YANLIŞ NEGATİF QF-PCR VE TRİZOMİ 18-TRİZOMİ 9 MOZAİZM

Ebru DİKENSOY[1], Özcan BALAT[1], Sacide PEHLİVAN[2], Fatma Bahar CEBESOY[1], Ali İrfan KUTLAR[1], Tuğçe SEVER[2], Volkan BALTACI[3]

[1] Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı, Gaziantep
[2] Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı, Gaziantep
[3] Gen-art Kadın Sağlığı ve Reproduktif Bioteknoloji Merkezi, Ankara

ÖZET

Major kromozomal anöploidilerin hızlı prenatal tanısında Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) yöntemi literatürde oldukça etkin (%95), güvenli ve düşük maliyetli olarak gösterilmiştir. Mozaik trizomilerde QF-PCR ve karyotipleme yöntemleri arasında % 0.2 oranında uyumsuzluk varlığı bildirilmiştir. Bizim olgumuz; 17. gebelik haftasında triple testinde trizomi 18 riskinin 1/50 olması nedeniyle kliniğimize gönderilmişti. Yapılan ultrasonografide fetusta bilateral koroid pleksus kistleri ve bilateral pelviektazi olduğu saptandı. Amniotik sıvıdan yapılan QF-PCR analizi; normal kromozomal yapı gösterdi ancak sitogenetik analizde fetusta trizomi 18 ve trizomi 9 mozaizm olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: *mozaik trizomiler, prenatal tanı, QF-PCR yöntemi*

Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), *2011; Cilt: 8 Sayı: 1 Sayfa: 67- 70*

SUMMARY

A FALSE NEGATIVE QF-PCR AND TRISOMY 18-TRISOMY 9 MOSAICISM

Using QF-PCR for rapid prenatal diagnosis of major chromosome aneuploidies demonstrated that the method is highly efficient, reliable and cost effective in the literature. A discrepancy has been showed between QF-PCR and karyotyping results as 0.2% in mosaicism.Our case was in 17 th gestational week who referred to our clinic for having a trisomy 18 risk as 1 in 50 in triple test.On the ultrasonography, we detected bilateral choroid plexus cysts and bilateral pyelectasia.After amniocentesis QF-PCR has been showed a normal chromosomal patern and cytogenetic analysis has been showed trisomy 18 and trisomy 9 mosaicism.

Key words: *mosaic trisomies, prenatal diagnosis, QF-PCR method*

Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), *2011; Vol: 8 Issue: 1 Pages: 67- 70*

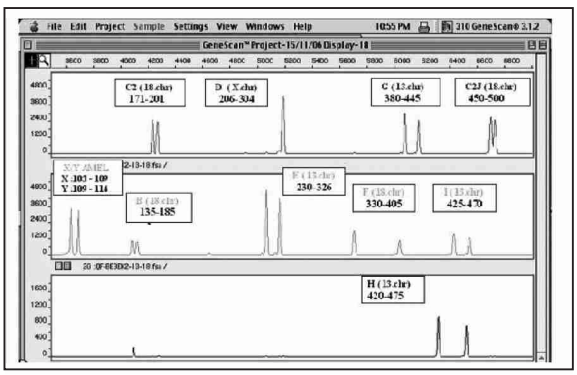
Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Ebru Dikensoy. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gaziantep
Tel.: (0533) 496 20 77
e-posta: ebrudikensoy@yahoo.com
Alındığı tarih: 12.08.2009 revizyon sonrası alınma: 06.04.2010, kabul tarihi: 15.04.2010, online yayın tarihi: 15.12.2010

GİRİŞ

Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR) analizi; örneğin alımından sonraki birkaç saat içinde majör sayısal anomalileri (kromozom 13,18,21,X ve Y) belirleyen, son 15 yıl içinde kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir[1]. Amniyotik sıvı da trizomilerin analizi kromozoma spesifik küçük DNA dizilerinin çoğaltılması (3,4,5'li tekrarları içeren Short Tandem Repeat (STR) markırları kullanılarak) ve kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilmesi esasına dayanır. Kromozoma spesifik olarak seçilen 17 STR marker kullanılırken bunların 1, 2 yada 3 pik oluşturması ve de boyut ile alan farkının özel bir programda analizi ile tanı alırlar[1,4-6]. Mansfield'in 1993 yılında Down sendromu ile diğer anoploidilerin analizinde ilk kez kullandığı bu yöntem ile farklı populasyonlarda binlerce örneğin analizi yapılarak rutinde çalışmaya devam edilmektedir. Türk populasyonunda 2007'de Onay ve ark. tarafından bildirilen 576 amniyotik sıvının hem QF-PCR hem de sitogenetik karşılaştırılması yapılarak diğer populasyonlarla benzer sonuçlar elde edilmiştir[5]. Özkinay ve ark. tarafından 2008'de sunulan bir çalışmada 3 yıllık deneyim sonuçlarının da literatürle uyumlu olduğu gösterilmiştir[7]. Ancak, düşük oranda bulunan mozaizmler (%10'dan az) bu moleküler test ile tanınmayabilmektedir[8,9]. Bu olgumuzda, amniyosentez sonrası QF-PCR'da tespit edilemeyen ancak karyotiplemede trizomi 18 ve trizomi 9 mozaisizm tespit edilen bir vakamızı sunduk.

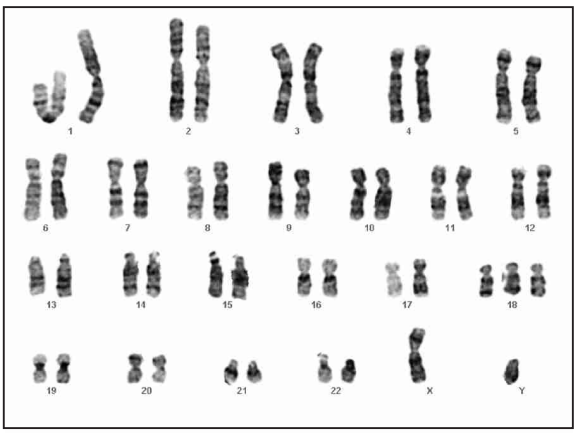
OLGU

23 yaşında gravidası 2, paritesi 1 olan 17 haftalık gebe hasta, triple testte trizomi 18 riskinin 1/50 olması nedeniyle amniosentez yapılması için kliniğimize refere edilmişti. Triple testte serum AFP 27.96 IU/ml (0.81 MOM), uE3 1 ng/ml (0.80 MOM) ve HCG 18213 mIU/ml (0.46 MOM) olduğu belirlenmiş ve trizomi 18 riski 1/50 olarak hesaplanmıştı. Yapılan ayrıntılı obstetrik ultrasonografide; fetusta bilateral koroid pleksus kistleri ve bilateral pyelektazi olduğu tespit edildi. Koroid pleksus kisti sağda 6 mm solda 5 mm olarak ölçüldü. Pyelektazi varlığı abdomenin transvers kesitinde pelvisin ön-arka çapının sağda 7 mm solda 5.9 mm ölçülerek belirlendi. Hastanın trizomi olasılığına bağlı anksiyetesinin olması ve amniosentezden kaynaklanabilecek düşük riskini kabul etmesi üzerine amniosentez yapılmasına karar verildi. Amniosentezden 48 saat sonra QF-PCR sonucu ABI 3100 ile yapılan patentli Gene Scan Programı kullanılarak normal kromozomal patern gösterdiği saptandı (4 bilgilendirici STR markırı ile) (Resim 1). Hastada iki ayrı ultrasonografik bulgu olması ve triple testte de riskinin yüksek olması nedeniyle kesin bir karara varabilmek için sitogenetik analizin sonucu beklenildi. Amniosentezin 15. gününde sitogenetik analizde, Trizomi 18+Trizomi 9 mozaik yapı tespit edildi (Resim 2,3). Karyotipte anormal hücre oranının toplamda %10 olduğu ve bu trizomik hücrelerin %86 oranında 47XY+18, %14 oranında 47 XY+9 kromozom yapısına sahip olduğu görüldü[10]. Amniotik hücreler 2 ayrı flaskta incelendi. Birinci flaskta 50 hücre incelendi; 44 tanesi 47,XY+18 ve 6 tanesi 47,XY+9 bulundu. İkinci flaskta ise 20 hücre incelendi; 16 tanesi 47,XY+18 ve 4 tanesi 47,XX+9 bulunmuştur. Bu durumun 3. seviye mozaisizm ile uyumlu olduğu düşünüldü. Hastaya kesin tanı için kordosentez yapılması gerektiği anlatıldı ancak hasta bu işlemi kabul etmedi.

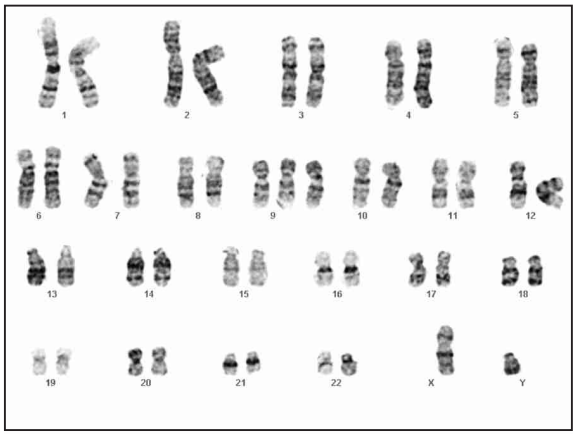


Resim 1: *Fetusun 13,18 ve Cinsiyet kromozomlarına ait QF-PCR analizinin görüntüsü.*

**Maternal kontaminasyon yoktur.*



Resim 2: *Karyotiplemede Trizomi 18 izlenmekte.*



Resim 3: *Trizomi 9 karyotipleme.*

Mozaisizmin prognozu açısından bilgi verildi ancak hastanın terminasyonu kabul etmemesi üzerine gebeliğin devamına karar verildi. Gebeliğin 21. haftasında yapılan ultrasonografide; fetusun posterior fossasında genişleme olduğu görüldü (foramen magnum 12 mm olarak ölçüldü). Bilateral koroid pleksus kistleri ve pyelektazisinin yine aynı büyüklüklerde sebat ettiği izlendi. Takipler sırasında terme kadar gebelik problemsiz seyretti. Hastanın özel bir merkezde normal vaginal doğum yaptığı ve bebeğin postpartum 4. saatte eks olduğu öğrenildi.

TARTIŞMA

QF-PCR'ın en sık kullanılan şekli kromozoma spesifik, tekrarlanan DNA dizilerinin küçük 3, 4 veya 5 nükleotidli DNA tekrarlarının çoğaltılmasını içerir. Tekrarlanan kısa DNA dizileri oturuşmuş (standardize edilmiş) ve polimorfik olup uzunluğu tekrarlanan üçlü, dörtlü veya beşli nükleotidlerin sayısına bağlı olarak kişiler arasında parmak izi kadar anlamlı düzeyde değişiklik göstermektedir. DNA örneği floresan primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılır ve bu ürün gen tarayıcı programla otomatik DNA sıralayıcı kullanılarak tekrarlayan her bir uzunluk pik bölgesi olarak görünebilir ve çoklu karşılaştırılabilmektedir [8,9]. Normal insanlardan çoğaltılan DNA'lar %65-95 oranında heterozigottur (farklı uzunlukta alleller içerir) ve aynı bölgede iki pik göstermesi beklenmektedir[7]. Trizomik insanlardan çoğaltılan DNA triallelik olanlarda aynı bölgede ekstra bir pik gösterirken diallelik olanlarda sadece iki pik gösterebilir ve biri diğerinin iki katı kadar uzun olabilmektedir[7]. QF-PCR DNA'nın çoğaltılması ile sonuç veren bir yöntem olduğu ve izole edilen DNA'lar en az 20 siklus amplifiye edildiği için %20'nin altındaki bir DNA farklılığını gösterememektedir[1-5]. Mozaik trizomilerde bu nedenle %0.2 oranında yanlış negatiflik görülebilmektedir[2]. Bu yöntem farklı fetal dokulara ayrıca (amniotik sıvı, fetal kan, koryonik villus ve terminasyon sonrası fetal dokular) uygulanabilmekte ve maternal kontaminasyonu da anneden alınan kan örneği yardımıyla bize gösterebilmektedir. Herbir kromozom sayısı için en az 2 bilgilendirici markır ile çalışılarak sonuç verilebilmektedir[10-15]. Bizim olgumuzda DNA markırlarının bilgilendiriciliği vardı ve hastada akraba evliliği bulunmamaktaydı. Mozaisizm oranı %10 olduğu için QF-PCR yöntemi ile yanlış negatif sonuç alınmıştı. Hastanın Triple testinde Trizomi 18 riskinin yüksekliği, ultrasonografide pyelektazi ve bilateral koroid pleksus kisti varlığı nedeniyle QF-PCR sonucu dikkate alınmadan sitogenetik analiz sonucu beklenildi.

FISH ve QF-PCR incelenen kromozomlarda anöploidi olup olmadığını hızlıca (24-48 saatte) gösterebilmektedir. Her iki yöntem de tüm kromozomların tanınmasında kullanılabilmekte ancak sadece 13, 18, 21. kromozomlar ile seks kromozomları için rutin kullanım amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemler yüksek riskli hastalar (fetal malformasyon/soft markır tespit edilenler) veya sitogenetik analiz için geç kalmış ileri gebelik haftasındaki hastalara uygulanabilmektedir. Kromozomal bir anomali tespit edildiğinde müdahalede bulunmak için güvenilirdir fakat, sadece karyotiplemenin sonucu beklenirken bir başlangıç olarak ta bazı genetikçiler tarafından kabul edilebilmektedir. Gerçekte bu hızlı araştırma teknikleri ile incelenen kromozom hastalıkları, yüksek riskli populasyonda gözlenen değişikliklerin sadece %65'ini oluşturmaktadır [14]. QF-PCR yöntemi FISH yöntemine göre bazı avantajlar içerir. QF-PCR analizi FISH'e göre çok daha fazla sayıda hücre incelenmesini sağlamaktadır. İşlem çok kolay otomatize edileceği için aynı anda çok sayıda örnek çalışılabilmekte ve işlemin tamamı 30 dakika kadar sürmektedir. FISH yönteminde belirli problar vardır ve herhangi bir doğrulama gerektirmezler[9-14]. QF-PCR maternal hücre kontaminasyonunu belirleyebilirken, FISH kız fetuslarda bunu açığa çıkaramamaktadır. Bu nedenlerle QF-PCR prenatal tanıda konvansiyonel sitogenetik analize bir alternatif olarak hızla kabul görmektedir[10-16]. Bazı diğer prenatal diagnostik testlerde olduğu gibi QF-PCR düşük orandaki mozaisizmi belirleyemeyebilmektedir. Düşük orandaki mozaisizmlar (%10'dan az) moleküler testlerle belirlenememektedir[4-8]. Bazı vakalarda X kromozomu mozaisiziminde de

QF-PCR ve sitogenetik analiz sonuçları arasında anormal küçük hücre populasyonunun oranına bağlı olarak uyumsuzluklar oluşabilmektedir. Bu uyumsuzluk oranı literatürde %0.2 olarak bildirilmiştir[2]. Bunun nedeni normal (46,XX veya 46,XY) ve 45,X yapısındaki in vitro hücrelerin büyüme hızının farklılığından kaynaklanmaktadır. Anöploid hücreler normal hücrelerden daha hızlı büyümektedir. Bununla beraber, QF-PCR sitogenetik analizle tanınmış %50 oranındaki mozaik trizomilerde birden fazla hücre dizisi varlığında tanıya olanak sağlamaktadır[2].

Sonuç olarak, literatürde QF-PCR yöntemi tek başına standart bir yöntem olarak kullanıldığında yaş dağılımına göre, yaşla frekan artan tek kromozom anomalilerinin yakalanamamasına neden olabilir. Bu 150 anormal karyotipte 1 oranındadır veya 10-30.000 örnekte birdir.[13-16]. Çoğunluğu striktürel olmak üzere, bazı seks kromozom anormalilerini de tespit edemeyeceği halde bu hata oranının literatürde kabul edilebilir düzeyde olduğu vurgulanmaktadır[8-13].

KAYNAKLAR

1. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploides using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Mol Hum Genet 1993; 2: 43- 50.
2. Cirigliano V, Voglino G, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. Prenatal Diagn 2009; 29: 40- 9.
3. Sjogren B, Uddenberg N. Prenatal diagnosis for psychological reasons: comparison with other indications, advanced maternal age and known genetic risk. Prenat Diagn 1990; 10: 111- 20.
4. Cirigliano V, Ejargue M, Carradas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J. Clinical application of multiplex quantitative polymerase chain reaction (QF-PCR) fort he rapid prenatal detection of common chromosome aneuploides. Mol Hum Reprod 2001; 7: 1001- 6.
5. Onay H, Ugurlu T, Aykut A, Pehlivan S, Inal M, Tinar S, Ozkinay C, Ozkinay F. Rapid Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies in Amniotic Fluid Using Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction. Gynecol Obstet Invest 2008; 66: 104- 10.
6. Nakonieczny M, Jezierski G, Wozniak I, Liss J, Pawlowski R, Preis K, Swiatkowska-Freund M, Wójcikowski C, Lukaszuk K. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR (QF-PCR)]. Przegl Lek. 2008; 65(3): 119- 21. Polish.
7. Ozkinay F, Pehlivan S, Alpman A, Onay H, Cogulu O, Akın H, Sagol S, Akercan F, Kazandi M, Balat O, Kutlar I, Ozkinay C. Prenatal Detection of common aneuploidies by quantitative fluorescence PCR in The Turkish Population: Three years experience in two reference hospitals. XXI. European Congress of Perinatal Medicine, Istanbul-Turkey, The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, (Supplement 1), 2008; 55: 21.
8. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutscheck B, Adinolfi M. Assesment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex chain reaction assays peformed on single cells. Ann Hum Genet 1998; 62: 9- 23.
9. Lau ET, Tang L, et al. Assessing discrepant findings between QF-PCR on uncultured prenatal samples and karyotyping on long-term culture. Prenatal Diagn 2009; 29: 151- 5.
10. Chia NL. A Comprehensive Set of Idiograms Representing All Interpretive Levels of Resolution: ISCN (2009). Cytogenet Genome Res 2009; 125: 162- 4 (DOI: 10.1159/000227842).
11. Von Eggeling F, Freytag M, Fahsold R, Horsthemke B, Claussen U. Rapid Detection of trysomy 21 by Quantitative PCR. Hum genet 1993; 91 567- 70.
12. Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. Reproduction 2003; 126: 279- 97.
13. Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosomes abnormalities. Health Technology Assesment 2003; 7: 1- 56.
14. Winsor EJ, Silver MP, Theve R, Wright M, Ward BE. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. Prenatal diagnosis 1996; 16: 49- 54.
15. Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploides by quantitative fluorescent PCR. Prenat Diagnosis 1999; 19: 1099- 103.
16. Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X,Y, 13,18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. Mol Hum Reprod 2000; 6: 855- 60.