

Prenatal Taramada Serbest Fetal DNA

Cell-Free Fetal DNA in Prenatal Screening

Doruk Cevdi KATLAN,^a
Feride SÖYLEMEZ^a

^aKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Perinatoloji Servisi,
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 01.04.2016
Kabul Tarihi/Accepted: 16.05.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:
Doruk Cevdi KATLAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Perinatoloji Servisi, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
dcek2000@yahoo.com

ÖZET Maternal kanda bulunan ve esas olarak apoptotik trofoblastlar kaynaklı serbest fetal DNA'yı kullanan testlerden, prenatal taramada son yıllarda giderek artan şekilde faydalanılmaktadır. Bu testler doğru uygulandıkları ve yorumlandıkları sürece özellikle “trizomi 21” gibi sık görülen anöploidilerin taramasında günümüzde kullanılan en güvenilir testlerdir. Gebeliğin 10. haftasından sonra güvenle kullanılabilen serbest fetal DNA testleri kategorisinde birçok farklı alternatifler bulunmaktadır. Oldukça maliyetli olan bu testlerin her biri kendilerine özgü avantajları olan farklı genetik yöntemler kullanır ve yaklaşık %1-5'i sonuç vermeyebilir. Test sonuçsuzluğunun en önemli nedeni fetal fraksiyonun %4'ün altında oluşudur ve erken gebelik haftası, uygunsuz örnek alımı/saklanması, maternal obezite ve genetik yapı bozuklukları gibi nedenlerdir. Ticari kaygılar ve firmaların pazarlama metotları, bu testlerin klinik kullanımını etkilemekte, farklı metotlar kullanan tüm testlerin “her durumda” ve taramadan ziyade “tanısal amaçlı” kullanılabilceği yanılgısını yaratmaktadır. Yine bu etkiler, çok yüksek olan “belirleme oranı” gibi istatistiksel başarı parametrelerinin, “pozitif prediktif değer” gibi yorumlanarak yanlış değerlendirilmesi sonucunu doğurmaktadır. Bu çalışmada, maternal kanda serbest fetal DNA testlerinin gelişimi, güvenle kullanılabilceği hasta ve hastalık grupları, farklı testlerin kullandığı farklı genetik metotlar ve bunların birbirlerine olan üstünlükleri, testlerin tarama performansları, istatistiksel özellikleri, klinik kullanımını ve yorumlanması ile güncel bilgiler son literatür de göz önüne alınarak özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prenatal tanı; anöploidi

ABSTRACT Tests using the cell free fetal DNA in maternal blood originating primarily from apoptotic trophoblasts have been increasingly utilized in recent years. They are the most reliable ones among all prenatal screening tests for relatively frequent aneuploidies such as “trisomy 21”, as long as they are applied and interpreted precisely. There are many alternatives in the category of cell free fetal DNA tests, all of which are safely applicable after 10th gestational week. These tests with relatively high costs use different genetic test methods with method-specific advantages, but may result in test failures in 1-5% of cases. The primary cause of test failure is the percentage of fetal fraction lower than 4% which may be a result of sampling at early gestational weeks, inappropriate sample collection/preservation, maternal obesity and even defects in fetal genetic structure. Commercial concerns and marketing strategies of firms affect the clinical application of cell free fetal DNA tests and create the misunderstanding that tests using different genetic test methods may be applicable in “all conditions” for “diagnostic” purposes instead of screening. Similarly, these effects lead to unwarranted expectations as a result of the misinterpretation of statistical success parameters such as high “detection rates” to be perceived as “positive predictive values”. This review summarizes the latest information about the development of cell free fetal DNA tests, patient and disease groups for which these tests are safely applicable, different genetic test methods and their comparative advantages, screening performances, statistical characteristics, clinical application and interpretation of these tests in the light of current literature.

Maternal kanda bulunan serbest DNA, 50-200 baz çiftinden oluşan fragmanlar şeklinde bulunan çok parçalı genetik materyaldir.¹ Bu materyal anne ve fetüs kaynaklıdır. Fetal kaynağın önemli bir kısmı plasental sinsit-yotroblast hücrelerinin apoptozundan, bir kısmı da fetal eritroblastlardan gelmektedir.²⁻⁴ Apoptotik trofoblastlardan, maternal kanla dolu intervillöz boşluklara dökülen bu serbest nükleik asit dizileri, buradan maternal dolaşıma katılmaktadır. Maternal asıl kaynak ise maternal hematopoietik hücrelerdir.⁵ Ancak, maternal kökenli serbest DNA'ya diğer maternal dokular da katkı sağlamaktadır.

Yapılan ilk çalışmalarda, maternal kanda fetal hücreler aranmış, ancak çok başarılı sonuçlara ulaşılamamıştır.⁶ 1990'lı yılların sonunda maternal kanda serbest fetal DNA [cell free fetal DNA-(cffDNA)] varlığı saptanmış, akabinde bu alanda hızlı teknolojik gelişmeler yaşanmış ve cffDNA farklı tanısal amaçlarla (örneğin; Rh uyumsuzluklarında fetal kan grubu tayini vb.) kullanılmaya başlanmıştır.⁷ cffDNA kullanılarak ilk "trizomi 21" tanısı 2011 yılında konulmuştur.^{8,9} Sonraki yıllarda bu test, fetal cinsiyet tayini, diğer otozomal ve cinsiyet kromozomu anöploidileri saptamada kullanılır hâle gelmiştir. Gelişen teknoloji ile son iki yıldır cffDNA'dan, majör anöploidiler dışında, mikrodelyasyon-mikroduplikasyon sendromlarının ve hatta tüm genom ile ilgili kromozomal kusurların saptanmasında faydalanılmaktadır.

Maternal kanda cffDNA kullanılarak hastalık tanısına gidilmesi bu alanda çığır açıcı olmuş, başlangıçta amniyosentez ve koryon villüs örnekleme [chorionic villus sampling (CVS)] gibi invaziv prenatal tanı işlemlerine alternatif oluşturduğu düşünülmüştür. Bu nedenle testler, öncelikle non invaziv prenatal tanı (NIPT) testleri olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalar bu testlerin yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçları olabileceğini göstermiştir. Böylece bu testleri isimlendirmede "tanı" yerine "tarama" kelimesinin daha uygun olduğu görüşüne varılmıştır. Böylece NIPT kısaltması "non invaziv prenatal tarama"yı niteler hâle gelmiştir. Amniyosentez ve CVS gibi invaziv işlemler altın standart olarak tanısal değerini korumuş; ancak yaygın kullanımları, sadece NIPT pozitif gelen hasta

grubuna uygulanmaya başladıkça azalmaya başlamıştır. NIPT testi, pratik olarak anneden belirli miktarda kan örneği alınmasına dayalı bir testtir ve anne açısından fiziksel olarak bakıldığında yapılan diğer bir ve ikinci trimester tarama testlerinden (ikili test, üçlü test, dördümlü test vb.) farklı değildir. Testin bu özelliği, günümüzde başta Nicolaidis olmak üzere, bazı araştırmacıların kullanılan "non invaziv" tabirine karşı çıkmasına yol açmıştır. Bu görüşe göre NIPT'de, diğer prenatal tarama testleri kadar "invaziv" ya da "non invaziv"dir. Testin isimlendirilmesi konusunda doğru kullanım "Prenatal Serbest Fetal DNA Taraması/Testi" (cffDNA Test) olmalıdır.

cffDNA testi günümüzde giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Dünya üzerinde, bazı Orta Afrika, Orta Asya ve Orta Amerika ülkeleri hariç, geniş bir coğrafyada henüz maliyeti yüksek olsa da ulaşılabilir durumdadır.

SERBEST FETAL DNA

Maternal kanda bulunan serbest DNA'nın hastalık taramasında önemli olanı, fetal kökenli olan kısmıdır. Bu "fetal fraksiyon" en erken beşinci gebelik haftasından itibaren saptanabilmekle beraber, dokuzuncu gebelik haftasından itibaren yeterli düzeylere ulaşmaktadır.¹⁰ Yirminci gebelik haftasına kadar daha yavaş olarak (haftada yaklaşık %0,1) artış gösteren bu kısım, 20. haftadan sonra hızla (haftada yaklaşık %1,0) artmaktadır.¹¹ Fetal fraksiyonun %4'ün altında olması yetersiz olarak kabul edilmekte ve test sonuçsuzluğunun en önemli nedenini oluşturmaktadır.

Fetal fraksiyonun yetersiz olmasının başlıca nedenlerinden biri erken gebelik haftasıdır. Bu nedenle cffDNA testi için, gebeliğin 10. hafta üzerinde olması önerilmektedir. Duyarlılığı yüksek bir maternal serum tarama testi olan "kombine test" in uygulandığı dönem olan birinci trimester sonu ikinci trimester başında cffDNA, tüm serbest DNA'nın yaklaşık %13'ünü oluşturmaktadır.^{8,9,12} Bu oran, termde ya da terme yakın dönemlerde %50'ye kadar çıkabilmektedir.¹³

cffDNA'nın yarı ömrü yaklaşık 1 saat gibi kısa bir süredir. Doğumdan sonra iki gün içerisinde hızlıca maternal kandan temizlenmektedir.¹⁴ Bu nedenlerle maternal örneğin uygun alınması ve

serbest DNA'nın stabilize edilmesi güvenilir sonuçlar için hayati önem taşımaktadır. Uygun alınıp saklanmayan bir örnekteki maternal beyaz kürelerin parçalanması fetal DNA'yı önemli ölçüde seyreltecek ve yetersiz fetal fraksiyona yol açabilecektir. Bu amaçla iki farklı tüp kullanılabilir. Maternal kan, EDTA (etilendiamin tetraasetikasit) içeren mor kapaklı tüplere alınır ise 6 saat içinde santrifüj edilmeli ve elde edilen plazma -80 °de muhafaza edilmelidir. Özel DNA tüpleri kullanılır ise (Cell-Free DNA BCT) örnek, oda sıcaklığında beş güne kadar bozulmadan saklanabilmektedir.

Fetal fraksiyon üzerine olumsuz etki yapan diğer bir faktör maternal obezitedir. Dolaşımda kısmen sabit miktarda bulunan cffDNA, kilolu hastaların artan plazma hacmine bağlı olarak seyretmektedir. Ek olarak, obez hastalarda maternal dokuların fazlalığı maternal kökenli serbest DNA'nın da artışına yol açmaktadır. Bu nedenlerle, maternal kilo ve dolayısıyla beden kitle indeksi (BKİ) arttıkça fetal fraksiyon azalmaktadır. Bir çalışmada, yetersiz fetal fraksiyon oranı 60 kg'ın altındaki gebelerde %0,2 olarak bulunur iken, bu oran 110 kg'ın üzerinde kiloya sahip gebelerde %10,5 olarak saptanmıştır. Bütün hasta grubu incelendiğinde ise gebelerin yaklaşık %1,1'inde fetal fraksiyon yetersiz olarak gözlenmiştir.¹⁵ Maternal kilonun 80 kg üzerinde olması yetersiz fetal fraksiyon için bir risk faktörü olarak kabul edilebilmektedir.

Fetal ve dolayısıyla plasental genetik yapıdaki bozuklukların da fetal fraksiyon üzerine etkili oldukları gösterilmiştir. Gebeliğin 10-20. haftalarında, öploid fetüslarda, maternal dolaşımdaki tüm serbest DNA'nın yaklaşık %13'ünü oluşturan cffDNA; Down sendromlu (Trizomi 21) fetüslarda yaklaşık %15'ini, Edwards Sendromlu (Trizomi 18) fetüslarda yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır. Bu oran triploid fetüslarda %2,5-2,8 seviyelerine kadar düşmektedir. Patau (Trizomi 13) ve Turner (Monozomi X) sendromlu fetüslarda ise öploidlere yakın olmakla birlikte daha düşük cffDNA oranları saptanmıştır.^{16,17} Sadece bu özellik bile, ilerleyen kısımlarda bahsedilecek olan cffDNA testinin Down sendromu vakalarındaki yüksek belirleyicilik oranını açıklamaya yardımcı olabilmektedir. Klinik açıdan bakıldığında ise herhangi bir ek risk faktörü bulunmayan (obezite, uygun olmayan

örnek alımı ve erken gebelik haftası vb.) hastalarda raporlanacak çok düşük fetal fraksiyon oranları, başta triploidi olmak üzere anöploidiler açısından uyarıcı olmalıdır. İdeal bir cffDNA testinde, fetal fraksiyonun test sonuç raporunda belirtiliyor olması, bu nedenle de ayrıca önemlidir.

GENETİK TEST METOTLARI

cffDNA testi olarak, farklı firmaların farklı ticari isimlerle piyasaya sürdükleri birçok test alternatifi mevcuttur. Bu testler, serbest DNA'yı saptama amaçlı olarak birkaç farklı metot kullanır. Çoğunda temel metot, maternal kandaki serbest DNA'nın ne kadarının hangi kromozomdan geldiğinin belirlenmesidir. Anne ve fetüsün öploid olduğu durumlarda bu oranlarda bir değişiklik olması beklenmez. Ancak, fetal anöploidi durumlarında bu oranlar fetal fraksiyona da bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin, öploid ve gebe olmayan bir hastanın kanındaki serbest DNA'nın yaklaşık %1,3'ü 21. kromozomdan gelmektedir. Bu hasta gebe kaldığında, fetüs eğer öploid ise anne kanındaki toplam (maternal + fetal) serbest DNA içinde 21. kromozomdan gelenlerin oranı aynı (%1,3) olacaktır. Fetüsün Down sendromlu (Trizomi 21) olması hâlinde, cffDNA içerisinde 21. kromozom kaynaklı parçalar artacak ve bu durum fetal fraksiyona bağlı olarak, anne kanı toplam serbest DNA'sındaki 21. kromozom kökenli parça oranını etkileyecektir.^{9,18}

Matematiksel olarak formüle etmek gerekirse trizomi durumlarında; "Trizomik kromozoma ait parça yüzdesi= O kromozoma ait normal parça yüzdesi x (1 + fetal fraksiyon/2)" şeklinde ifade edilebilmektedir. Örneğin; trizomi 21'li bir fetüs varlığında fetal fraksiyon %10 ise maternal kanda beklenen 21. kromozom kaynaklı toplam serbest DNA parçası oranı $1,3 \times (1+0,1/2) = 1,365$ olacaktır. Fetal fraksiyon %4 ise bu oran $1,3 \times (1+0,04/2) = 1,326$; fetal fraksiyon %2 ise bu oran $1,3 \times (1+0,02/2) = 1,313$ olarak hesaplanacaktır. Görüldüğü üzere, fetal fraksiyon azaldıkça anöploid fetüs kaynaklı fazla kromozomun toplam serbest DNA'ya katkısı azalmakta ve sonuç olarak bu "azalan farkı" belirlemek de zorlaşmaktadır. Bu nedenle, fetal fraksiyonun önemi ve doğrudan testin belirleme oranı üzerindeki etkisi bir kez daha vurgulanmalıdır.

Serbest DNA fragmanlarının hangi kromozoma ait olduğunu belirlemede en sık kullanılan metot “dizileme” (sequencing) metodudur.⁷ Dizileme, DNA fragmanlarının eldeki mevcut haritalanmış fragmanlarla karşılaştırılarak rastgele dizildiği “saçma dizileme” (shotgun sequencing) veya sadece ilgilenilen belirli kromozomlara ait parçaların zenginleştirilerek dizildiği “hedefli dizileme” [targeted sequencing, chromosome selective sequencing (CSS)] şeklinde uygulanabilmektedir. Gelişen teknolojiyle birlikte, dizileme teknikleri de gelişmiş, günümüzde daha çok “tüm genom dizileme” [whole genome sequencing (WGS)] ve “yeni nesil dizileme” [next generation sequencing (NGS)] metotları kullanılır hâle gelmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri arasında yer alan “kitlesel paralel dizileme” [massively parallel sequencing (MPS)] metodu, birçok test tarafından kullanılmakta olan bir metottur.⁹

Serbest DNA fragmanlarının hangi kromozoma ait olduğunu belirlemede uygulanan diğer bir metot ise hedef kromozomlardaki kişiye özgü “tek nükleotid polimorfizmleri” [single nucleotide polymorphisms (SNPs)] ni kullanır. Alınan kan örneğindeki beyaz kürelerden belirlenen maternal SNPs genotipleri, maternal plazmadaki serbest DNA fragmanları içerisinde maternal olanların tanınip ayrılmasını ve böylece cffDNA parçalarının izole edilebilmesini sağlamaktadır. Böylece, fazla veya eksik olan fetal kromozomlar, SNPs paternlerinde değişikliğe yol açarak belirlenir hâle gelmektedir.¹⁸

Bu metodu kullanan cffDNA testlerinin, klasik dizileme metotlarını kullanan testlere göre bazı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Triploidi va-

kalarında, tüm kromozomlardan gelen serbest DNA parçaları aynı oranda, ancak az düzeyde arttığı ve dizileme metotları fetal DNA’yı izole edemediği için, SNPs kullanan testler kullanılabilir. Yumurta bağışi ile sağlanan gebeliklerde, taşıyıcı anne vakalarında, organ nakil alıcısı gebe kadınlarda, maternal plazmada farklı SNPs profiline sahip karışıklığa yol açabilecek ilave kromozomlar bulunacağından, orana dayalı dizileme metotları kullanan testler taramada daha başarılıdır.¹⁸ Çoğul gebeliklerde ise orana dayalı dizileme metotları kullanan testler fetüs sayısına “kör”dür. İkiz gebeliklerde, SNPs metodu sadece dizigotik ikiz gebelik varlığını belirleyebilmektedir. Bu durum, çoğul gebeliğin klinik olarak saptanmasından önce, erken gebelik haftalarında ikiz eşinin öldüğü “kaybolan ikiz” (vanishing twin) durumlarında klinik avantaj sağlayabilmektedir.¹⁹

Ülkemizde ulaşılabilir olan bazı cffDNA testleri, ticari isimleri ve kullandıkları genetik test metotları ile Tablo 1’de görülmektedir.

TEST PERFORMANSI VE İSTATİSTİKSEL ÖZELLİKLERİ

Bütün tarama testlerinde olduğu gibi, cffDNA testinin de tarama performansını değerlendirirken kullanılan başlıca parametreler “belirleme oranı” [detection rate (DR)] ve “yalancı pozitiflik oranı” [false positive rate (FPR)] dır. Yüksek bir DR ve düşük bir FPR’ye sahip tarama testi başarılı bir testtir. cffDNA testi de bu nedenle çok başarılı bir tarama testi olarak kabul edilebilmektedir. Ancak, cffDNA testinin %1-5 arasında sonuçsuz kalabileceğini ve bu testin otozomal anöploidilere göre cin-

TABLO 1: Ülkemizde ulaşılabilir olan bazı serbest fetal DNA testleri, ticari isimleri ve kullandıkları genetik test metotları.

Genetik test metodu	cffDNA testi ticari adı
Hedefli dizileme (Kromozom selektif dizileme)	“Harmony”
Tüm genom dizileme	“Tranquility”
Yeni nesil dizileme (Kitlesel paralel dizileme)	“PrenaTest” “MaterniT21” “Verifi” “Nace” “NIFTY”
Tek nükleotid polimorfizmleri metodu	“Panorama”

cffDNA: Serbest fetal DNA.

siyet kromozomu anöplidilerinde daha az başarılı olduğunu akılda tutmak gerekmektedir.

2015 yılında "Ultrasound in Obstetrics & Gynecology" dergisinde yayımlanan meta-analize göre, cffDNA testi DR ve FPR değerleri sırasıyla; trizomi 21 için %99,2 ve %0,09; trizomi 18 için %96,3 ve %0,13; trizomi 13 için %91,0 ve %0,13; monozomi X için %90,3 ve %0,23; diğer cinsiyet kromozomu anöplidileri (47 XXX, 47 XXY, 47 XYY) için %93,0 ve %0,14 olarak bildirilmiştir. İkiz gebeliklerde ise trizomi 21 için DR %93,7, FPR %0,23 olarak hesaplanmıştır.²⁰

Aynı data, test tekrarına rağmen çözülmeyen test sonuçsuzlukları da dâhil edilerek ve trizomilerin sıklıkları ile uyumlu ağırlıklandırma yapılarak incelendiğinde, otozomal trizomiler açısından genel DR %97,0 ve toplam FPR %1,25 olarak belirtilmiştir. Bu incelemeye göre, trizomi 21 için DR %98,6, FPR %1,01; trizomi 18 için DR %94,9, FPR %0,14 ve trizomi 13 için DR %91,3, FPR %0,14 olarak hesaplanmıştır.¹⁸

Test sonuçsuzluğu, cffDNA testi için önemli bir sorundur. Laboratuvara göre değişmekle birlikte %1-5 arasında bildirilmektedir. Cinsiyet kromozomu testleri için bu oranlar daha yüksek olarak (%4-7) rapor edilmiştir.²¹⁻²³ Durumların üçte ikisinde testin yeni bir örnekle tekrarlanması sonuçsuzluk durumunu ortadan kaldırmaktadır.

Test sonuçsuzluğunun en önemli nedeni, bu durumların %50'sinden sorumlu olan, fetal fraksiyonun düşük (<%4) olmasıdır. Diğer nedenlerin çoğu laboratuvarın çalışma metodolojisine ve önceliklerine bağlıdır. Örneğin; önceliği FPR ve negatif sonuçları mümkün olan en alt seviyeye indirgeme olan merkezlerin test sonuçsuzluk oranları daha yüksek olacaktır. Benzer şekilde, tek örnekle çalışan laboratuvarların test sonuçsuzluk oranları yedek örnekle çalışan merkezlere göre daha fazladır.¹⁸ Bu nedenle cffDNA testi tercih ederken dikkat edilecek diğer bir nokta da laboratuvar seçimidir. Laboratuvarlar, test sonuçsuzluk oranları açısından irdelenmelidir. Belirtilen oranların sadece otozomal veya cinsiyet kromozom testleri sonuçsuzluk oranları mı, yoksa toplam oranlar mı olduğu, yedek maternal örnek alınıp alınmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

cffDNA testi sonuçsuzluğu hâlinde yönetim, hâlen standart bir yaklaşımın olmadığı, belirsizliğini koruyan tartışmalı bir konudur. Bu hâllerde, cffDNA testinin tekrarlanması ya da yapılmamışsa bir veya ikinci trimester standart serum tarama testlerinin uygulanması gibi yaklaşımlar mevcuttur. Ancak, fetal patolojinin doğası gereği fetal fraksiyonun düşük olabileceği (triploidi vb.) ve bu durumun test sonuçsuzluğuna yol açabileceği akılda tutulmalıdır.¹⁷ Test tekrarının maliyeti de düşünüldüğünde, sonuçsuzluk hâllerinde invaziv prenatal tanı işlemlerinin tercih edilmesi başka bir seçenek olarak ortaya çıkmakta ve uygulanmaktadır.

Diğer tüm tarama testlerinde olduğu gibi, cffDNA testi sonuçları da tanısal test sonuçlarıyla uyumlu olmayabilmektedir. Bu durumlar; fetüs etkilenmemiş olduğu hâlde cffDNA testinin bir kromozomal anormalliği işaret ettiği FPR veya cffDNA testi normal kromozom yapısı lehine sonuçlandığı hâlde fetüsün etkilenmiş olduğu "yalancı negatiflik" şeklinde ortaya çıkabilmektedir.

Maternal dolaşımdaki cffDNA'nın esas kaynağı plasental hücreler olduğu için, test sonuçları aslında plasental genetik yapıyı yansıtmaktadır. Oysa CVS deneyiminden elde edilen bilgi plasental ve fetal dokuların genetiğinin %1-2 sıklıkla farklı olabileceğini ortaya koymaktadır.^{24,25} Bu durum, plasentayla sınırlı mozaiklik olarak adlandırılmaktadır. Sonuçta cffDNA testi; fetüsün öplid, plasentanın anöplid olduğu hâllerde FPR; fetüsün anöplid, plasentanın öplid olduğu hâllerde de yalancı negatif sonuçlar vermektedir. Aslında, her iki durumda da test analitik olarak doğru, klinik olarak yanlıştır. Yanlış negatif test sonuçları, trizomi 21 için olmasa da özellikle trizomi 13-18 için bildirilmiştir.²⁶

Bu durum dışında cffDNA testinin FPR olarak sonuçlanmasına yol açabilecek nedenler, yalancı negatifliğe yol açabilecek nedenlere göre daha çok sayıda ve daha olasıdır. İkiz gebeliklerde tek fetüs kaybedilse bile, bir süre daha her iki plasentadan maternal dolaşıma cffDNA salınımı devam etmektedir. Kaybedilen fetüsün anöplid olması, testin sağlıklı fetüs açısından yanlış pozitif sonuçlanmasına yol açabilmektedir.¹⁹ Bu durum, özellikle çoğul gebeliğin klinik olarak saptanmasından önce, erken

gebelik haftalarında, ikiz eşinin öldüğü “kaybolan ikiz” hâllerinde klinik olarak önemlidir. SNPs metodu kullanan testler, ikiz eşinin dizigotik olması hâlinde, farklı cffDNA’yı saptayıp kaybolan ikiz karmaşasını çözebilmektedir.

Çoğu cffDNA testi (orana dayalı dizileme metodları kullananlar), maternal karyotipin normal olduğu varsayımına dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar durumun aslında bahsedildiği gibi olmayabileceğini ispatlamıştır. Bazı hastalar tamamen normal görünseler de mozaik olmayan maternal cinsiyet kromozomu anormalliklerine sahiptir (örneğin; 47 XXX).²⁷ Bazılarında ise kromozomları normal olsa bile, artan yaşla birlikte hücrelerinin bir kısmı tek X kromozomunu kaybetmektedir.²⁸ Bu gibi bozukluklar cffDNA testleri tarafından fetüse atfedilmekte ve FPR sonuçların ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

Maternal genetik yapının öploide olduğu bireylerde bile, belirli bir kromozom üzerindeki genetik madde miktarı, kalıtsal ya da de novo gelişen kopya sayısı farklılıklarının bir sonucu olarak değişkendir. Bazı genom bölgelerinin selim delesyon ve duplikasyonları bu duruma yol açmaktadır. Bir duplikasyonun kısmen büyük bir düzeyde ve ilgi alanındaki kromozomlardan birinde gerçekleşmesi, o kromozoma ait serbest DNA fragman miktarının artması ve böylece FPR bir test sonucunu doğurmaktadır.²⁹ Çok daha nadir olarak, kısmen büyük düzeyde selim bir maternal delesyonun, aynı kromozom açısından anöploide bir fetüs varlığı ile eş zamanlı bulunması da bir yalancı negatif test sonucu nedenidir.

Maternal kandaki serbest DNA içerisinde tüm maternal dokulara ait fragmanlar bulunabilmektedir. Buna, maternal tümöral dokular da dâhildir. Özellikle, eş zamanlı saptanan birden fazla anöploide varlığında maternal kanser olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.^{30,31} Yapılan bir çalışmada, cffDNA testi uygulanan 125.000 gebe hastanın 39’unda birden fazla anöploide saptanmış, bunların yedisine gebelik sırası veya sonrasında kanser tanısı konmuştur (1/18.000).³¹ Bunlar, nöroendokrin, hematolojik (lösemi, lenfoma) ve gastrointestinal (kolorektal, anal) neoplaziler olarak sayılabilmektedir. Veri azlığı ve gebeler üzerinde

yaratabileceği olumsuz duygusal etki göz önüne alındığında, cffDNA testi bir kanser tarama testi olarak kabul edilmemelidir. Ancak maternal kanserin, FPR test sonucuna yol açabileceği de akılda tutulmalıdır.

Uyumsuz test sonuçlarına teknik nedenler de yol açabilmektedir. Örneklerin karışması veya diğer teknik hatalar, yedek örneğin kullanımı veya test tekrarı ile çözümlenebilmektedir. Bazı anöploidlerin belirlenmesi ise teknik olarak zordur. Örneğin, 13. kromozomun düşük guanin-sitozin içeriği polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] basamaklarını etkilemekte ve dizileme güvenilirliğini azaltmaktadır. Bu durum yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir.¹⁸

Plasentaya sınırlı mozaiklik, maternal kopya sayısı farklılıkları ve teknik nedenlere ilave olarak diğer bir yalancı negatiflik nedeni de fetal fraksiyonun %4-5 gibi sınırdan düşük olmasıdır. Daha önce de vurgulandığı üzere, fetal fraksiyon azaldıkça anöploide fetüs kaynaklı fazla kromozomun toplam serbest DNA’ya katkısı azalmakta ve sonuç olarak bu azalan farkı belirlemek de zorlaşmaktadır.

TESTİN KLİNİKTE KULLANIMI VE YORUMLANMASI

Buraya kadar vurgulanan DR ve FPR gibi parametreler, bir tarama testinin performansını gösteren istatistiksel özellikleridir. Bunlar, hastalığın toplumdaki prevalansından ve bu prevalansı değiştirebilecek risk gruplarından etkilenmemektedir. Örneğin; DR (=sensitivite, =duyarlılık), bir toplumdaki “hastaların ne kadarında testin pozitif olduğunu” belirtmektedir. Oysa klinik kullanımda, hekim ve hasta açısından “test pozitif çıkanların ne kadarının hasta olduğu” bilgisi daha kıymetli ve kullanışlıdır. Bu oran, pozitif prediktif değer [positive predictive values (PPV)] olarak adlandırılmaktadır. Benzer şekilde, “test negatif çıkanların ne kadarının gerçekten hasta olmadığı” bilgisi de negatif prediktif değer [negative predictive values (NPV)] olarak ifade edilmektedir. PPV ve NPV, hastalık prevalansı ve dolayısıyla risk gruplarından etkilenmektedir.

cffDNA testleri özelinde ise ticari kaygılarla, firmalar tarafından DR ve PPV arasındaki yukarıda bahsedilen fark yeterince vurgulanmamaktadır. Bu durum hekimler ve hastalar arasında, çok yüksek olan DR gibi istatistiksel başarı parametrelerinin, PPV niyetine, klinik olarak yorumlanması yanlışına yol açmaktadır. Testlerin ilk uygulanmaya başlandığı dönemlerde ortaya çıkan, hatırı sayılır FPR sonuçlarının yarattığı ilk şaşkınlık, bu yanlış algıdan kaynaklanmıştır.³²

Fetal anöploidi taramasında cffDNA testleri PPV ve NPV değerleri, test bazında DR ve FPR değerlerinin küçük farklılıklar göstermesi nedeni ile, kayda değer olmayan minimal farklar gösterebilmektedir. Fetal anöploidi prevalansının düşük olması nedeni ile NPV her durumda $\geq 99,9$ ve çok yüksektir.¹⁸ Yüksek spesifisite (özgüllük) ve NPV, gereksiz invaziv tanısal işlem oranlarını önemli oranda azaltıcı ve “neredeyse tanısal” denebilecek ölçüde hasta ve hekimi rahatlatıcıdır. PPV için durum farklıdır. Eylül 2015 tarihli “American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)” rehberinden uyarlanan, Tablo 2’de görüldüğü gibi PPV, risk gruplarına ve taranan anöploidi tipine göre değişiklik göstermekte, ancak her durumda DR bazlı düşünülen ve bazı laboratuvarlar tarafından rapor edilen yüksek ferdi risk değerlerinin altında kalmaktadır.³³ Ancak bu durum, cffDNA testlerinin, standart serum tarama testlerinin en başarılı olan “kombine test”e göre çok daha yüksek DR ve PPV’ye sahip ve günümüz şartlarında en güvenilir tarama testi olduğu gerçeğini değiştirmemektedir. Tablo 2’ye göre yorum yapılırsa, 25 yaşındaki düşük riskli gebeler için cffDNA test sonucu pozitif geldiğinde, fetuslarının ancak 3 (%33)’ünden gerçekten Down sendromu tanısı almaktadır. Bu

oran, 40 yaşındaki gebelerde %87’ye kadar yükselmektedir. Trizomi 21 dışındaki diğer anöploidiler için PPV’ler daha da düşüktür.

Bir tarama testi klinik pratikte, bir hastalığın taramasında ilk aşama test olarak “primer tarama” amaçlı veya o hastalık açısından ilk tarama pozitif gelen hasta grubuna daha güvenilir, ancak yine de tanısal olmayan “sekonder tarama” amaçlı kullanılabilir. cffDNA testinin primer tarama amaçlı toplum bazlı kullanımı hiçbir profesyonel organizasyon tarafından önerilmemektedir. Bunda, cffDNA testlerinin yüksek maliyeti, testlerin sadece belirli kromozomlara ait problemlere yönelik oluşu, test öncesi yeterli ve uygun danışmanlık hizmeti sağlama zorluğu, %1-5 arasında değişen test sonuçsuzluğuna yaklaşımda görüş birliği olmaması ve klinik önemi-ciddiyeti tartışmalı cinsiyet kromozom anöploidileri taranması konusundaki belirsizlik gibi faktörlerin etkisi bulunmaktadır.¹⁸

cffDNA testinin, sekonder tarama amaçlı kullanımında ise “primer tarama” testinin ne olacağı yine tartışılan bir konudur. Bu amaçla, anne yaşının doğumda ≥ 35 olması, anormal sonuçlanan serum tarama testleri, artmış risk belirten ultrason bulguları (ense saydamlığının artışı vb.), ailede veya önceki çocukta anöploidi öyküsü varlığı gibi yüksek riskli grubu seçen tarama parametreleri tercih edilebilmektedir.^{33,34} Nicolaidis grubu (The Fetal Medicine Foundation), primer tarama amaçlı ilk trimester kombine testi kullanmaktadır. Yüksek risk grubuna giren (kombine riski $\geq 1/100$ olan) gebelere invaziv tanı testi, orta risk grubuna (kombine riski $1/100-1/1.000$ veya 2.500) cffDNA testi, düşük risk grubuna da (kombine riski $< 1/1.000$ veya 2.500) ek test yapılmaksızın takip önerilmektedir. Düşük risk grubu için $1/2.500$ sınırı daha başarılı olsa da $1/1.000$ veya $1/2.500$ li-

TABLO 2: Yorumlanabilir bir sonuç elde edilen serbest fetal DNA testlerinin farklı maternal yaş gruplarındaki performans özellikleri (Eylül 2015 tarihli ACOG rehberinden uyarlanmıştır).

	Sensitivite-DR (%)	Spesifisite (%)	25 yaş için PPV (%)	40 yaş için PPV (%)
Trizomi 21	99,3	99,8	33	87
Trizomi 18	97,4	99,8	13	68
Trizomi 13	91,6	99,9	9	57

DR: Belirleme oranı; PPV: Pozitif prediktif değer; ACOG: American Congress of Obstetricians and Gynecologists.

mitlerinden hangisinin seçileceği, ilgili ülkenin cffDNA testinin getireceği maliyeti karşılayabilme gücüne bırakılmıştır.³⁵

cffDNA testleri günümüzde bazı mikrodelsiyon/duplikasyon sendromlarının taramasında da kullanılabilir. Di George (22q11.2 delesyonu), 1p36 delesyon, Cri-du-Chat (5p delesyonu), Prader-Willi (paternal 15q delesyonu) ve Angelman (maternal 15q delesyonu) sendromları bunların başlıcaları olarak sayılabilir. Farklı metotları kullanan testlerin bazı avantaj ve dezavantajları olsa da delesyon veya duplikasyonun büyük olduğu durumlarda (≥ 3 megabaz) tüm metotlarda belirleyicilik yüksektir. Ancak, bu sendromlar için vaka sayıları az, takip zor ve prevalanslar belirsiz olduğu için güvenilir DR, FPR ve PPV değerleri hesaplanamamaktadır. Günümüzde cffDNA testlerinin bu sendromların taramasında rutin olarak kullanımını ise hiçbir profesyonel organizasyon önermemektedir.¹⁸

SONUÇ

cffDNA testi, günümüz koşullarında, tamamen aile isteğine bağlı ve uygun danışmanlık sonrasında uygulanması gereken, maliyetli ancak başarılı bir tarama testidir. Tüm genetik sendrom ve anöploidilerden ziyade belirli kromozomlara ait patolojileri tarayan, sonuç olarak patolojinin varlığı veya yokluğunu değil, hastanın düşük ya da yüksek risk grubunda olduğunu belirten ve kesin tanı için amniyosentez ve CVS gibi invaziv tanı işlemlerine gereksinim duyulan testlerdir. Nöral tüp defektleri ve diğer majör fetal anomalilerin tanısı için gerekli olan ultrasonografik inceleme ve maternal serum alfa-fetoprotein gibi testlere alternatif ve bunların

gerekliliğini ortadan kaldıran testler değildir. Tersine, majör yapısal fetal anomali saptandığında, cffDNA yerine, doğrudan tanısal invaziv işlemler ve genetik inceleme (\pm mikroarray) tercih edilmelidir. Test performansı ikiz gebeliklerde, tek fetüslü gebelikler kadar olmasa da oldukça iyidir. Yine de ACOG gibi bazı organizasyonlar, çoğul gebelikler için cffDNA testi kullanımını henüz önermemektedir.

Hastalar, testin maliyeti (özel/kamu sigortalarının kapsamı), sonuç alma süresi (7-10 gün) ve olası tesadüfi bulgular (maternal malignansi veya anöploidi vb.) gibi konularda detaylı olarak bilgilendirilmelidir. Özellikle, 80 kilonun üzeri anne adaylarına artmış test sonuçsuzluk riski vurgulanmalıdır. Hekimler ise tercih edilen laboratuvar ve testin genetik test metodu, bu metodun klinik amaca uygunluğu, avantaj ve dezavantajları, raporlama şekli (fetal fraksiyon raporda belirtilmeli), test sonuçsuzluk oranları ve bunların içeriği hakkında bilgili-bilinçli olmalı; firmaların ticari etkilerinden ve bu testlerin medikal olmayan kullanımlarından (fetal cinsiyet belirleme) kaçınılmalıdır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Doruk Cevdi Katlan, Feride Söylemez; **Tasarım:** Doruk Cevdi Katlan; **Denetleme/Danışmanlık:** Feride Söylemez; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Doruk Cevdi Katlan; **Analiz ve/veya Yorum:** Feride Söylemez, Doruk Cevdi Katlan; **Kaynak Taraması:** Doruk Cevdi Katlan; **Makalenin Yazımı:** Doruk Cevdi Katlan, Feride Söylemez; **Eleştirel İnceleme:** Feride Söylemez; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Doruk Cevdi Katlan; **Malzemeler:** Doruk Cevdi Katlan, Feride Söylemez.

KAYNAKLAR

1. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;50(1):88-92.
2. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000;20(11):886-9.
3. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. *Am J Pathol* 2006;169(2):400-4.
4. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8(9):864-70.
5. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002;48(3):421-7.

6. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993;91(5): 427-32.
7. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350(9076):485-7.
8. 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.
9. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13(11):913-20.
10. Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18(8): 1733-6.
11. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013;33(7):662-6.
12. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, van den Boom D, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem* 2010;56(10): 1627-35.
13. 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(4):768-75.
14. 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(1):218-24.
15. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33(7):667-74.
16. Nicolaides KH, Syngelaki A, del Mar Gil M, Quezada MS, Zinevich Y. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 2014;35(3): 212-7.
17. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, van den Boom D, Ehrich M, Deciu C, et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn* 2015;35(3):289-93.
18. Palomaki GE, Messerlian GM, Halliday JV (authors), Wilkins-Haug L (section editor), Barss VA (deputy editor). Prenatal screening for down syndrome using cell-free DNA. *UpToDate Waltham, MA. Topic* 2016;458:1-19.
19. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212(1):79.e1-9.
20. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(3):249-66.
21. Hooks J, Wolfberg AJ, Wang ET, Struble CA, Zahn J, Juneau K, et al. Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *Prenat Diagn* 2014;34(5):496-9.
22. Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, Wang H, Jensen T, Tynan J, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013;33(6): 591-7.
23. Samango-Sprouse C, Banjevic M, Ryan A, Sigurjonsson S, Zimmermann B, Hill M, et al. SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn* 2013;33(7):643-9.
24. Kalousek DK, Vekemans M. Confined placental mosaicism. *J Med Genet* 1996;33(7): 529-33.
25. Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Pompili E, Izzi C, Martinoni L, et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn* 2015;35(11): 1117-27.
26. Kalousek DK, Barrett IJ, McGillivray BC. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am J Hum Genet* 1989;44(3):338-43.
27. Yao H, Zhang L, Zhang H, Jiang F, Hu H, Chen F, et al. Noninvasive prenatal genetic testing for fetal aneuploidy detects maternal trisomy X. *Prenat Diagn* 2012;32(11):1114-6.
28. Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem* 2014;60(1):251-9.
29. Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, Coe BP, Henson JM, Daza RM, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med* 2015;372(17):1639-45.
30. Amant F, Verheecke M, Wlodarska I, Dehaspe L, Brady P, Brison N, et al. Presymptomatic identification of cancers in pregnant women during noninvasive prenatal testing. *JAMA Oncol* 2015;1(6):814-9.
31. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, et al. Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *JAMA* 2015;314(2): 162-9.
32. Mennuti MT, Cherry AM, Morrisette JJ, Dugoff L. Is it time to sound an alarm about false-positive cell-free DNA testing for fetal aneuploidy? *Am J Obstet Gynecol* 2013;209(5):415-9.
33. Committee Opinion No. 640: Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2015;126(3):e31-7.
34. Neufeld-Kaiser WA, Cheng EY, Liu YJ. Positive predictive value of non-invasive prenatal screening for fetal chromosome disorders using cell-free DNA in maternal serum: independent clinical experience of a tertiary referral center. *BMC Med* 2015;13:129.
35. Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaides KH. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47(1):45-52.