



Maternal - Fetal Tıp ve Perinatoloji Derneği
Türkiye

Uzman Görüş Derleme

HÜCRE DIŞI FETAL DNA TESTİ (Non Invasive Prenatal Test, NIPT)

Prof. Dr. Tuncay Nas

Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Perinatoloji Öğretim Üyesi

Düzenleme Tarihi:2 Nisan 2025

Hücre dışı fetal DNA testinin (Non invasive prenatal test, NIPT) çalışma prensibi maternal kana geçen apoptotik sinsiyotrofoblast kökenli DNA fragmanlarının tespitine dayanmaktadır. Yani başka bir deyişle plasental hücrelerin ölümü ile ortaya çıkan DNA fragmanlarının anne dolaşımına geçmesi sonucu maternal kanda fetusa ait genetik bilgilerin incelenmesi esasına dayanan bir testtir. Gebeliğin beşinci haftasından itibaren maternal kanda görülmeye başlayıp, doğumdan 2 gün sonra dolaşımdan kaybolur (yarı ömrü bir saattir). Gebeliğin 10. haftasından sonra 20. haftaya kadar haftada %0.1 oranında artar iken, 20. gebelik haftasından sonra terme kadar bu oran haftada %1 çıkar. Bu bilgi yetersiz fetal fraksiyon gelmesi durumlarında önemli olup, test tekrarı gerekirse gebelik haftasının ilerlemesinin beklenmesi açısından önemlidir. Burada incelenen DNA fragmanların kökeni plasenta olduğu unutulmamalıdır. Plasenta ve fetusun aynı kökenden geldiği (identical) bilindiği için fetus hakkında da bilgi alınmış olmaktadır. Bu kural bazı istisna durumlar dışında (plasental mozaizm, gerçek mozaizm) genel olarak geçerlidir. NIPT obstetri alanında belki de ultrasondan sonraki en büyük gelişme olarak kabul edilebilir.

Gebeliğin 9-10. haftasından sonra gestasyonel yaştan bağımsız olarak gebeliğin her döneminde yapılabilir. NIPT kromozomal anormallikleri gösteren genetik variantları bulmak için next generation sequencing (NGS) kullanıldığı bir testtir. Bir tarama testi olan NIPT ilk olarak Hong Kong da başlatılmıştır (1). Araştırmacılar bu testin trizomi 21 (T21) için yüksek sensitivite ve spesifitesi olduğunu göstermişlerdir. T21 için yüksek riskli gebeliklere tarama yapılarak takibinde test sonucu pozitif olanlara CVS veya amniosentez yoluyla tanıya gidilmiştir. Bu yaklaşım ile tüm gebelere invazif girişim yapılmasına gerek kalmayıp, işleme bağlı komplikasyonlar da en aza indirilmiştir.

Maternal kanda sadece fetal DNA fragmanları olmayıp, maternal hücrelerin yıkılması sonucu ortaya çıkan anneye ait de DNA fragmanları bulunmaktadır. Bu nedenle fetal fraksiyon (fetal

DNA oranı) test için önemli duruma gelmektedir. Bu oran genellikle %10-20 civarındadır. NIPT in aneuploidi için başarılı bir sonuç vermesi için fetal fraksiyonun en az %1-3.5 civarında olması gereklidir. Mikrodelesyonların taranması için bu oran daha yüksek olmalıdır.

Yeterli fetal fraksiyon elde etmek için kan örneği alınırken dikkat edilmesi gereken şartlar vardır. Bunlar:

1. Gebelik haftası: test gebeliğin 9-10. haftasından sonra yapılmalı, acil bir endikasyon yok ise 12 haftaya kadar beklenmelidir. Bu bilgi ülkemiz için oldukça mantıklı bir yaklaşımdır. Literatürde testin 9-10. haftalarda başlanma nedeni gebelerin birçok ülkede sonografik incelemeye girmeden yani obstetrik muayene olmadan bir sağlık merkezine kan verme şeklinde yapılmasından kaynaklanmaktadır. Oysa bizim ülkemizde gebelere hemen hemen tüm hastanelerde 11-13. haftalarda birinci trimester tarama amaçlı obstetri muayenesi yapılmaktadır. Bu dönemde yapılması birçok bakımdan avantajlı hale gelmektedir. Birincisi yeterli DNA fraksiyonu elde etmek, ikincisi bu dönemde fetusun aneuploidi açısından incelenme imkanı olmakta, böylece invazif girişim gereken bir sonografik bulgu görüldüğünde gebeliklere gereksiz NIPT yapılmamış olmaktadır.

2. Kan alımı ve taşınmasının optimal şartlarda olması ve test merkezine ulaştırılması gereklidir. Kan örneği EDTA lı tüpe (mor kapaklı tüp) 10 mL olarak alınıp, hemen santrifüj edilmelidir (6 saat içinde). Santrifüj gecikir ise maternal lökositlerin ölümü ile ortaya çıkacak DNA fragmanları fetal oranı bozacaktır. Elde edilen plasma hemen -80 santigrad derecede saklanmalıdır. **Günümüzde kan alımı ve taşınması daha kolay ve pratik bir yöntem olan venöz kanın bu iş için üretilmiş özel tüpte taşınması şeklinde test yapılmaktadır. Bu tüp içinde hücre dışı DNA yı oda sıcaklığında 7 güne kadar stabilize eden koruyucu reagentlar mevcuttur. Yani transport için santrifüj ve soğuk zincir gerekli değildir.**

Ülkemizde en önemli sorunlardan birisi çok sık oranda düşük moleküler ağırlıklı heparin ve aspirin kullanımınıdır. Sonuç bildirilemeyen test sonuçları özellikle heparin kullanımında artmaktadır (2, 3). Bunun nedeni ise antikoagulantların plasental apoptosisi azalması veya dilüsyonel etkisi yoluyla fetal fraksiyon azaltmasıdır. Eğer bu terapileri alan hastalarda NIPT sonucu verilemiyor ve kullanılmasında hayati bir zorunluluk yok ise tedavinin bir süre (bir hafta?) kesilip test için kan örneği gönderilmesi mantıklı olabilir.

3. Maternal obesite (plasma volümünün artması sonucu fetal fraksiyon azalması), ikiz gebelik (ikiz başına düşen DNA fraksiyon yetersizliği), IVF gebeliği yeterli fetal fraksiyon sağlanamayan durumlarda akılda tutulmalıdır.

4. Yukarıda bahsedilen durumlar dışında sonucun “düşük fetal fraksiyon” gelmesi halinde fetal aneuploidi akla gelmeli ve invazif girişim önerilmelidir.

NIPT çalışma metodları

Burada çalışılan metodları çok detaya girmeden, bize sunulan seçeneklerin neler olduğunu bilmemiz açısından yararlı olacak şekilde kısaca bir kadın doğum uzmanı gözüyle anlatılacaktır.

Uygun şekilde kan alındıktan ve santrifüj edildikten sonra DNA fragmanları maternal serumdan ayrıştırılıp amplifiye edilir. Fetal DNA yı kullanarak kromozom taraması birçok metod ile

yapılmakta olup hepsinin de sık görülen aneuploidilerin taramasında sensitivitesi ve spesifitesi yüksektir. Test yapılırken annenin euploid olduğu varsayılır. Eğer test sonucu olumsuz çıkar ise annenin durumu tekrar değerlendirilmelidir.

Günümüzde hücre dışı fetal DNA için 2 ana metod kullanılmaktadır.

1. Whole genom sequencing (shotgun sequencing, massively parallel sequencing)

2. Targeted methodologies (hedefli metodlar)

- a. Targeted genome sequencing
- b. Single nucleotide polymorphism (SNP)
- c. Mikroarray
- d. Rolling circle amplification

1. Whole genome sequencing (shotgun sequencing, massively parallel sequencing)

En sık kullanılan metod olup, tüm genom üzerinde hücre dışı DNA fragmanlarının sequencing'ni (sekanslama, dizileme, sıralama) yapar.

Bu metod ilk olarak Illumina tarafından geliştirilmiş ve daha sonra başkaları da katılarak çok ileri aşamalara getirilip pazara sunulmuştur.

Maternal plasma içindeki DNA moleküllerini rastgele veya shotgun (çifte tüfek ile atış) ile sıralama esasına dayanır. Bu teknolojinin özelliği sadece hedef alınan kromozomlar değil tüm kromozomları içeren sayısal anormalliklere bakabilmekte ve bunun yanında Robertsonian translokasyonuna bağlı Down sendromunu, copy number variantları (mikrodelesyonlar-mikroduplikasyonlar) da tespit edebilmektedir.

Yüzbinlerce hatta milyonlarca DNA fetal ve maternal DNA fragmanları bir ucundan veya her iki ucundan dizileme yapılır (4, 5, 6). DNA fragmanının her iki tarafından dizileme yapılmasından dolayı grupta anne ve fetusta farklılık gösteren DNA fragmanlarının büyüklüğü hakkında da bilgi verir. Çeşitli dizileme yöntemleri vardır. Bunlardan en son gelişmiş olanı next generation sequencing (NGS) dir. Daha sonra dizinler referans genom haritasına göre ait olduğu kromozomlara göre ayrılır. Benzersiz (eşi olmayan, tek bir lokusta olan) olan dizinler (yani multiple lokusta haritalanmayan dizinler) her bir kromozom veya kromozomal bölgeler için sayılmak üzere numaralandırılır. Bu sayım euploid gebeliklerde her bir otozomal kromozom için iki kez, triploidy de fazla, monozomide eksik sayıda bulunur. Örnek olarak gebe olmayan euploid bir kadında 21. kromozom kaynaklı hücre dışı DNA fragman oranı %1.3 dür (insan genomunun %1.3 ünü 21. kromozom oluşturur). Gebelikte anne ve fetus euploid ise bu oran yine sabit olup %1.3 dür. Eğer fetus trizomi 21 ise (21. kromozomdan 2 kopya yerine 3 kopya var ise) bu oran %1.3 den yüksek olacaktır.

Bu yöntem ile çalışan laboratuvarlar arasındaki değişkenlik dizileme derinliği yani sayılan DNA fragmanlarının sayımındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Bu farklılık düşük fetal fraksiyonda ve tespit edilebilir kromozomal dengesizliklerin büyüklüğünün alt sınırının bulunmasındaki performansını belirleyen bir parametredir (7). Bu nedenle laboratuvar farkı ön plana çıkmaktadır. Subkromozal dengesizliklerin rutin olarak tespit edilmesi için daha derin dizileme bir maliyet konusudur (8). Selektif daha derin dizileme ilk test tatminkâr sonuç vermez ise tercih edilir (refleks test).

Massively parallel sequencing metodu ile yapılan testlerin çoğu her ne kadar fragmanların büyüklüğü analiz yapılan fetal fragmanların zenginleştirilmesine izin verse de maternal fetal DNA komponentlerini ayıramaz.

Maternal-fetal anormalliğinin ayırımı, anormal olarak bulunan (gözlenen) fetal DNA oranının fetal fraksiyonda beklenen (expected) oran ile karşılaştırılması sonucu da yapılabilir.

İstatiksel olarak hesaplama, her bir kromozom için beklenen sayımdan standart sapma olarak yapılır (Z-skoru). Örneğin, 21. kromozom için alınan kan örneğinde standart sapma >3 ise, bu olgu trizomi 21 için yüksek risk taşır. Kategorik sonuç verilir (var-yok, pozitif-negatif). Yani size bir NIPT sonucu “negative result”, “absence of trisomy 21” şeklinde gelmiş ise bu test massively parallel sequencing yöntemi ile çalışılmış demektir.

RESULTS SUMMARY:

CHROMOSOME	RESULTS	PPV (%)
Chromosome 21	NEGATIVE: No aneuploidy detected Results consistent with two copies of chromosome 21	
Chromosome 18	NEGATIVE: No aneuploidy detected Results consistent with two copies of chromosome 18	
Chromosome 13	NEGATIVE: No aneuploidy detected Results consistent with two copies of chromosome 13	
Sex Chromosomes	NEGATIVE: No aneuploidy detected Results consistent with two sex chromosomes	

2. Targeted methodologies (hedefli metodlar)

2a. Targeted genome sequencing (Chromosome selective)

Massively parallel sequencing metodu gibi tüm genomu taramak yerine sadece bir ya da birkaç kromozomu hedef alınarak yapılır ise bu metoda “chromosome selective” veya “targeted sequencing” adını alır. Buradaki daha verimli strateji, ilgilenilen kromozomun genomik bölgelerini selektif olarak dizileme, böylece dizileme gücünün tanı için ilgilenilen genomik bölgeler üzerine yoğunlaşması şeklindedir. **Bu strateji hem maliyeti düşürmekte hem de verimi arttırmaktadır.** Bu yöntem ile incelenen kan örneği başına bir milyon haritalanabilir okuma gerektirir. Bu miktar “massively parallel sequencing”den çok daha azdır. **Bu yöntemin bir dezavantajı hedef dışındaki kromozomların anormalliklerini göremez.** Testin istatistiksel sonucu, önceden olan aneuplodi riskini (maternal yaş ve gestasyonel yaş), hedef kromozom sayımını (bu kromozoma ait DNA miktarını), fetal fraksiyonu da kullanarak odds ratio şeklinde hesaplama yaparak verir. **Bu metod ile yapılan test ile bir risk sonucu çıkar. Yüksek olasılık-düşük olasılık (high probability-low probability) şeklinde sonuç verilir. 1/100 veya daha büyük değerler yüksek risk anlamını taşır.**

Test Results			Fetal cfDNA Percentage: 9.2%
CHROMOSOME	RESULT	PROBABILITY	RECOMMENDATION
Trisomy 21 (T21)	Low Probability	Less than 1/10,000 (0.01%)	Review results with patient
Trisomy 18 (T18)	Low Probability	Less than 1/10,000 (0.01%)	Review results with patient
Trisomy 13 (T13)	Low Probability	Less than 1/10,000 (0.01%)	Review results with patient

Fetal Sex	
Sex Chromosome Aneuploidy Panel	Low Probability

2b. Single nucleotide polymorphism (SNP) analizi

Testin adı Panorama olup Natera bu metod ile çalışmaktadır. Avantajı fetal kromozomal anomalilerden, anneye ait olanları ayırabilme özelliği vardır. Bu metotta da sonuç “yüksek risk” veya “düşük risk” olarak gelir



SNP tabanlı yaklaşım iki tiptir:

- Allele ratios (Allele oranları). Bu metod henüz araştırma aşamasındadır.
- Genotype analysis with maximum likelihood estimation (Maksimum olasılık tahmini ile genotip analiz)

Bu yaklaşım geliştirilmiş ve uluslararası kullanıma açılmıştır. Bu metod ile anne ve fetus arasında farklılık gösteren binlerce SNP içeren DNA dizinlerinin panelini amplifiye ve analiz yapma esasına dayanmaktadır (9, 10). Kromozomal dengesizlikler, farklı fetal fraksiyonlarda SNP dağılımı ile euploid veya aneuploidiyi gösteren varsayımsal setin gözlenen data ile karşılaştırılması sonucu bulunmaktadır.

SNP leri önce hedefli olarak amplifiye edip, daha sonra “next generation sequencing” ve “sophisticated informatics analysis” yöntemleri ile fetal kromozomal kopya sayısı bulunmaktadır. Trizomi 21, 18, 13 için >%99 sensitivite gösterir. X ve Y kromozom sayısını da rutin olarak bildirir. SNP metodu tekil gebeliklerde triploidiyi, ikiz gebeliklerde aneuploidi, zigosite ve vanishing twin’i de gösterir (11).

Hedefli bir yöntem olduğu için Trizomi 21, 18, 13 ve sex kromozomlar dışındaki kromozom anormalliklerini göremez.

FINAL RESULTS SUMMARY			
Result	Fetal Sex	Fetal Fraction	
LOW RISK	Not reported	12.9%	
			
RESULTS DETAILS			
Condition tested ¹	Result	Risk Before Test ²	Panorama Risk Score ³
Trisomy 21	Low Risk	1/759	<1/10,000
Trisomy 18	Low Risk	1/2,869	<1/10,000
Trisomy 13	Low Risk	1/8,587	<1/10,000
Monosomy X	Low Risk	1/568	<1/10,000
Triploidy/Vanishing twin	Low Risk		

1. Excludes cases with evidence of fetal and/or placental mosaicism. 2. Based on maternal age, gestational age, and/or general population, as applicable. References available upon request. 3. Based on a priori risk and results of analysis of circulating placental DNA.

2c. Mikroarray

Bu metod ile hedefteki kromozoma ait çok sayıdaki lokuslar mikroarray platformunda ölçülür ve sonrasında dizinlenerek sayısal oranına bakılır. Tüm genom metodolojisinde olduğu gibi hedef kromozomunda trizomi var ise bu kromozoma ait dizinlerde sayısal artış gözlenir.

2d. Rolling circle amplification (RCA)

Bu metod seçilmiş hücre dışı DNA fragmanlarını hedef alır. Özel olarak hazırlanmış problar hedef kromozoma ait fragmanlara bağlanır (21, 18, 13. Kromozomlar gibi). Bu fragmanlar RCA yöntemi ile florasan ürünlere dönüştürülmek üzere amplifiye edilir ve otomatik olarak mikroskopik ortamda sayılır. Diğer metodlarda olduğu gibi hedef kromozoma ait sayısal artış oranına bakılarak trizomi tanısı konulur.

NIPT testinin tarama performansı ve diğer tarama testleri ile karşılaştırılması:

Bir testin performansı hastalığı yakalama oranı (detection rate, sensitivite) ile ölçülür. Bu açıdan aneuploidi tarama testleri karşılaştırıldığında çok önemli farklılıklar ortaya çıkmaktadır.

Gebelerde maternal yaş ilerledikçe aneuploidi riski arttığı çok iyi bilinmektedir. Doğumda 35 yaşında olacak kadında Down sendromlu çocuk sahibi olma riski 1/385 iken bu oran 45 yaşındaki gebe için 1/19 a çıkmaktadır. Tüm aneuploidilerin risk hesabı yapıldığında bu oranlar daha artmaktadır. Ancak şunu unutmamak gerekir ki tüm aneuploidilerin %80 i 35 yaş altı gebeliklerde görülür (gebelerin büyük çoğunluğu bu yaş döneminde olduğu için). Bu kadar önemli ve azımsanmayacak sıklıkta görülen bu kromozomal anomalilerin tespiti için tüm dünyada ideal bir tarama testi programları oluşturulmaya çalışılmaktadır. Son yıllara kadar birinci trimester tarama, ikinci trimester tarama (üçlü tarama, dördü tarama (squad test)) testleri rutin içinde yer alırken NIPT ile yeni bir dönem başlamış ve yeni bir paradigm oluşturulması gerekmiştir. Henüz bu paradigm tam olarak oturmamış olsa bile bir hayli yol almıştır. Bunun en önemli nedeni aneuploidi taramasında NIPT in hastalığı yakalama oranının diğer tarama testlerine göre çok yüksek olmasıdır. Diğer tarama testlerinde Down sendromu için en iyi sensitivite (detection rate, hastalığı yakalama oranı) %80 ler civarında iken NIPT de bu oran %99 veya daha üstündendir. Birinci ve ikinci trimester analit testlerini entegre veya sequential olarak yaparsak sensitivite %90 lara çıkmakla birlikte tüm bu testlerde yalancı pozitiflik oranı çok yüksektir (%5). Bu testlerin ister tek başına ister birlikte yapılması halinde pozitif prediktif değeri (yani test sonucu pozitif geldiğinde gerçek hastalık olması durumu) %5 dir. Bir başka deyişle 100 pozitif sonuçtan sadece 5 gebede gerçekten hastalık var demektir.

NIPT de Down sendromu için sensitivite (hastalığı yakalama oranı) %99 iken yalancı pozitiflik % 0.1 olup, pozitif prediktif değer (pozitif test sonucunun gerçek hastalığı gösterme oranı) yaşa göre değişse bile (genç hastalarda daha düşüktür) diğer tarama testlerine göre çok daha başarılıdır. Pozitif prediktif değer T21 için 20 yaşında %38 iken bu oran 40 yaşındaki gebe için %93 e çıkmaktadır (bu oranın analit bazlı serum testlerinde %5 olduğunu unutmayalım). Trizomi 13 ve 18 için sensitivite ve spesifisite (hastalığın olmama oranı) daha düşük olsa da diğer tarama testlerine göre çok daha başarılıdır.

NIPT in başka bir özelliği de sex kromozomu anomalileri hakkında da bilgi vermesidir. Antenatal dönemde NIPT ile fetal Rh tayini tanısal bir test olarak kabul edilmiş ve birçok ülkede rutin hale

gelmiştir. Böylece etkilenmemiş Rh uyuşmazlığı olan gebelerde fetal Rh tayini ile gereksiz olarak bir kan ürünü olan anti-D immunoglobulin uygulamasının önüne geçilmiştir. Etkilenmiş Rh olgularındaki fetal Rh tayininin önemini açıklamaya gerek olmadığı aşikardır. NIPT de her geçen gün yeni hastalıkların taraması eklenmekte olup ≥ 7 mb delesyonlar ve duplikasyonlar da işin içine girmektedir. Tek gen hastalıklarında da çok hızlı gelişme olup, bazı hastalıklarda yakın gelecekte tanı testi olarak kullanılması sürpriz olmayacaktır.

NIPT kimlere yapılmalıdır? Endikasyonları nelerdir?

Genel olarak iki gruba ayırabiliriz:

1. Primer NIPT tarama
2. Sekonder NIPT tarama

1. Primer NIPT tarama:

Primer tarama demek bir hastalığın birincil test ile taranmasıdır. NIPT bazı Avrupa ülkelerinde (Hollanda, Belçika) gebelere birincil test olarak önerilmektedir (12). ABD’de de primer test önerilmesi bazı sınırlamalar dışında hızla yayılmaktadır (13). Ayrıca bu testin endikasyonları çok hızlı bir şekilde artarak değişmekte, geniş kapsamlı hale gelmektedir. En önemli konu maliyet oluşturmaktadır. Sağlık sisteminin geri ödemesi şeklinde birçok ülkede endikasyon çok geniş tutulmaktadır. Bu testin zamanla isteyen tüm gebelere rutin yapılacağı bir gerçektir.

2. Sekonder tarama:

Sekonder tarama bu testin ilk yıllarında trizomi 21, daha sonra trizomi 13 ve 18 için gündeme gelmiştir (14, 15, 16). ABD’de NIPT’e her zaman ulaşılması kolay olmayan durumlarda hala geçerli bir tarama şeklidir. Ülkemizde de eğer bu test geri ödeme sistemine girecek olur ise ilk olarak sekonder tarama şeklinde başlanması mantıklı olacaktır.

Sekonder tarama diğer tarama yöntemleri ile (ileri maternal yaş, pozitif birinci ve/veya ikinci trimester serum analit tabanlı tarama testleri gibi) sonucunun pozitif gelmesi durumunda sonraki aşama olarak NIPT’e geçilmesidir. NIPT için endikasyon oluşturan durumlar:

Doğumda 35 yaş ve üstü olacak kadınlar

Pozitif birinci trimester veya ikinci trimester analit-tabanlı tarama testleri

Sonografide minor aneuploidi marker görülmesi

Daha önce aneuploidi gebelik öyküsü olanlar

Ailede aneuploidi öyküsü olanlar

Anne veya babada dengeli 21 ve 13. kromozomlar ile ilgili Robertsonian translokasyon varlığıdır.

Bu endikasyonlar arasında en büyük grubu analit tabanlı birinci veya ikinci trimester tarama testleri oluşturmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi bu testlerin pozitif prediktif değeri çok düşüktür (%5). Beş aneuploidi olgusu tanıyı koymak için test sonucu pozitif gelen 100 gebeye invazif girişim gerekmektedir. Oysa ki birinci trimester veya ikinci trimester analit-tabanlı tarama testi pozitif olanlara NIPT yapılırsa bu kadar yüksek oranda invazif test yapılmadığının yanında rezidual (geriye kalan, gözden kaçan) kromozomal anormallikler %2 ye kadar düşmektedir.

Sekonder tarama için 2 model vardır.

Contingent model

Reflexive model

Contingent model:

Bu modelde (14) tüm gebelere birinci trimester analit tabanlı (PAPP-A + serbest BHCG) tarama testi yapılır. Cutoff değerlerine göre gebeler 3 gruba ayrılır. Birinci grup "yüksek riskli grup" ($>1/150$), ikinci grup "intermediate risk" grubu ($1/151-1/1000$), üçüncü grup ise "düşük risk" ($<1/1000$) dir. Birinci trimester tarama testi sonucunda gebelerin %3-5 i yüksek risk, %10-15 i intermediate risk, %80-85 ise düşük risk grubuna girmektedir. Yani başka bir deyişle ilk basamak olarak birinci trimester analit tabanlı test ile gebelerin %80-85 ini (az da olsa yalancı negatif olgularla birlikte) ekarte etmiş oluyoruz. Düşük riskli gruba tarama testi sonucunun kesin tanı olmadığını bilmesi şartı ile eğer gebe arzu eder ise bu aşamada kalıp sekonder tarama veya invazif girişime gidilmez. Yüksek riskli gruba ya invazif girişim ya da NIPT (sekonder tarama) önerilir. Yüksek riskli grupta olan gebenin NIPT sonucu pozitif gelir ise invazif girişim önerilir. Burada en önemli grup "intermediate grup" olup, danışmanlık verilerek NIPT e geçilir. NIPT sonucu pozitif gelir ise invazif girişim önerilir.

Reflexive model

Bu model de (16) contingent modelin aynı cutoff değerlerini kullanır. Tek farkı birinci trimester analit tabanlı (biyokimyasal) tarama testi için kan alındığında, plasmanın sonraki aşamada gerektiğinde kullanılmak amacı saklanmasıdır. Sonuç "yüksek riskli" çıkar ise ya invazif girişim ya da NIPT önerilmektedir. Diğer modelden farkı "intermediate risk" grubuna düşen gebelere otomatik olarak (reflexive) daha önceden saklanmış plasmada NIPT testine geçilmektedir. Böylece gebenin tekrar çağrılmasına ve görüşme yapılmasına gerek kalmamaktadır. Tek dezavantajı fazladan gereksiz plasma saklanmasıdır. Reflexive modelin avantajı ise "intermediate grup"a görüşmeye gelmeden otomatik olarak NIPT yapılması ile aneuploidi sensitivitesi ve pozitif prediktif değerinin daha iyi olmasıdır. Bunun nedeni contingent modelde bu grubun bir kısmının görüşmeye gelmemesi, gelenlerin bir kısmının NIPT istememesidir.

NT kalınlığı-NIPT:

Eğer NIPT istenecek ise NT bakılmasını hakkında tam bir görüş birliği yoktur. Hücre-dışı DNA test sonucu negatif çıksa bile eğer birinci trimester sonografi yapılmaz ise az da olsa kromozomal (aneuploidi, delesyon duplikasyonlar) veya yapısal anomali riski vardır. Eğer NIPT den önce NT ye bakılmış ve sonuç anormal ise NIPT yerine invazif girişim yapılmalı (karyotip ve microarray yapılmak üzere) ve fetal anatomik tarama yapılmalıdır.

Test sonucunun değerlendirilmesi:

Test sonucu:

- 1. Tarama pozitif (kullanılan metoda göre, high probability, positive, high risk şeklinde)**
- 2. Tarama negatif (low probability, negative, low risk)**
- 3. No call (sonuç verememe) şeklinde gelecektir.**

1. Pozitif sonuç

Bu durumda çok büyük olasılıkla hastalık var demektir. Yani test sonucu gerçek hastalığı yakalamıştır. Ama kesin tanı için invazif girişim mutlaka yapılmalıdır. Nadir de olsa test sonucu yalancı pozitif olabilir. **Yalancı pozitif tanısı koymak ve bu yolda ilerlemek için önce invazif girişim şarttır. Yalancı pozitiflik nedenleri:**

a. Confined plasental mosaisizm (CPM) gebeliklerin %1-2 sinde görülmektedir. CPM demek kromozomal mosaisizmin (euploid ve aneuploid hücrelerin birlikte olması) sadece plasentada sınırlı olup, fetus euploid yani normal anlamına gelmektedir. NIPT plasentadan gelen hücrelerin DNA sını incelediği için görülen pozitif sonuç her zaman fetusu yansıtmayabilir yani CPM bulgusu olabilir. CPM de T2 veya T18 yerine daha çok T13 veya monozomi X gelir. Eğer test massively parallel sequencing metodu ile yapılmış ise tüm kromozomlara bakıldığı için diğer kromozomal anomaliler de bulunabilir. Ayırıcı tanı için CVS bazan de CVS i takiben amniosentez gerekmektedir. **Pratikte, eğer sonografide aneuploidiyi düşündürecek bir bulgu yok ise, özellikle yaşarla bağdaşmayan diğer kromozomal anomaliler için sonuç pozitif ise, CVS yerine kesin sonuç için amniosentezi beklemek çok daha mantıklı olmaktadır.** Bilindiği üzere amnion sıvısındaki hücreler embriyonun geliştiği epiblasttan köken almakta fetusu gerçek anlamda genetik olarak temsil etmektedir. Eğer CVS yapılır ise nadir de olsa CPM nin tip II ve III durumunda genetik uzmanı sizden fetal mozaisizmi ekarte etmek için ikinci basamak olarak amniosentez isteyecektir.

b. Maternal mosaisizm: NIPT maternal karyotipin normal olduğunu kabul eder. Bu her zaman doğru olmayabilir. İleri yaşla birlikte kadınların bir kısmında az orandaki hücrelerinde X kromozomlarını kaybettikleri bilinmekte, böyle bir gebeye NIPT yapılır ise sex kromozom aneuploidi sonucu pozitif olarak gelebilir.

c. Annede "copy number variant" varlığı (duplikasyon veya delesyonları ifade eder). Annede duplikasyon var ise yalancı pozitif sonuç gelir. **Massively parallel sequencing metodu en az etkilenir**

d. İkiz eşinin ölümü (vanishing twin): İkiz eşi ölse bile plasentasından apoptotik trofoblastlardan DNA fragmanları gelmeye devam edecektir. Bu vanishing twin gibi daha da erken fark edilmeyen gebeliklerde daha da sıkıntılıdır. Belki de ülkemizde ultrasonografinin obstetride gereksiz çok sık kullanılmasının beklenilmeyen faydalarından birisi de vanishing twin i fark edip NIPT i daha ileri haftalara ötelememiz olabilir. Eğer ölen ikiz eşi aneuploid ise ve plasentasından DNA fragmanları maternal dolaşıma geçeceğinden yaşayan fetus euploid olsa bile test sonucu pozitif gelecektir. Bu durumda ilk trimester ikiz eşinin ölümünden sonra test için en az 8-13 hafta, ikinci trimester kayıplarında ise 16 haftaya kadar beklenilmelidir.

e. Maternal kanser: Maternal kanser durumunda dolaşıma anne, fetal hücre dışı DNA ya üçüncü komponent olarak tümöre ait hücre dışı DNA eklenir. Bu hücrelerden farklı aneuploidiler, delesyonlar veya duplikasyonlar eklenebilir. Bu eklenme NIPT de yalancı pozitifliğe neden olur. Eğer invazif girişim sonucu normal gelir ise diğer olası yalancı pozitiflik nedenleri ekarte edilip maternal malignansı araştırılmalıdır. En sık görülen kanserler meme, serviks, over, kolorektal kanserler, lösemi, lenfoma, tiroid kanseri ve melanomdur. Kanser dışında diğer önemli yalancı pozitiflik faktörü myoma uteridir. Bu açıdan sonografik inceleme gereklidir.

f. Anne transplant (kemik iliği veya organ) hastası ise: Donör erkek ise NIPT sonucu kız fetus için donör organdan gelen erkek hücre dışı DNA nedeni ile erkek olarak gelebilir.

g. Yakın zamanda kan transfüzyonu

h. Myoma uteri??, şansızlık ve teknik sorunlar

2. Tarama negatif

Tarama sonucu negatif gelir ise testin yüksek sensitivite ve spesifitesinden dolayı ileri işlemler (invazif girişimler) önerilmez. Bu testin tarama testi olduğu hatırlanmalı kesin sonuç olmadığı bilinmelidir. Ultrasonografide yapısal anomali var ise test sonucu negatif olsa bile tanısal test (kromozom microarray i de için alan) önerilmelidir. Nadir de olsa yalancı negatif test sonucu olabilir. Bunun nedenleri:

Confined plasental mosaisizm: NIPT plasentaya ait bilgi taşıdığından bu kez “yalancı pozitif sonuçta” görülenin tam tersi plasenta normal karyotipte olup, fetus anormal olabilir. Nadir bir durumdur.

Boderline düşük fetal fraksiyon: Yeterli oranda fetal DNA fragmanları olmadığından, aneuploidi gözlenen DNA fragman oranı ile beklenen DNA fragman oranı arasında belirgin fark çıkamadığından gözden kaçabilir. Yani yetersiz miktarda fetal DNA dizinlenemediği için test sonucu yalancı negatif gelebilir. Bu nedenle bu grubu da “no call, sonuç verememe” olarak kabul edip invazif testlere gitmekte yarar vardır.

Maternal copy number variantlar (duplikasyon, delesyon)

Maternal duplikasyonlar “yalancı pozitif” sonucu çıkabileceği yukarıda bahsedilmişti. Maternal delesyonlarda ise tam tersi bu kez ilgili kromozoma DNA fragmanları daha az olacağı için “yalancı negatif” sonuç gelebilir. Çok nadir bir durumdur.

3. Test sonucu verememe (no call)

Fetal DNA fraksiyonunun düşüklüğü (laboratuara göre değişmekle birlikte <%3) en önemli nedenidir. Düşük fetal fraksiyon nedenleri yukarıda bahsedildiği gibi erken gebelik haftasında kan alımı, uygun olmayan şartlarda kan örneğinin alınması (anti koagülan kullanımı da bu grup içine alınabilir), obesite, ikiz gebeliktir. Bunlar ekarte edildikten sonra “sonuç verememe” raporu gelirse aneuploidi düşünülerek invazif girişim yapılmalıdır.

Uniparental disomy yani her iki kromozomun da sadece anne veya babadan birisinden gelmesi veya akraba evliliği gibi durumlarda SNP ile analiz yapılan testte laboratuvar anne ve babanın kromozomlarından gelen özdeş gen dizinleri içeren fragmanların varlığından dolayı benzer iki DNA kaynağı arasındaki farkı ayıramaz. Bu nedenle laboratuvar sonuç veremez.

Laboratuvarların test performansını yüksek tutmak için (yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik oranını düşük tutmak için) gerekli gördüğü ön şartların çok katı olmasına bağlı olarak sonuç vermeme durumu da olabilir.

Bazı laboratuvarlar “borderline” olarak sonuç verebilir. Bu grup gebeler de “sonuç verememe” gibi kabul edilip aynı şekilde yol alınmalıdır.

Test sonucu “sonuç verememe” şeklinde gelir ise eğer heparin veya aspirin? kullanıyor ise ve bu antikoagülan kullanımının hayati bir önemi yok ise (ülkemizde çok büyük oranda endikasyonu olmadan kullanılmaktadır) tedavinin bir hafta süre ile kesilip testin tekrarı uygun olacaktır. Bekleme süresinin diğer bir avantajı da (mümkün ise biraz daha uzun beklenilirse) gebelik haftası ilerledikçe fetal DNA fraksiyonunun artışından faydalanılmış olunur.

Eğer test tekrarı de aynı şekilde “sonuç verememe” olarak gelir ise diagnostik testlere gidilmesi önerilir.

İkiz gebeliklerde NIPT:

ACOG ve International Society For Prenatal Diagnosis (ISPD) NIPT in ikiz gebeliklerde aneuploidi taramasında kullanılmasına izin vermektedir (13, 17). NGS tabanlı metod zigosite hakkında da bilgi vermektedir (11). Tüm metodların ikiz gebeliklerde sensisitivitesi ve pozitif prediktif değerleri kabul edilebilir düzeyde başarılıdır. T21 için sensitivite %95-99, T13 ve T18 için %80-85 olup, yalancı pozitiflik oranı %0.1 civarındadır. Seks kromozomu aneuploidleri için aynı şeyleri söylemek mümkün olmayıp, hücre dışı DNA testinin seks kromozomu anormalliklerinin taramasında yeri sınırlıdır.

Üçüz gebeliklerde NIPT:

Üçüz gebelik insidansının düşük olması nedeni ile bu gebeliklerde sağlıklı NIPT verisi oluşturulmadığı için bu testin rutin olarak önerilmesi doğru değildir. Ancak, testin güvenilir olmadığına bilgilendirilmesi şartı ile gebeye seçenek olarak sunulabilir.

Sonuç olarak NIPT diğer tarama testleri ile karşılaştırıldığında açık ara yüksek sensitivite (hastalığı yakalama başarısı, düşük yalancı negatiflik), spesifisite (hasta olmayanları bulma başarısı, düşük yalancı pozitiflik) ve pozitif prediktif değere (düşük oranda yalancı pozitiflik) sahiptir. Buna karşın her tarama testinde var olan yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik sonuç vermesi nedeni ile tanısal testlere (CVS, amniosentez) bir alternatif değildir. Gebelerin bu konuda mutlaka çok iyi bilgilendirilmesi gereklidir.

Kaynaklar:

2. Chiu R.W.K, Akolekar R, Zheng Y.W.L, Leung T.Y, Sun H, Chan K.C.A, Lun F.M.F, Go A.T.J.I, Lau E.T, To W.W.K, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: Large scale validity study. BMJ 2011, 342, c7401

2. Raj Shree, Hayley J. Mackinnon, Joely Hannan, Teodora R. Kolarova, Jonathan Reichel, Christina M. Lockwood. Anticoagulation use is associated with lower fetal fraction and more indeterminate results. Am J Obstet Gynecol 2024;230(1):95e1-e10.

3. Joshua F. Nitsche, Daniel Lovell, Nicole Stephens, Sarah Conrad, Katherine Bebeau, Brian C. Brost. The effects of heparin, aspirin, and maternal clinical factors on the rate of nonreportable

- cell-free DNA results: a retrospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol MFM* 2023;5(3):100846.
4. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *PNAS USA*. 2008;105:16266–16271.
 5. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *PNAS USA*. 2008;105:20458–20463.
 6. Cirigliano V, Ordonez E, Rueda L, et al. Performance of the neoBona test: a new paired-end massively parallel shotgun sequencing approach for cell-free DNA-based aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;49:460–464.
 7. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *A J Obstet Gynecol*. 2012;206:319. e1–319. e9.
 8. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *A J Hum Genet*. 2013;92:167–176.
 9. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn*. 2012;32:1233–1241.
 10. Ryan A, Hunkapiller N, Banjevic M, et al. Validation of an Enhanced Version of a Single-Nucleotide Polymorphism-Based Noninvasive Prenatal Test for Detection of Fetal Aneuploidies. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40:219-223.
 11. Norwitz ER, McNeill G, Kalyan A, et al. Validation of a single-Nucleotide Polymorphism-Based Non-Invasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Zygosity, Individual Fetal Sex, and Fetal aneuploidy. *J Clin Med* 2019;8.
 12. van der Meij KRM, Sistermans EA, Macville MVE, et al. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-Invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 2019; 105:1091.
 13. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, Committee on Genetics, Society for Maternal-Fetal Medicine. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstet Gynecol* 2020;136:e48.
 14. Chitty LS, Wright D, Hill M, et al. Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units. *BMJ* 2016; 354:i3426.
 15. Wald NJ, Bestwick JP. Prenatal reflex DNA screening for Down syndrome: enhancing the screening performance of the initial first trimester test. *Prenatal Diagn* 2016; 36:328.

16. Wald NJ, Huttly WJ, Bestwick JP, et al. Prenatal reflex DNA screening for trisomies 21, 18, and 13. *Genet Med* 2018; 20:825.

17. Palomaki GE, Chiu RWK, Pertile MD, et al. International Society for Prenatal Diagnosis Position Statement: cell free (cf)DNA screening for Down syndrome in multiple pregnancies. *Prenat Diagn* 2021; 41:1222.