



Maternal - Fetal Tıp ve Perinatoloji Derneği
Türkiye
23-06-1998



TÜRKİYE MATERNAL FETAL TIP VE PERİNATOLOJİ DERNEĞİ
FETAL TIP VE PRENATAL TANI
SUBGRUP TOPLANTISI
10-11 HAZİRAN 2016 WYNDHAM HOTEL / ANKARA

*Prof. Dr.
Oktay Kadayıfçı
Anısına...*

Prenatal Tanıda Hangi Yöntem? Ne Zaman ?

Prof. Dr. Seher Başaran
İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD

Prenatal tanıda amaç

Fetustaki olası , genetik veya nongenetik nedenlerin yol açtığı, tedavisi olanaksız ciddi hastalık ve malformasyonların;

- * gebeliğin mümkün olduğunca en erken döneminde,
- * en doğru ve en fazla bilgiye,
- * mümkün olan en hızlı yolla ulaşmaktır.

Kime invaziv "**girişim - tanı**" uygulanır?

KAR

Hastalık riski



ZARAR

İnvaziv girişim riski

Kime ve Ne zaman "Girişim=Tanı"

2 temel özellik gerekiyor;

- ❖ Gebelikte fetus için topluma göre ve invaziv girişimin fetal kaybından daha fazla "**hastalık riski**" olmalı,
- ❖ Bu risk için bir "**laboratuvar testi**" olmalı

A) Tek gen hastalıkları

Moleküler genetik analizler

Biokimyasal testler (enzim vd.)

Histopatolojik testler

USG

B) Kromozomal hastalıklar (anomaliler)

Fetal kromozom analizleri (karyotip)

Moleküler sitogenetik,

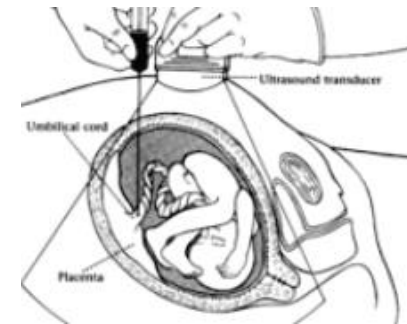
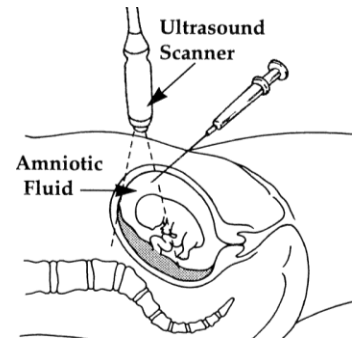
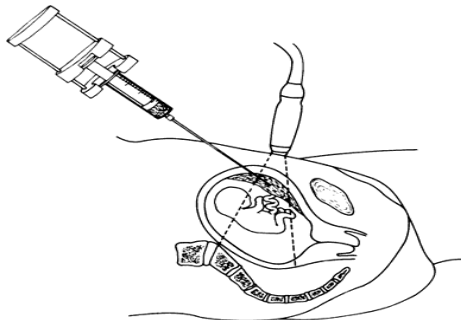
Moleküler genetik testler

Yöntem Seçiminde Etkin Kriterler

- Fetusun hastalık riski %?
- Başvurudaki gebelik haftası
- Hastalık tanısı için uygun doku
- Genetik danışma sonrasında ailenin tercihi
- Plasentanın lokalizasyonu
- Tercih edilen girişimin uygulanabilirliği

3 invaziv girişimin karşılaştırması

Temel Özellikler	CVS	AS	KS
Girişim zamanı	10. GH → term	15.- 24. GH	> 19. GH
Dokunun kökeni	extraembriyonal	fetal	fetal
Tüm testler için uygunluğu	Bazı testler yapılamaz (AFP, I-Cell hast., vd)	uygun	Bazı testler yapılamaz
Fetal kayba neden olma olasılığı	Şimdiye kadar %1-2 2015 (Akolekar et al.) 1:500	Şimdiye kadar 1:200 2015 (Akolekar et al.) 1:1000	% 1-5 (deneyim+ fetusta anomali+)



Tek gen hastalıkları için prenatal tanı

- Ailede bilinen bir tek gen hastalığı için risk olmalı (OD, OR, X e bağlı R, D),
- Bu hastalıkla ilişkili gen/mutasyon bilinmeli,
- USG bulguları özgün, bilinen bir tek gen hastalığını işaret etmeli (Akondroplazi, Kistik fibroz, vd)
- Genetik etiyojisi bilinmeyen olgularda Tüm Exom Dizileme (WES) ?

RISK %25→%50

En erken, en hızlı tanı → CVS

Dengesiz Kromozom Anomalileri İçin ARTMIŞ RİSK Taşıyan Gebelikler



- İleri anne yaşı (35 yaş 1:200 → 45 yaş YD % 5,3, AS % 8,3, CVS% 14,3)
- Kromozom anomalili çocuk (trizomi ve de novo yapısal ano.) (%1,4)
- Dengeli/Dengesiz kromozom anomalili ebeveyn (%5-50 hatta %100)
- Fetal ultrasonografide anomali saptanması (%1-%70)
- ICSI gebelikler/Kötü obstetrik öykülü çiftler (parental? %1,5 → %13,5)
- MS-Tarama Testlerinde artmış risk saptanması
(ÜT %1,9-21,7; 1.TTT %5-38,8; ÜT+1.TTT %11-50)
- MS cf-DNA testinde artmış risk çıkan gebelikler (%92)

Kromozom Anomalilerinin Tanısında Kullanılan Teknikler

- **Karyotip analizi;**
 - CV dokusunun sitotrofoblastlar hücrelerinden "direkt preparasyon" ile elde edilen metafazlarda
 - "Hücre kültürü" ile metafazlarda
- **I-FISH/FISH**-Amniotik sıvı hücrelerinde
- **QF-PCR**-Amniotik sıvı hücrelerinde
- **Mikroarray/a-CGH**- Tüm örneklerde

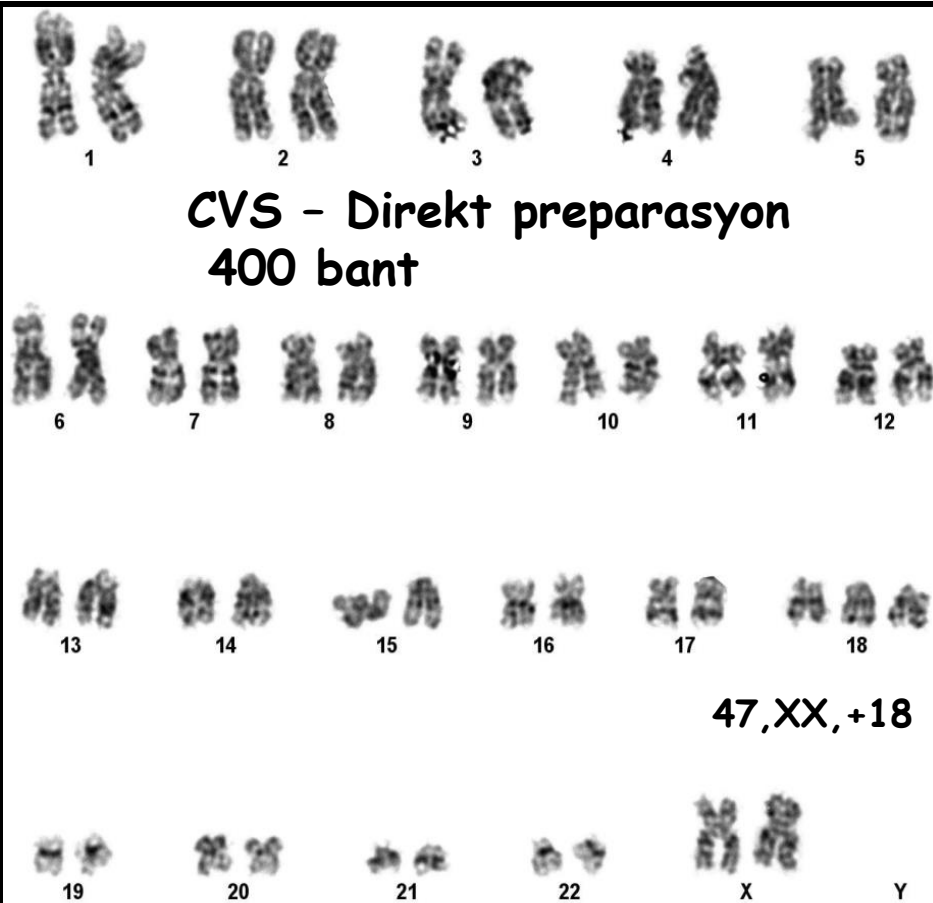
Fetal Kromozom Anomalilerinin Araştırılmasında Kullanılan Tekniklerin Karşılaştırılması

Temel Özellikler	GOLD STANDART HK ve HRBT	CVS - DP	AS- I-FISH	AS- QF- PCR	Mikroarray/ A-CGH
Gerekli Materyal Miktarı	>10 ml ASıvı >8-10 mg CV 1-2 ml FKan	>5 mg	2-3 ml ASıvı	2-3 ml ASıvı	5 mg CV >10 ml ASıvı 1 ml FKan
Hücre bölünmesi	gerekli	gerekli	gerekmez	gerekmez	gerekmez
Otomasyon	yok	yok	kısmen	var	var
Test süresi	2-3 hafta FK 2-4 gün	6-24 saat	8-24 saat	8-48 saat	4-5 gün
Tanı kapasitesi	Tüm kromozomlar (>8 Mb)	Tüm kromozomlar (>12 Mb)	Sık görülen 5 anöploidi +hedefe yönelik trizomi+ Mikrodel. S.	"sık görülen 5 anöploidi"	Tüm genom (>100 Kb, çözünürlük kite bağlı)
Başarı oranı	min %99	min %95	min %99	min %99	min %99

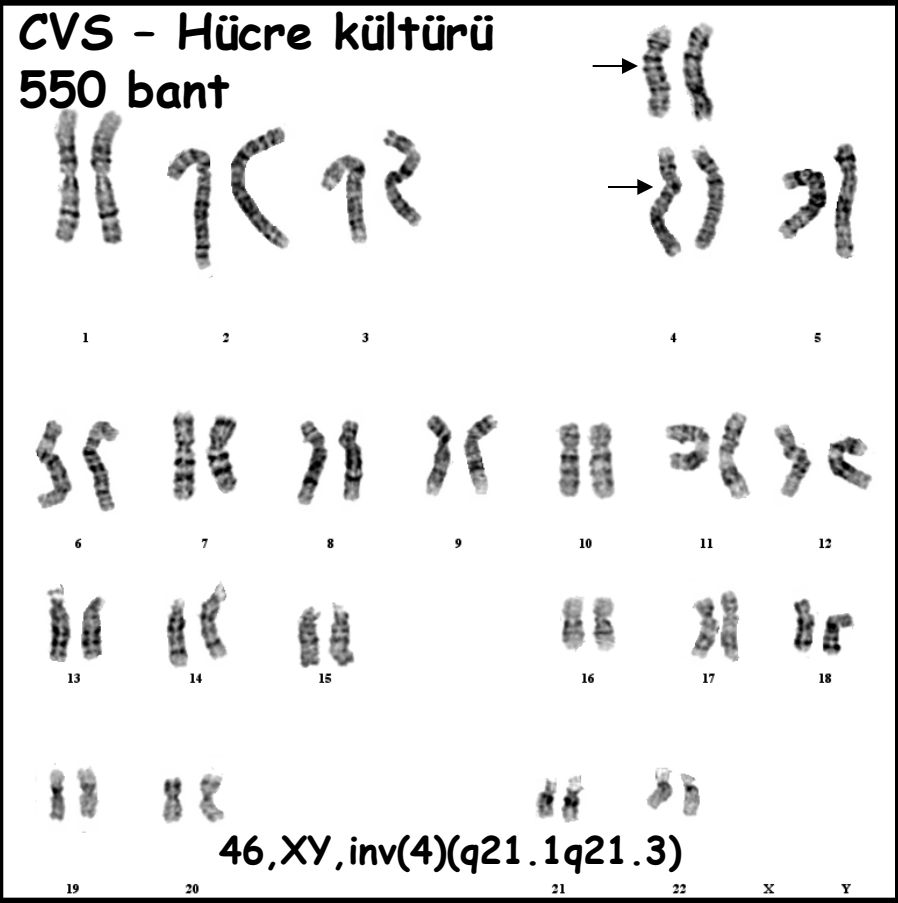
Kromozom Analizleri

Koriyon villus direkt preparasyon ve hücre kültür sonuçlarının karşılaştırılması

CVS - Direkt preparasyon
400 bant



CVS - Hücre kültürü
550 bant



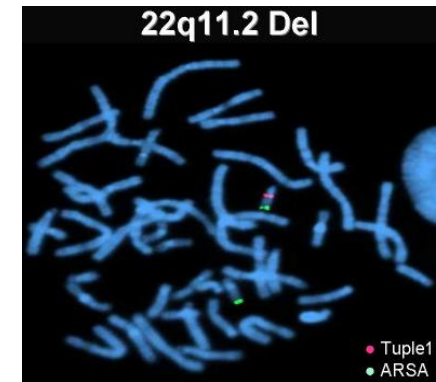
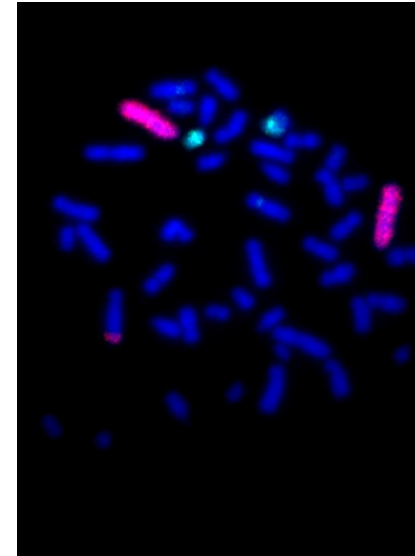
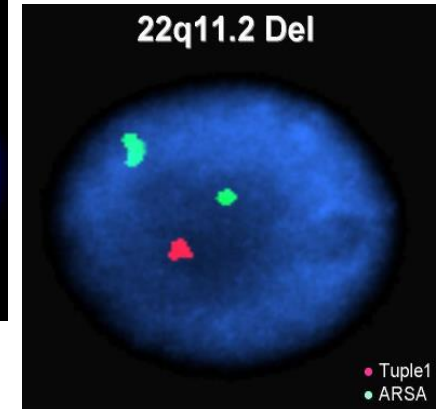
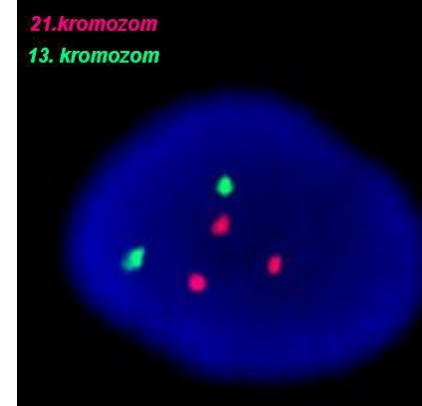
FISH (Floresan in situ hibridizasyon)

İnterfazda;

- ❖ Sık görülen sayısal kromozom anomalilerinin (13, 18, 21, X ve Y) hızlı tanı ve konfirmasyonunda,
- ❖ Bilinen mikrodelesyon send. tanısında
- ❖ Mozaisizm araştırmasında.

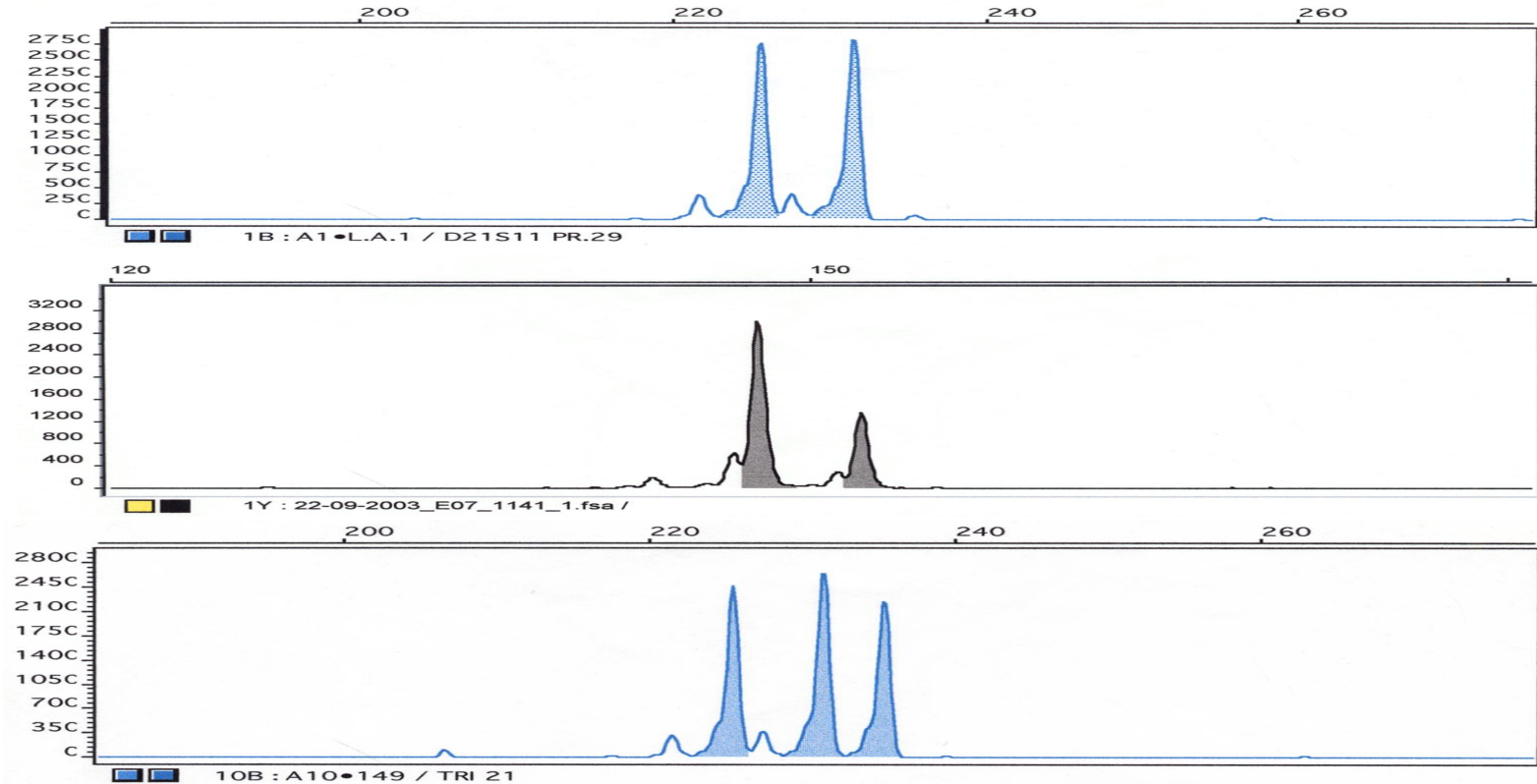
Metafazda;

Yapısal kromozom anomalilerinin aydınlatılması



QF-PCR (Quantitative Fluorescent-PCR)

Sık görülen anöploidilerin (21, 18, 13, X ve Y anöploidileri ile triploidi) hızlı tanısına yönelik STR markerları ile DNA teknolojisi kullanılarak dozaj analizi esasına dayanır.



I-FISH ve QF-PCR Karyotip analizinin alternatifi mi?

Cevap; Hızlı tanı için "evet" fakat tam karyotip analizine ek olarak yapılmalı

Human Reproduction Update, Vol.10, No.6 pp.541-548, 2004

doi:10.1093/humupd/dmh006

The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration

Umberto Nicolini^{1,3}, Faustina Lalatta¹, Federica Natacci¹, Cristina Curcio¹ and The-Hung Bui²

¹Department of Obstetrics and Gynaecology and Medical Genetics, Ospedale V Buzzi, University of Milano, Milano, Italy and ²Karolinska Institutet, Department of Molecular Medicine, Clinical Genetics Unit, Karolinska University Hospital Solna, SE-17176 Stockholm, Sweden

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: umberto.nicolini@unimi.it

Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) has recently entered the field of prenatal diagnosis to overcome the need to culture fetal cells, hence to allow rapid diagnosis of some selected chromosomal anomalies. We reviewed the studies on the accuracy of QF-PCR in detecting chromosomal anomalies at prenatal diagnosis. Overall, 22 504 samples have been analysed. The detection rate of aneuploidies of the selected chromosomes (13, 18 and 21, and X and Y) was 98.6% (95% confidence interval 97.8–99.3). QF-PCR might play a major role and be considered a valid alternative to the full karyotype. Being less expensive, and almost entirely automated, more women could undergo invasive prenatal diagnosis without significant increase in health expenditure. By using QF-PCR as a stand-alone test, the chances of non diagnosing the commonest, and the only chromosome anomalies which do increase in frequency with maternal age, are approximately one in 150 abnormal karyotypes, or one in 10–30 000 samples, based on the age distribution. These error rates might be deemed acceptable, although most structural chromosomal anomalies will be missed. At present, women are rarely informed about the full spectrum of the conditions which might be diagnosed via amniocentesis or chorionic villous sampling. Some of these anomalies might be acceptable, in view of their limited or uncertain clinical relevance, and decision analysis might, in the majority of cases, confine the full karyotype to selected women who have specific indications.

Key words: cytogenetics/Down's syndrome/genetic counselling/prenatal diagnosis/QF-PCR

CMGS Best Practice Guidelines for QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy

Guidelines formulated by: Kathy Mann, Caroline Ogilvie, Celia Donaghue, Roger Mountford, Ciaran Mcanulty, Jon Warner, Nicola Dunlop, Lisa Levett, Carol Hardy, Cathy McConnell, Jane Diack, Fiona McKay

Web version edited by Graham Taylor

Last update : 17/03/2005

Introduction

The use of QF-PCR analysis of short tandem repeats (STR) for the detection of aneuploidy was first reported by Mansfield, 1993. It has since been validated and successfully applied for the rapid diagnosis of prenatal aneuploidy by a number of UK and European labs (Verma et al. 1998; Pertl et al. 1999; Schmidt et al. 2000; Cirigliano et al. 2001; Levett et al. 2001; Mann et al. 2001; Mann et al. 2004). The rapid result is issued to clinicians and is followed by full karyotype analysis in all cases where cultured cells are available.

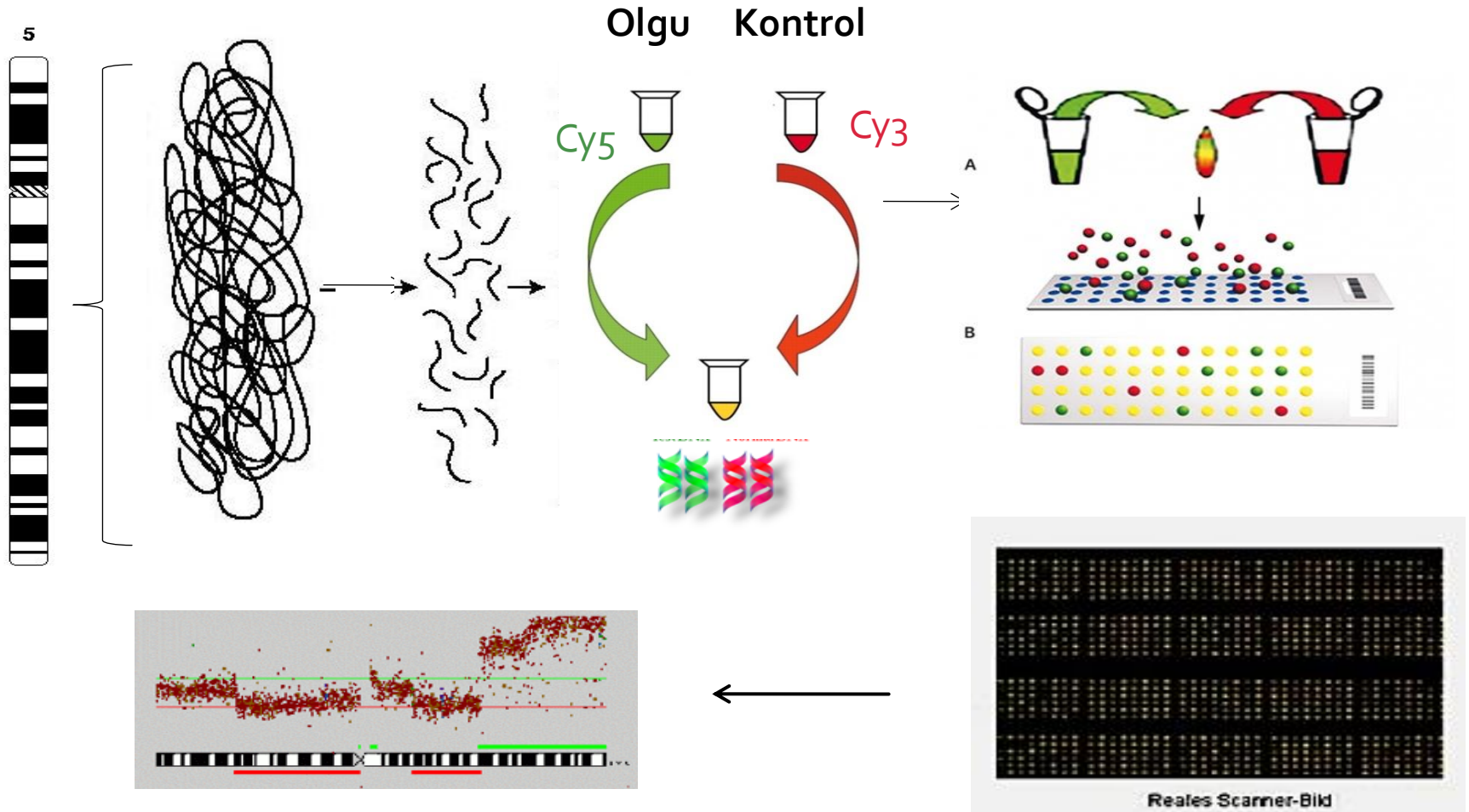
An ACC/CMGS best practice meeting was held on the 15th April, 2004, at Guy's Hospital to discuss and formulate best practice guidelines for rapid diagnosis of aneuploidy using a QF-PCR approach. A questionnaire was sent to all participating labs and the collated data was discussed with a view to agreeing minimal standards for best practice. At this time 8 labs in the UK were offering a rapid diagnostic aneuploidy service using a QF-PCR-based approach and 4 labs were planning to offer a service within 18 months. These guidelines were drawn up by representatives from those labs offering a service at the time of the meeting.

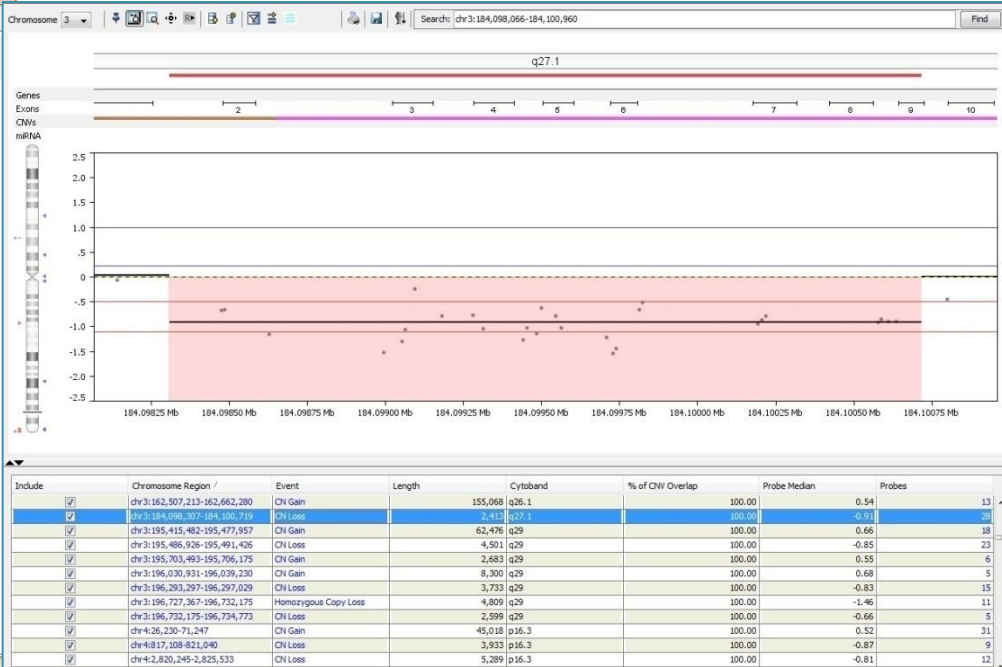
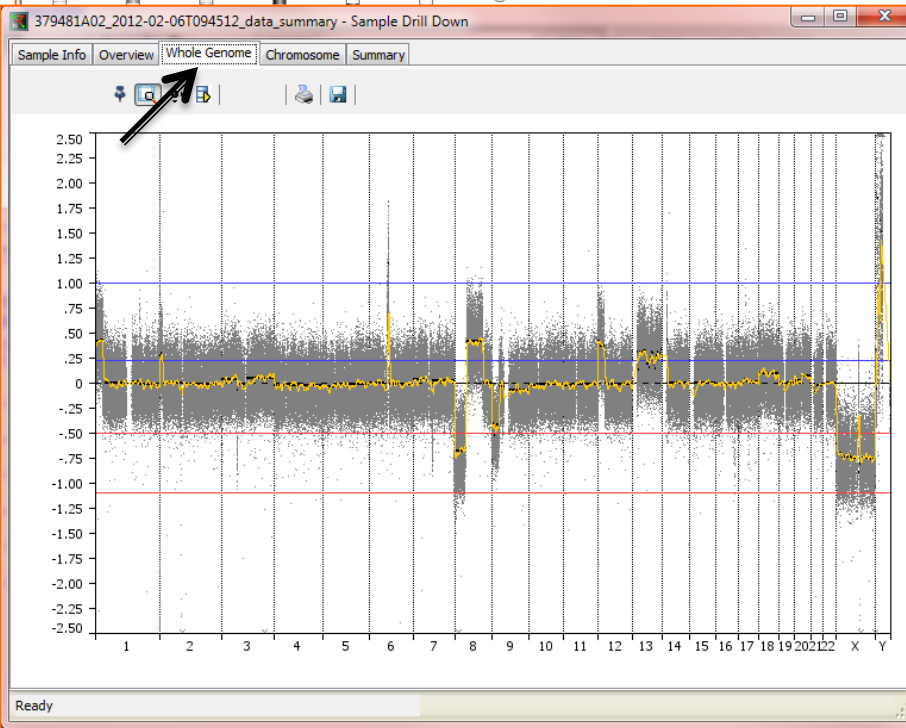
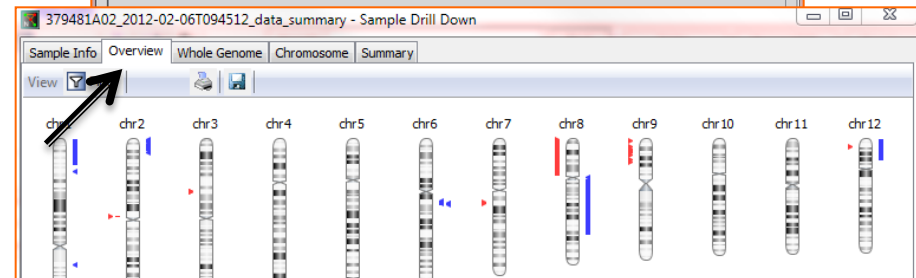
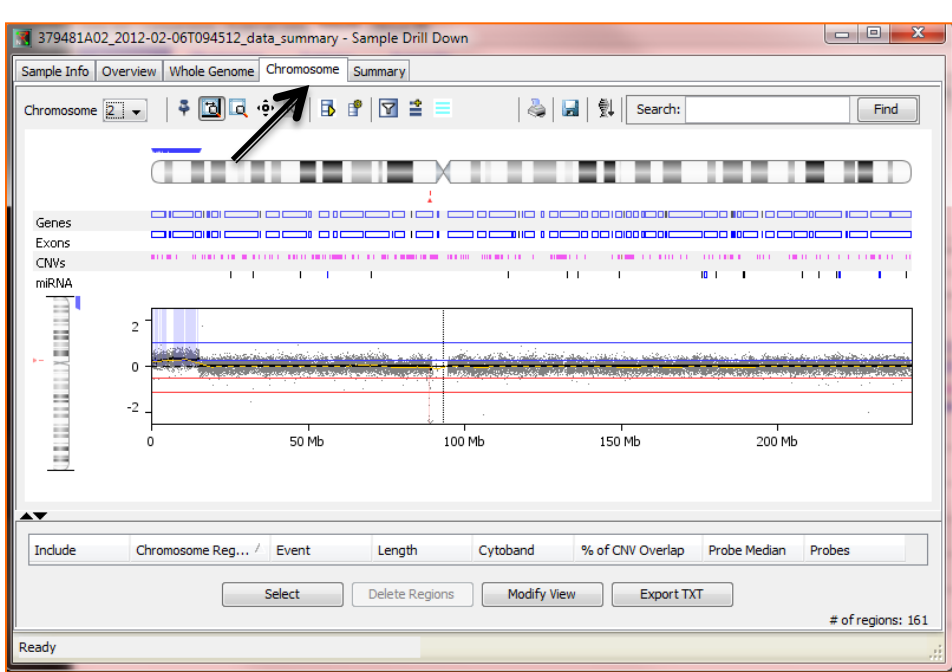
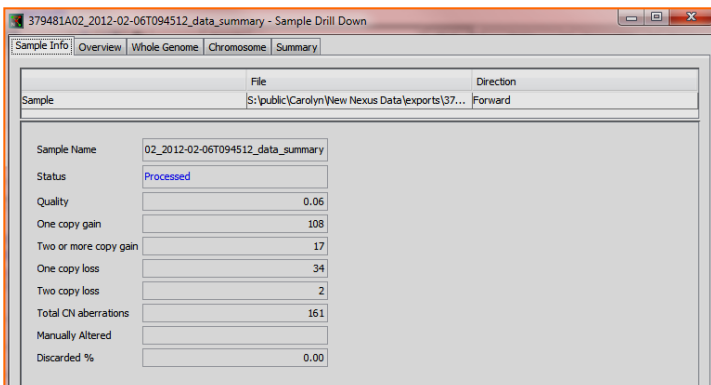
Each guideline is described as either:

İ.Ü. PRETAM ve PREMED Fetal Kromozom Analiz Sonuçları (1989-2004)

- 18810 fetus 862 majör kromozom anomalisi %4.58
- 5'li FISH/QF-PCR ile saptanabilecek anomali oranı 584 (~%68)
- 5'li FISH/QF-PCR ile saptanamayacak anomali oranı 278 (~%32)
- *Lewin ve ark. 2000 , FISH ile saptanamayacak anomali oranı %25,4*
- Bizim serimizde yapısal anomali oranı Avrupa serilerine göre daha yüksek (%1,1 vs ~%0,4)

Moleküler Karyotipler





İnsandaki Genetik Varyasyonlar

Mikroarray ve a-CGH teknikleri

Genomda ~ 300 bp de bir nükleotid polimorfiktir.
Halen ~85 milyon SNP tanımlanmıştır.
Genelde iki formda olur (A ya da G; C yada T gibi).

Single nucleotide variant

ATTGGCCTTAACCCCGATTATCAGGAT
ATTGGCCTTAACCTCCGATTATCAGGAT

Referans genomla kıyaslandığında, farklı sayıda bulunan, boyutu 1 kb veya daha fazla olan DNA segmentlerine Kopya Sayısı Varyasyonu (CNV) denir.

Copy number variant

ATTGGCCTTAGGCCTTAACCCCGATTATCAGGAT
ATTGGCCTTA-----ACCTCCGATTATCAGGAT

Mikroarray testlerinde çözünürlük farkları;
60 K= 60 000 prob
180 K= 180 000 prob (23. SNP+157. CNV)
750 K= 750 000 prob (200. SNP+550. CNV)
HD array= 1 600 000 prob

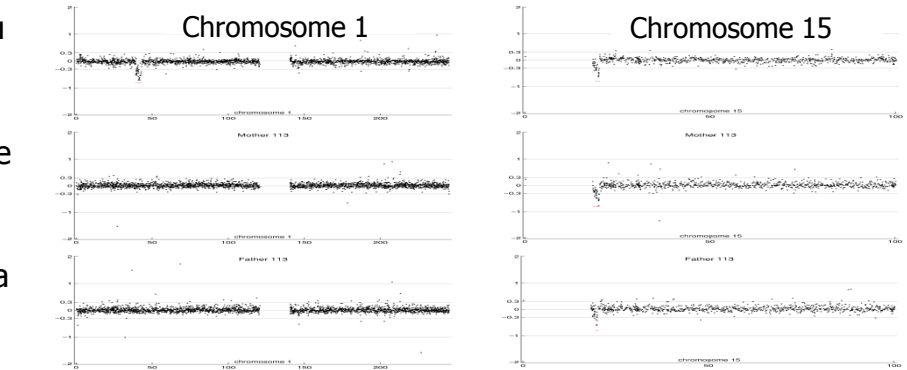
Olgu

Chromosome 1

Chromosome 15

Anne

Baba

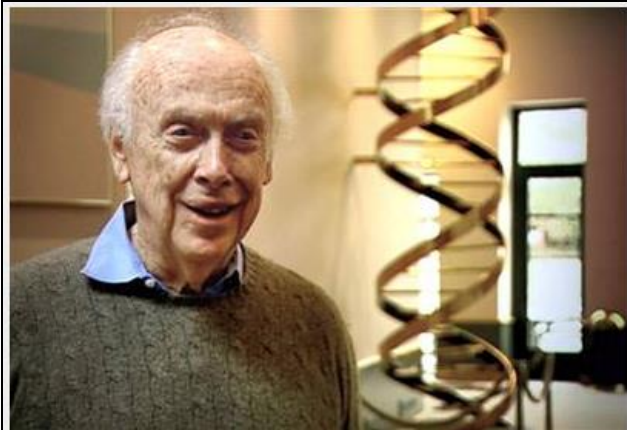


Patolojik mi zararsız mı (polimorfizm)?

1000 Genom projesi (Nature-2015)

Genomumuzun Varyasyonlarla Dolu Olduğunu Gösterdi

- 2008 yılında başlayan 1000 genom projesi
- 26 farklı topluluğa ait 2504 bireyin genom, ekzom, array bilgilerini derledi
- **Amacı:**
 - Halka açık DNA polimorfizm veri bankası oluşturmak
- **Sonuçlar:**
- **88 milyon varyant**
 - 84.7 milyon SNP, 3,6 milyon **küçük** indel ve 60.000 yapısal varyant
 - **250-300/birey fonksiyon kaybı mutasyonu**
 - **50-100/birey bilinen bir kalıtsal hastalık ilişkili mutasyon**
 - **35-49/bireyde de novo germline mutasyon**
- Polimorfizmler ve sıklıklar coğrafi farklılık gösteriyor



James D. Watson

2008 de genom dizisini yayınladı.

- 2.72 milyon bilinen SNP
- 0.16 milyon tanımlanmamış varyasyon
- 23 Kopya Sayı Varyasyonları
- 26 hastalık ilişkili mutasyon (retinitis pigmentosa, konjenital nefrotik sendrom, vs..).

Prenatal tanıda mikroarray sonuçları-1

Wapner R, ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays)

2012 Mikroarray Çalışma Sonuçları;

- 4391 olgudan 51 olguda array sonuçsuz, başarı **%98,8**
- 4282 nonmozaik karyotip ve 58 mozaik karyotip

Anomaliler	Kromozom n	Array tanıyabilir	Array tanıyamaz	İÜ,İTF+ PREMED CVS n:2453	İÜ,İTF+ PREMED AS n:22813
Anöplöidiler (tri 21,18,13,X,Y ve 45,X)	374	374	0	386	889
Diğer anomaliler	82	24	58 (%1.4)	71 (%2.9)	234 (%1)
Dengeli yapısal	40	0	40		
Dengesiz yapısal	22	22	0		
Marker kromozom	3	2	1 Heterokro.		
Triploidi	17	0	17 (7 si SNP array ile tanınabilirdi)		

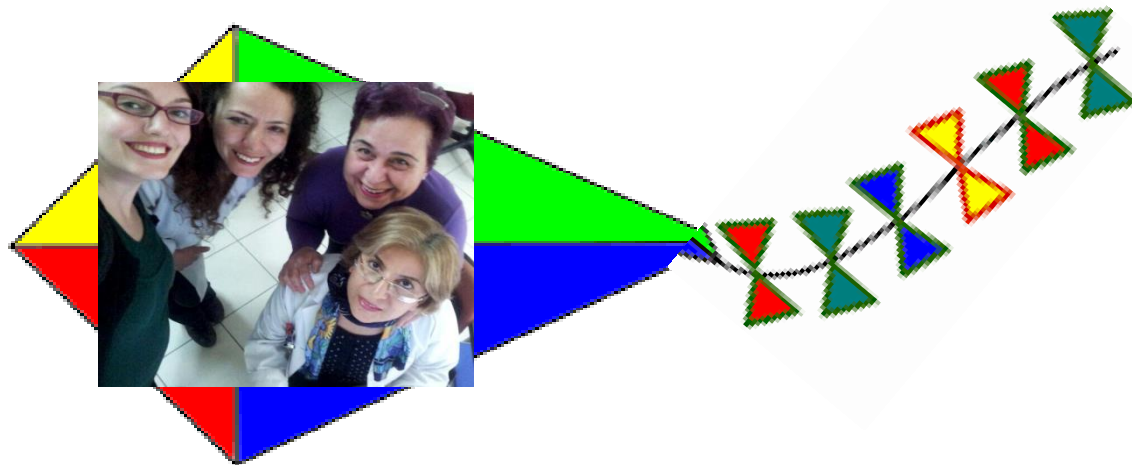
Prenatal tanıda mikroarray sonuçları-2

Schaffer LG, et al, 2012;Prenat Diagn, 32, 1-10

USG bulgusu	toplam	Array-normal	Array-patolojik	Array-şüpheli
Çoklu sistem anomalileri	579	492 (%85)	58 (%10)	29 (%5)
Çoklu sistem + yapısal olmayan anomaliler	229	196 (85.6)	19 (%8.3)	14 (%6.1)
Tek sistem anomalileri	1519	1370 (%90.2)	81 (%5.3)	68 (%4.5)
Tek sistem + yapısal olmayan anomaliler	254	220 (%86.6)	18(%7.1)	16 (%6.3)
İzole poli/oligohidramnios	9	6 (%66.7)	1 (%11.1)	2 (%22.2)
İzole IUGG	76	74 (%97.4)	2(%2.6)	0
Tek soft marker	59	55 (%93.2)	2(%3.4)	2(%3.4)
Çoklu soft marker	18	17 (%94.4)	0	1(%5.6)
Toplam	2858	2534 (%88.7)	186 (%6.5)	138 (%4.8)

İÜ, İTF, Tıbbi Genetik AD, a-CGH sonuçları-3

- Prenatal Uygulamalar n: 625
 - Array başarılı n: 620 (%99,2)
 - Kromozom Normal-Array Normal n: 539
 - Kromozom Normal-Array Abnormal n: 33 (8 i ailevi polimorfik)
 - Patolojik arr n:25 arr ano %4.4
 - Kromozom Abnormal-Array Abnormal n: 19
 - Kromozom Abnormal-Array Normal n: 29



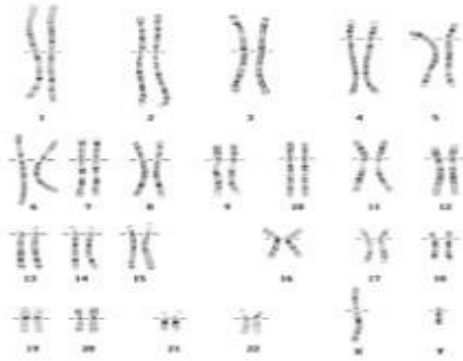
Prenatal tanıda mikroarray/a-CGH ve endikasyonları

- Bazı merkezler birinci basamak test olarak öneriyor. Ancak kromozom analizine göre dezavantajları göz ardı edilemez;
- 1) Dengeli anomalileri gösteremez
- 2) Mozaikleri $< \%10$ ise gösteremez
- 3) Pahalı
- 4) Varyasyonlarda ($\%3-4$) ek testler (parental analiz, konfirmasyon, vd) gerekir bu da ek zaman ve maliyet gerektirir.

- 1) Kromozom analizi normal, USG'de majör/çoklu anomali saptanmış gebeliklerde,
- 2) Dengeli *de novo* kromozom anomalisi saptanan olgularda,
- 3) *De novo* Marker kromozom saptanan olgularda,
- 4) Kromozom çözünürlüğü < 400 bant olan karyotipli olgularda,
- 5) Hücre kültüründe üreme olmayan olgularda

Kromozom Anomalilerinin Tanısında Kullanılan Tekniklerin karşılaştırması

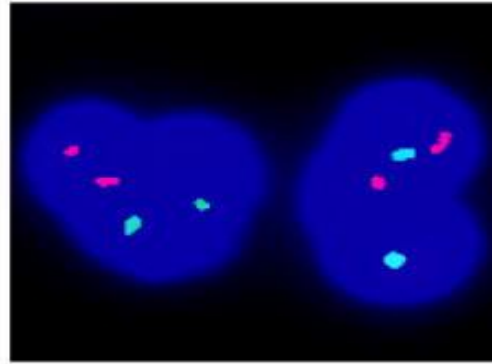
Karyotype



- Tüm genomu inceler
- Dengeli kromozom anomalilerini tanır**
- Düşük oranlı mozaikler de saptanır**
- 3n/4n tanısı mümkün

- Rezolüsyon >8 Mb
- Hücre kültürü gerektirir
- Tanı subjektiftir
- Otomatizasyon yoktur

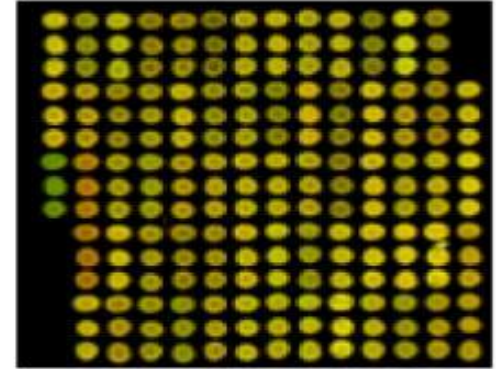
FISH



- Lokusa /kromozoma özeldir
- Rezolüsyonu yüksektir <3Mb)
- Yarı otomatizasyon mümkün
- 3n/4n tanısı mümkün
- Hızlı
- Kompleks anomalilerin aydınlatılmasında etkin**

- Endikasyona göre hücre kültürü gerekir
- Endikasyona göre kullanılır
- Otomatizasyonu zor

Array CGH



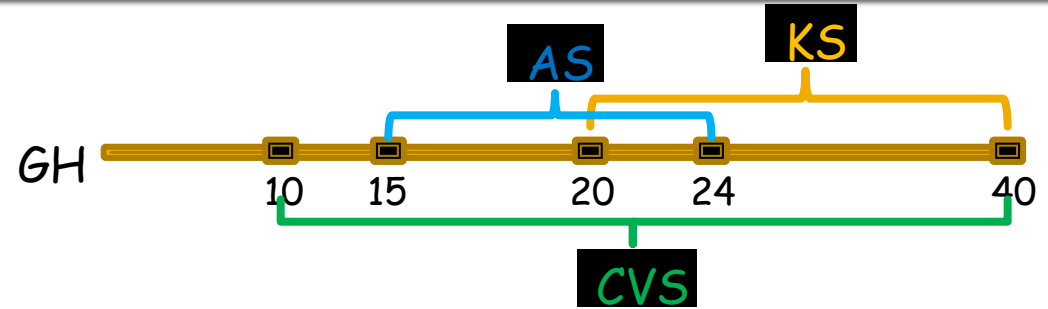
- Tüm genomu inceler
- Rezolüsyonu en yüksek (>100 Kb)**
- Hücre kültürü gerekmez**
- Otomatizasyona uygundur

- Dengeli kromozomal değişimleri tanıyamaz**
- Düşük oranlı (<%10) mozaikleri tanıyamaz**
- Bioinformatik çalışma gerektirir
- Klinik anlamı bilinmeyen sonuçlar
- Henüz pahalı

Fetal Kromozom Anomalilerinin Araştırılmasında İzlenebilecek Yol Haritası



1. GH'na göre yöntem



2. Hastalık riskine göre yöntem



>%10 CVS, KS
%5-10 CVS, AS, KS

%2-4 CVS, AS

1:200- %2 AS, CVS

<1:200 Tarama

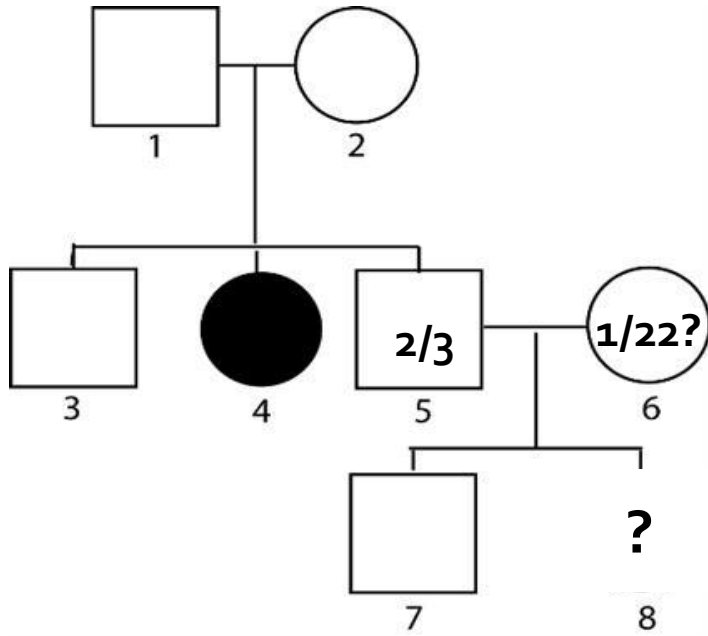
3. Endikasyona/Teste göre yöntem

Tek gen (DNA ve enzim),
USG'de majör anomali veya multipl marker, IUGG
translokasyon taşıyıcı ebeveyn,
cf-DNA pozitif+USG bulgusu+

} CVS

Olgu ;

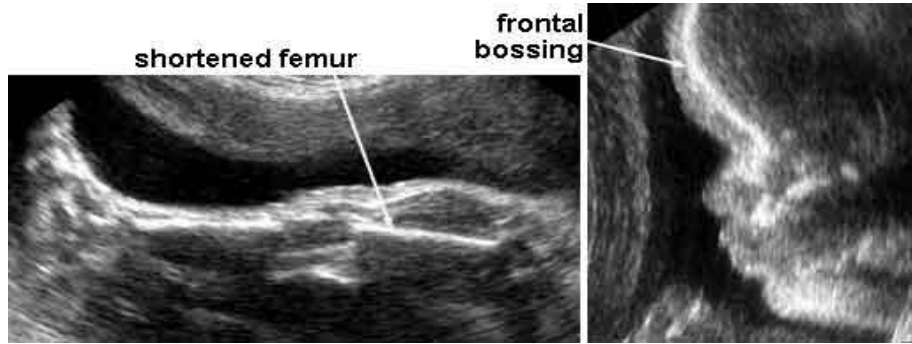
Aralarında akrabalık olmayan genç bir çift (28 ve 30) ikinci gebeliklerinin 9. haftasında başvuruyor. Aile öyküsünde baba adayının kardeşinde kistik fibroz olduğunu öğreniyorsunuz ????



Genetik İzlem

1. Aile ağacı,
2. Etkilenmiş kardeşin mutasyon testi?
3. Moleküler analiz var ve mut biliniyorsa; babada bu mut aranır, mut bilinmiyorsa; babada **CFTR geni tüm gen dizi analizi**
4. Baba taşıyıcı ise anne adayında tüm gen dizi analizi
5. Anne de taşıyıcı ise
14. haftalık gebelikte **invaziv girişim;**
6. **CVS**
7. CVS materyali
 - a. DNA analizi- Bilinen mut analizi
 - b. Direkt preparasyon- Kromozom
 - c. Hücre kültürü- kromozom+yedek materyal
8. Sonuca göre genetik danışma

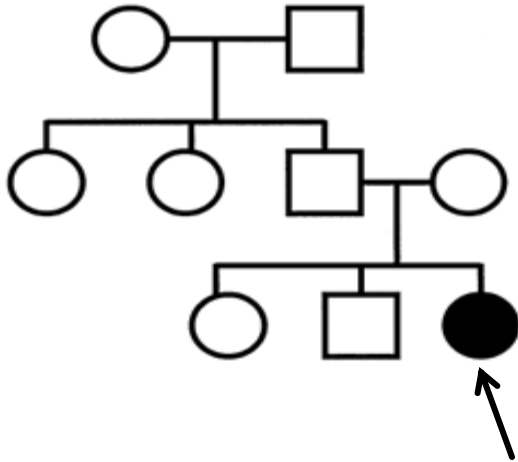
Olgu
32 yaşında sağlıklı anne ile 48 yaşında sağlıklı babanın 3. gebeliğinin 23. haftasında USG de iskelet displazisi (proksimal ekstremite kısalığı) ve frontal bossing saptanıyor



1. Etioloji;

Akondroplazi, hipokondroplazi?;

- a. OD
- b. Penetrans tam
- c. FGFR3
- d. De novo (~%90)

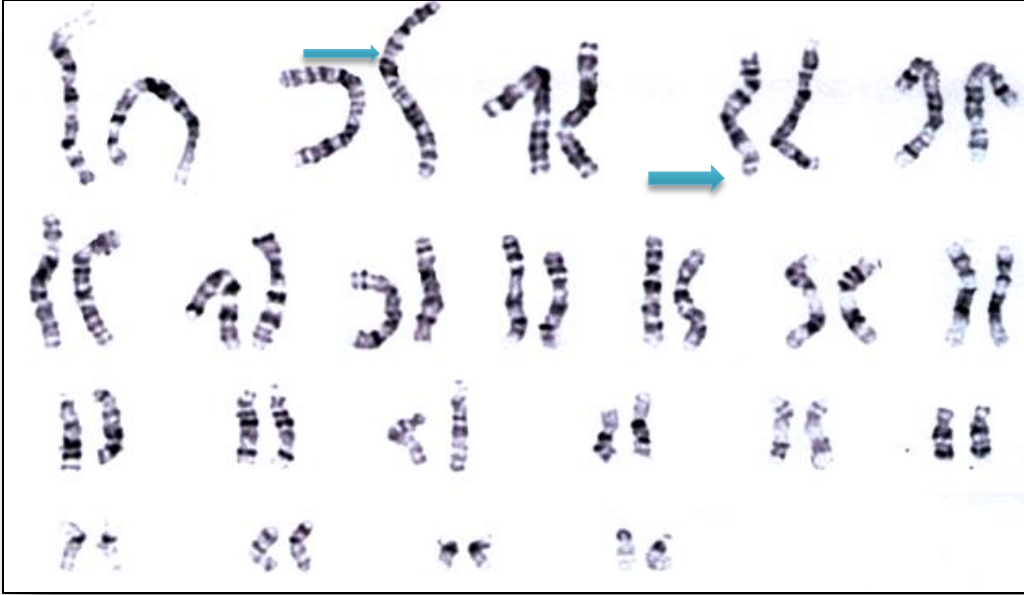


2. Öneri;

- a. **CVS veya KS** (2 tüp 1-2 ml heparinize+EDTA'lı)
- b. Moleküler analiz (FGFR3; G1138A veya G1138C)
- c. Bu mutasyonlar yoksa hipokondroplazi için genin diğer ekzonları)
- d. Kromozom analizi
- e. Sonuca göre genetik danışma

Olgu;

13. GH'da; İleri anne yaşı+2'li testte artmış risk+ICSI (donuk embriodan)



Öneri;

1) CVS

2) Karyotip 46,t(2;4)(p23;q31.1)

3) Parental kromozom analizi; N

4) Mikroarray/a-CGH ; N

5) 22. GH, 2. düzey USG; Ense plisi kalınlığında artış

6) PTPN11 dizi analizi; 13. ekzonda heterozigot c.1529A>C de novo
(Leopard sendromu'nda tanımlanmış bir mutasyon)

Olgu

PGD de 8q- saptanan ancak morfolojisi "iyi" olarak değerlendirilen tek bir embriyodan oluşan gebelik, 16. GH

Öneri 1;

- 1) USG; Bulgu +
- 2) **CVS**
- 3) Karyotip;N
- 4) **Mikroarray; N**

Öneri 2;

- 1) USG; N
- 2) **AS**
- 3) **I-FISH/QF-PCR; N+Karyotip;N**
- 4) **Mikroarray; N**

Olgu

Anne yaşı 33, ICSI gebeliği, PGD sonucu normal bir gebelik, 16. GH'da USG'de multipl anomaliler saptıyorsunuz

Öneri;

- 1) **CVS veya AS**
- 2) **Kromozom analizi+Mikroarray/aCGH**
- 3) Sonuca göre genetik danışma

Olgu

Anne yaşı 41, 18. GH, ICSI gebeliği, cf-DNA testi T18 için artmış risk, öyküde omfaloseli olan ikiz eşinin IUMF olduğunu öğreniyorsunuz.

Öneri

1) USG; N

2) AS

3) I-FISH/QF-PCR; N + Karyotip; N

4) Genetik danışma (cf-DNA'nın yanlış pozitif olma nedeni "vanishing twin")

Olgu

Anne yaşı 33, cf-DNA sonucu artmış trizomi 21 riski olan 15. GH'da gebelik, USG'da multipl markerlar (NF, Nazal hipoplazi) saptıyorsunuz.

Öneri;

1) CVS veya AS

2) CVS Direkt preparasyon+ HK Kromozom analizi

3) AS I-FISH/QF-PCR + HK Kromozom analizi

4) Genetik danışma

Teknolojiye sahip olmak, yeterli mi??

Teknolojiyi doğru yerde ve zamanda kullanmak "teknolojiyi yönetmektir", aksi halde "yönetilirsin".

Prof. Dr. Hayri Ermiř



İÜ, İTF ve Türkiye'de Prenatal Tanının başlaması ve yaygınlaşmasındaki katkıları hiçbir zaman unutulmayacak!