⁴ Wald NJ et al, ²⁶ Wapner R et al. ²⁸
Second trimester serum analyte (quad) screen	15-20	80	5	1 in 40	75-85 (only ~ 50% for twins)	5-10	ACOG, ⁹ Driscoll DA et al, ¹⁰ Benn PA et al, ¹⁸ Malone FD et al, ²⁰ Neveux LM et al, ²¹ Wald NJ et al, ²⁶ Wald NJ et al. ²⁷
Integrated screen	11-20	94-97	4-5	1 in 30	90-96	1-5	Driscoll DA et al, ¹⁰ Malone FD et al, ²⁰ Platt LD et al, ²³ Wald NJ et al, ²⁶ Wald NJ et al, ²⁷ Wright D et al, ²⁹ Cuckle H et al, ⁶³ Palomaki GE et al. ⁶⁴
Cell-free DNA — MPSS	> 10	98.6-100	—	97.9-99.8	—	—	Fan HC et al, ⁷² Palomaki GE et al, ⁷³ Fan and Quake, ⁷⁴ Chiu RW et al, ⁷⁶ Bianchi DW et al, ⁷⁷ Palomaki GE et al, ⁷⁸ Chen EZ et al, ⁷⁹ Sehnerl AJ et al, ⁸⁴ Ehrich M et al, ¹⁰⁰ Liao GJ et al. ¹⁰¹
— Targeted sequencing + DANSR + FORTE	> 10	100	—	99.7-100	—	—	Sparks AB et al, ⁷⁵ Sparks AB et al, ⁸⁰ Ashoor G et al. ⁸⁶
— Targeted sequencing + PS	> 9	100	—	99.8-100	—	—	Zimmermann B et al, ⁸⁵ Nicolaides KH et al. ⁹²

Letters to the Editor

Performance of non-invasive prenatal testing when fetal cell-free DNA is absent

Table 1 Non-invasive prenatal test (NIPT) results for two non-pregnant women from five commercial laboratories

<i>Laboratory</i>	<i>Patient 1</i>		<i>Patient 2</i>	
	<i>Test result available</i>	<i>Details</i>	<i>Test result available</i>	<i>Details</i>
Lab A	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation
Lab B	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported as 0.6%)	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported as 0.6%)
Lab C	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 4.3% reported on request)	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 3.9% reported on request)
Lab D	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)
Lab E	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)

cfDNA, cell-free DNA.

Microdelesyon Sendromları;

- Klinik önemi olan microdelesyon/dublikasyonlar gebeliklerdeki tüm yapısal anomalilerin yaklaşık %1.7'sini oluşturmaktadır. Bu sendromların başlıcaları; Prader-Willi-Angelman sendromları, 22q.11 ,1q36 ve 5p delesyon sendromlarıdır.
- Sıklıkla sporadik ve farklı genetik mekanizmalara bağlıdırlar. Değişik çalışmalarda, bu sendromların cf-DNA bazlı metotlarla taranmasının henüz geçerlilik kazanmadığı, doğrulanmadığı belirtilmiştir ve bu testlerin spesifikliğı ve sensitifliğı şüpheli bulunmuştur. Bazı çalışmalarda ise SNP bazlı NIPT yöntemi ile bu 5 duruma sebep olan delesyonları tespit oranı %97 , testin spesifikliğinin ise %99'dan fazla olduğu belirtilmiştir.*

- *"SNP-based noninvasive prenatal microdeletion screening is highly accurate. Because clinically relevant microdeletions and duplications occur in >1% of pregnancies, regardless of maternal age, noninvasive screening for the general pregnant population should be considered."*
- Wapner R J, Babiarez JE, Levy B, Stosic M, Zimmermann B, Sigurjonsson S, Wayham N, Ryan A, Banjevic M, Lacroute P, Hu J, Hall MP, Demko Z, Siddiqui A, Rabinowitz M, Gross SJ, Hill M, Benn P.
Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes.
Am J Obstet Gynecol 2014; 212: 332.e1–332.e9.

Kısacası microdelesyon sendromları için henüz rutin uygulama için tam bir fikir birliği oluşmamıştır.

Multiple Gestations

- Yöntemin ne olduğunun önemi olmadan multipl gebeliklerde anöploidi taraması önerilmemektedir.. Maternal örnekleri (serum veya DNA'yı) baz alan herhangi bir metod fetüsler arasında diferansiyel bir riski ayırt etmeksizin gebeliklerin hepsi için tek bir sonuç verir. İkiz gebeliklerde cf-DNA taraması ile ilgili bilgiler sınırlıdır.
- Ön bilgiler bu tür gebeliklerde cf-DNA taramalarının hassas olduğunu göstermekle birlikte, bu taramaların tavsiye edilebilmesi için daha fazla prospektif çalışmaya ve yayınlanmış bilgilere ihtiyaç vardır.

Tek gen hastalıkları

- Paternal kalıtılan monogenik özelliklerin tespiti fetal sex ve Rh genotiplendirme tespitine benzer, ikiside fetüse spesifik özellikler arar.
- Metodun makul bir tanı alt limitine sahip olması ve fetal fraksiyonun kabul edilemez bir şekilde düşük olmaması şartıyla maternal plazmada O.D hastalıklar için de novo mutasyonlar veya paternal kalıtmalı mutasyonların varlığı ya da yokluğu, fetusun etkilenip etkilenmediğini gösterir. Benzer şekilde O.R durumlarda cf-DNA testi ile paternal mutasyonun yokluğu etkilenmiş fetüs olasılığını dışlar.
- Böyle bir yaklaşımın kullanıldığı O.D hastalıklara örnek Huntington hastalığı, Myotonik distrofi, erken başlangıçlı primer distoni 1'dir.

- Tanatotrofik displazi veya akondroplazinin kesin için fetal usg'de iskelette displazik özelliklerin görüldüğü kadınlarda FGFR3 mut.ları için cf-DNA testi önerilebilir. Son zamanlarda T-MPS platformu her 2 durumun tanısında PCR bazlı yöntemden daha yüksek sensitivite ile uygulanmaktadır. Ek olarak MPS bir veya sınırlı sayıda alanı hedefleyen PCR bazlı metodlardan farklı olarak multiple gen bölgesindeki potansiyel patojenik mutasyonlar içinde tarama sağlar.

- Aşağıdaki durumlarda tanıda NIPT uygulaması daha zor olabilir.
 - Erkek fetüs ve anne X'e bağlı durum için taşıyıcı, bu durumda fetusun etkilenip etkilenmediğinin tespiti gerekir.
 - Ebeveynlerin O.R durumlar için taşıyıcı olduğu biliniyorsa tespit gerekir.
 - Plazmada O.R hastalık için paternal bir mutasyon bulundu, fetüs etkilenmiş? veya taşıyıcı? tespit etmek gerekir.

- Maternal plazmada zeminde maternal orjinli mutant aleller, fetal orjinli mutant alellere çoğunlukla sayıca üstündür. Bu nedenle fetusta mutant alel olup olmadığını ayırt etmek güçleşir. Yapılan bir çalışma ile talasemide NIPT uygulamak için “relative mutation dosage”(RMD) isimli dijital PCR tabanlı bir yaklaşımı kullanarak wild type ve mutant alellerin pozitif reaksiyon sayısı analiz edildi, anne heterozigot taşıyıcı ve fetus homozigot etkilenmiş bir gebelikte bulunan mutant yükteki hafif artışı tespit edebildi. Aynı yöntemle orak hücreli anemi ve hemofili hastalıklarında da NIPT’te dijital PCR-RMD analizinin uygunluğu gösterilmiştir. Bu metod, fetal fraksiyonun doğru tespitine dayanır, düşük durumlarda yanlış negatif sonuçlara neden olur.

NIPT'ın Diğer Uygulamaları

- **Fetal Rhesus D Tespiti**
- Rhesus D antijeni RHD geni proteini ürünüdür. Eğer genomda en az bir kopya RHD varsa kişi rhesus D +'dir.
Rh – annenin Rh + fetuse gebe olması durumunda rhesus uyumsuzluğundan bahsedilir. Anne daha önceden anti Rh D ab'leri ile sensitize olduğundan dolayı bu antikorlar plasentayı geçer ve fetuse zarar verir. Rh- annenin genomu RHD geni içermez, maternal plazmada RHD tespit edilirse bu dizilerin fetuse ait olması muhtemeldir.
Fetal RhD durum değerlendirmesi cf-DNA 'nın keşfinden hemen sonra başlatılmıştır.

- **Fetal Cinsiyet**

Maternal plazmada Y kromozomdan DNA sekansı +'liğı erkek fetüs varlığını destekler.Bu durum cinsiyet tespiti için kullanılır. Ancak 7.haftadan önceki değerdendirmelerin güvenilirliğı azdır. Real time qPCR ile konvansiyonel PCR'den daha iyi sonuçlar elde edilir.

Annenin X'e bağılı geçen hastalıklarda taşıyıcı olması durumlarında veya ebeveynlerin CAH gibi taşıyıcı olduğı durumlarda seçenek olarak sunulabilir.

Anne DMD taşıyıcısı ise cinsiyet tayini için NIPT yapılabilir.Eğer fetus erkek ise invaziv test diagnostik testler yapılmalıdır. Aynı durum hemofili hastalığında da geçerlidir.

CAH cinsiyet tayininin kullanıldığı durumlardandır.21 OH eksikliği en sık formdur ve kız fetüste aşırı androjen üretimi virilizasyona neden olur.Erken gebelikte steroid uygulaması ile bu engellenebilir. Erkek fetüse bu gerekmez.

Table 1. Diseases that may be detected noninvasively using cell-free fetal-omics

Disease	Refs
Chromosomal aneuploidy	
Trisomy 21	[8–10,14,22,23,26–31,45]
Trisomy 20	[36]
Trisomy 18	[9,10,22,25–31]
Trisomy 13	[10,22,28]
Turner syndrome (45,X)	[10,22,28,64,65]
Klinefelter syndrome (47,XXY)	[10,28,64,65]
47,XYY syndrome	[28,64,65]
Triple X syndrome (47.XXX)	[28,64,65]
Triploidy (3N)	[22]
Subchromosomal aberration	
22q11.2 deletion syndrome	[11,35]
DiGeorge syndrome	[35,37,39]
Prader–Willi syndrome	[37]
Angelman syndrome	[37]
1p36 deletion syndrome	[37]
Cri-du-chat syndrome	[37]
Wolf–Hirschhorn syndrome	[37]
22q11.2 duplication syndrome	[11,36]
<i>De novo</i> 22q11.2 deletion syndrome	[11]
<i>De novo</i> 22q11.2 microduplication	[11]
Translocation	[11,36]
Microdeletion	[11,34,36]
Microduplication	[11,36]
Monogenic diseases	
β-Thalassemia	[12,38]
Congenital adrenal hyperplasia	[13,44]

Noninvasive Fetal Genomic, Methylomic, And Transcriptomic Analyses Using Maternal Plasma And Clinical Implications

Ada I.C. Wong And Y.M. Dennis Lo

Trends Mol Med 2015 Feb;21(2):98-108. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.006. Epub

2015 Jan 21.

ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy

Anthony R. Gregg, MD¹, S.J. Gross, MD², R.G. Best, PhD³, K.G. Monaghan, PhD⁴, K. Bajaj, MD², B.G. Skotko, MD⁵, B.H. Thompson, MD⁶ and M.S. Watson, PhD⁶; are The Noninvasive Prenatal Screening Work Group of the American College of Medical Genetics and Genomics

- **Kısıtlamalar**

- Risk değerlendirmeleri spesifik durumlar için yapılır (13,18,21). Sadece bu durumların taramalarında AS'de tespit edilebilecek anöploidilerin %50'si yakalanamayacaktır.(≥ 35 y %75'i, < 35 y %43'ü)
- Dengesiz tr.lar ,del./dub.lar NIPT ile taranamazlar.Bu nedenle fetal anomali tespit edildiğinde sitogenetik testler, microarray analizleri NIPT'ten daha iyi test seçenekleridir.
- Anöploidilerin spesifik formlarını ayırt edemez.DS robertsonian tr.lu extra bir 21 ile oluşmuşsa ve yüksek bir mozaiklik varsa tespit edemez.Bu durumda kromozom analizi önerilir.
- Tek gen hastalıkları?

- Başarısızlık durumunda tanı gecikebilir.
- Açık NTD'de tarama amaçlı kullanılamaz.
- 1.trimester USG uygulamalarının yerini alamaz.
- Multiple gebeliklerde bilgiler sınırlıdır.
- Geç gebelik komplik. ile ilgili bilgi veremez.
- Tarama testlerin de yüksek risk grupları için NIPT önerilebilir, düşük risk gruplarında hem performansı düşüktür hem de cost-effective değildir.
- Mozaisizm(plasenta ile sınırlı veya maternal), teorik olarak "vanishing twin" durumları yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir.

- Özetle;
- Doğru ve noninvaziv şekilde kromozomal anöploidi taramaları yapılabilir,
- Hala tarama testi niteliğindedir, henüz invaziv testlerin yerini alamamıştır,
- Sensitivite ve spesifiteleri çok yüksek, FPR oranları düşüktür,
- Daha az vaka atlanır ve kesin tanı için invaziv işlem sayısı azaltılır, kayıplar ve anne için istenmeyen olaylar en aza indirilir.
- Subkromozal del/dub için genişletilebilir. Ancak daha fazla klinik doğrulama çalışmasına ihtiyaç vardır,
- Bazı tek gen hastalıklarında digital PCR/MPSS bazlı yöntemler uygulanabilir,

TEŞEKKÜR
EDERİM.....

- Fetus -
mozaik
Plasenta ve
CVS - normal
- Yanlış negatif ~1:3000

