

*Orijinal araştırma-Original research*

# Prenatal dönemde multiplex kantitatif fluoressan PCR (QF-PCR) tekniği ile yaygın kromozomal anoploidilerin tespiti: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi deneyimi

*Detection of common chromosome aneuploidies at the prenatal period by multiplex quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) technique: The experience of pilot study in Cumhuriyet University of School of Medicine*

**Senol Çitli\*, Binnur Köksal, Hande Küçük Kurtulgan, Nejmiye Akkuş, Öztürk Özdemir, İlhan Sezgin**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (Dr. Ş. Çitli, Bio. B. Köksal, Dr. H. K. Kurtulgan, Dr. N. Akkuş, Prof. Dr. İ. Sezgin), Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (Prof. Dr. Ö. Özdemir), Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-17020 Çanakkale

## Özet

**Amaç.** Kantitatif fluoressan polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR) insanda major sayısal anoploidi nedeni olan kromozom 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının küçük ardıl tekrar (short tandem repeat, STR) analizi ile hızlı kimliklendirilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Araştırmada, üçlü test pozitifliği ve diğer nedenlerle riskli kabul edilen gebeliklerde QF-PCR tekniği kullanılarak fetal kromozomlarda STR analizi yapılmış, yöntemin prenatal tanıdaki yeri ve önemi tartışılmıştır. **Yöntem.** Toplam 300 adet riskli gebelik analiz edilmiş olup analizlerin tamamında fetal amniyotik mayii (15 mL) kullanılmıştır. Bu amaçla Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından analiz için gönderilen fetal amniyotik mayiinin RPM1640 besisi ortamında solid hücre kültürü ile karyotip karyogram ve QF-PCR ile STR analizleri yapılmıştır. STR analiz için yaklaşık 05-1 mL amniyotik mayii örneğinden izole edilen total genomik DNA kullanıldı. Fetal DNA'lar uygun primerler kullanılarak kromozom 13, 18, 21, X ve Y'ye ait toplam 17 STR bölgesi fluoressan multiplex PCR yöntemiyle amplifiye edildi ve genotiplendirildi. **Bulgular.** Analiz için amniyotik mayii örneği gönderilen gebeliklerin 16-20 haftalık gebelikler oldukları ve en önemli etiyolojik sebebin ise ileri anne yaşı olduğu tespit edildi. Sivas bölgesine ait laboratuvarımıza gönderilen 300 adet amniyon mayii materyalinden 1 adet trizomi 13 (Patau sendromu), 1 adet trizomi 18 (Edward sendromu), 5 adet trizomi 21 (Down sendromu) olmak üzere toplam 7 adet trizomik fetus tanısı kondu ve raporlandırıldı. Bu sonuçlar aynı zamanda amniyon hücre kültürü ile elde edilen karyotip analizi ile doğrulandı. Trizomik fetusların her iki ebeveynine fetus karyotipleri hakkında genetik danışma verildi. **Sonuç.** Prenatal tanıda QF-PCR yönteminin yararlılığı ortaya konmuş olup rutin prenatal tanıda güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Prenatal tanı, QF-PCR, anoploidi

## Abstract

**Aim.** Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) is a method that helps rapid detection of chromosome 13, 18, 21, X and Y which are the major cause of numerical aneuploidies in human using specific short tandem repeats (STR). In the current study, STR analysis, with using QF-PCR technique, was done in fetal chromosomes of pregnancies which was accepted as risky in terms of triple test positivity and other reasons and the value of the method in prenatal diagnosis. **Method.** A total of 300 risky fetus were analysed, fetal amniotic fluid (15 mL) was used for all analyses. For this purpose, fetal amniotic fluids, which were referred by Cumhuriyet University School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, were subjected to karyotyping by cell culture in RPM1640 culture medium and of-PCR STR analysis. Total genomic DNA samples extracted from fetal amniotic fluid cells (1-1.5 mL) were used for STR analysis. Fetal DNAs were

amplified and then genotyped using appropriate primers belonging to chromosomes 13, 18, 21, X and Y in terms of 17 STR region. **Results.** It was determined that the pregnant women whose amniotic fluids were sent for analysis, were between 16-week and 20-week of pregnancies, and the most important etiologic reason was advanced mother age. A trisomy 13 (Patau syndrome), a trisomy 18 (Edwards Syndrome) and 5 trisomy 21 (Down syndrome) were detected in total of amniotic fluids which were sent to our laboratory of Sivas region. These results were also confirmed by cell culture and karyotype analysis. Genetic counselling about their fetuses' karyotype was given to both of the parents. **Discussion.** These results showed that QF-PCR is an effective method and can be used safely in prenatal diagnosis.

**Keywords:** Prenatal diagnosis, QF-PCR, aneuploidy

**Geliş tarihi/Received:** 25 Nisan 2011; **Kabul tarihi/Accepted:** 27 Ekim 2011

**\*İletişim adresi:**

Dr. Şenol Çitli, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, TR-58140 Sivas. E-posta: drsenolcitli@hotmail.com

## Giriş

Son zamanlarda kantitatif fluoresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) prenatal tanıda yaygın anoploidilerin tespitinde kullanılmaktadır [1-7]. Kuşkusuz prenatal tanıda en iyi yöntem konvansiyonel sitogenetik yöntemler olmakla birlikte uzun kültür süresi nedeniyle hastanın stresini artırmaktadır. Fluoresan insitu hibridizasyon (FISH) kültüre edilmemiş amniyotik mayi hücrelerinde hızlı prenatal tanıda kullanılan alternatif bir yöntemdir [8, 9]. QF-PCR yönteminin FISH dahil diğer yöntemlerden üstün kılan önemli avantajları daha az materyale ihtiyacının yanı sıra, daha hızlı olması, düşük maliyetli oluşu ve daha güvenilir olmasıdır [10]. Bununla birlikte kromozom düzeyinde tanımlama sağlanması ve maternal kan ile kontamine örneklerde başarıyla uygulanıyor olması QF-PCR'ı prenatal tanıda vazgeçilmez kılmaktadır [7]. QF-PCR yönteminin yaygın anoploidilerin tanısında çok sayıda prenatal çalışmada güvenilirliği ispatlanmıştır [4, 7]. Bu çalışmada, kurumumuzda prenatal tanı endikasyonu bulunduğu için anne onayı ile amniyosentez yapılan olgularda hızlı prenatal tanıda iki yıllık QF-PCR deneyimimizi sunduk.

## Gereç ve yöntem

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Kliniğinde 2009-2011 yılları arasında çeşitli endikasyonlardan dolayı prenatal tanı istenilen toplam 300 adet amniyon sıvısı örneği incelendi. Çalışmaya kabul etmedeki en önemli endikasyon ileri anne yaşı ikinci en sık endikasyon prenatal tanı testi pozitifliği olarak tespit edildi. Tablo 1'de çalışmamızdaki endikasyonlar ve oranları verilmiştir. Bu amaçla Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından analiz için gönderilen fetal amniyotik sıvı örnekleri QF-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Bu örnekler 16-20. gebelik haftalarında alınmış 15 mL amniyotik sıvı örnekleri idi. Öncelikle 0,5-1,5 mL örnekten total DNA izolasyonları yapıldı (InstaGene™ Matrix kit Bio-Rad ABI310 USA), ve elde edilen DNA ürünleri kromozomlara özgü fluoresan işaretli primerler kullanılarak PCR yoluyla amplifiye edildi. PCR koşulları (28 döngü için); 95°C'de 15 dk, 95°C'de 40 sn, 60°C'de 90sn, 72°C'de 40sn, 60°C'de 30dk olarak düzenlendi. Denatürasyondan sonra (96°C'de 2 dk) 1µl PCR ürünleri alınıp daha önce 40µl formamid (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, UK) ve 1 µl -500 liz size standart tamponuna (GeneScan™-500 LIZ™ Size Standart, Applied Biosystems, UK) eklendi. Sonuç için gen haritalama programı kullanılarak fragman analizi yapıldı. (Gene Mapper Software, versiyon 4.0, ABI 310, USA). Tablo 2 ve 3'te hedef kromozom genotiplendirilmesinde kullanılan STR markırları ve kromozomal lokalizasyonları gösterilmektedir. Prenatal tanıdaki QF-PCR yönteminin amacı fetüs cinsiyetini belirlemek değildir ve cinsiyet raporlarında belirtilmez. Bebek doğmadan ya da yaşama sınırına erişmeden önce (24. gebelik haftası) kendisinde var olan problemlerin teşhis edilmesi hedeflenir.

Çalışmamızda her bir kromozom başına en az 2 STR (kısa ardıl tekrarlar) bölgesi kullanıldı. Örnekleri normal kabul etmek için kullandığımız kriter allel pik oranı 1:1 olan ve açık bir şekilde disomik diallelik paternin olmasıdır (Şekil 1). Pik oranları 1:1:1 olan trizomik triallelik paternler veya allel pik oranı 2:1 olan trizomik diallelik paternler anormal kabul edildi.

**Tablo 1. QF-PCR analizi yapılan olgularımıza ait prenatal tanı endikasyonları ve oranları.**

Endikasyon	Oran (%)
İleri anne yaşı	%51
Prenatal tarama testi pozitifliği	%33
Fetal anomali	%8
Diğer nadir nedenler	%6

**Tablo 2. Araştırmada hedef kromozom (13, 18, 21, X, Y) genotiplendirmesinde rutin kullanılan STR markırları ve kromozomal lokalizasyonları.**

Kromozom no	Prob	Lokalizasyonu
13	D13S258	13q21
	D13S305	13q12.1-13q14.1
	D13S631	13q31-32
	D13S634	13q14.3
18	D18S386	18q22.1
	D18S390	18q22.2
	D18S391	18qpter-18p11.22
	D18S535	18q12.2
21	D21S1411	21q22.3
	D21S1414	21q21
	D21S1437	21q21.1
	D21S1446	21q22.3-ter
XY	AMXY	Xp22.1-22.31-Yp11.2
	SRY	Yp11.2
	X22	Xq28Yq(PAR2)
	DXYS218	Xp22.32Yp11.3(PAR1)
	HPRT	Xq26.1

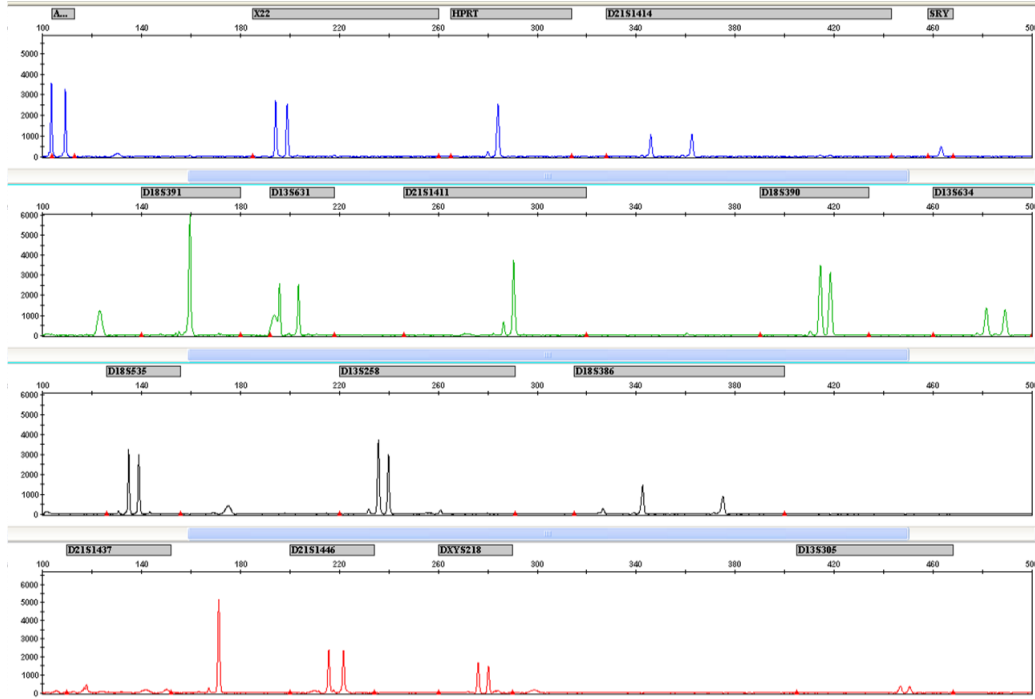
**Tablo 3. Araştırmada şüpheli olgularda ve kromozomal anomalili vakalarda kullanılan ek STR markırları ve kromozomal (13, 18, 21, X, Y) lokalizasyonları.**

Kromozom no	Prob	Lokalizasyonu
13	D13S742	13q12.12
	D13S628	13q31-q32
18	D18S858	18q21.1
	D18S499	18q21.32-q21.33
	D18S1002	18q11.2
21	D21S1412	21q22.2
	D21S1435	21q21
	D21S1008	21q22.1
XY	SBMA	Xq11.2-Xq12
	DXS6803	Xq12-Xq21.33
	DXS6809	Xq
	DXS8377	Xq28

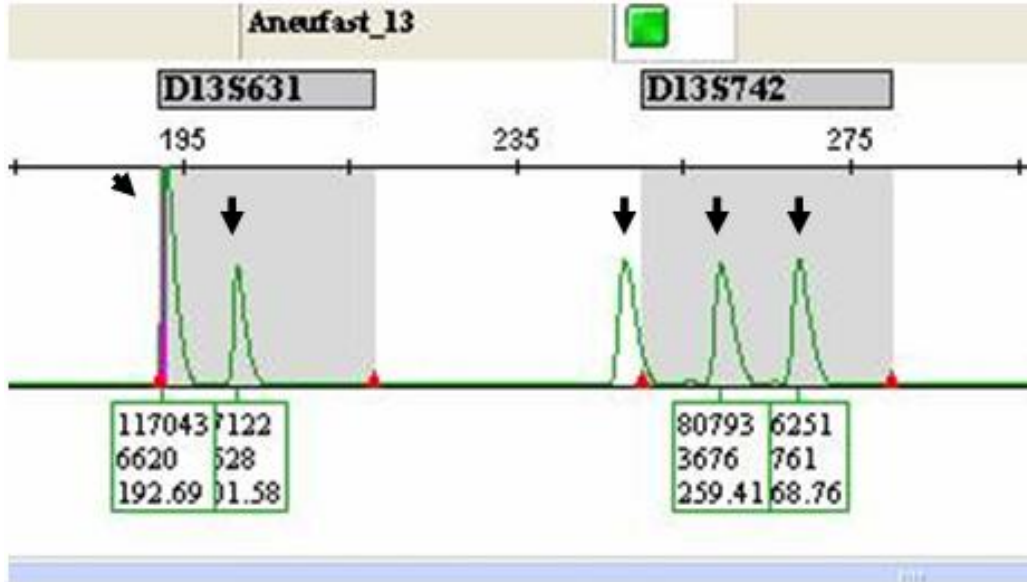
## Bulgular

Yapılan çalışmada toplam 300 adet amnion sıvısı örneği QF-PCR ile analiz edildi ve analiz sonunda 1 adet trizomi 13 (Patau sendromu) (Şekil 2), 1 adet trizomi 18 (Edward sendromu) (Şekil 3) ve 5 adet trizomi 21 (Down sendromu) (Şekil 4) olmak üzere 7 adet patolojik sonuç raporlandı. Bu sonuçlar konvansiyonel sitogenetik analiz ile doğrulandı.

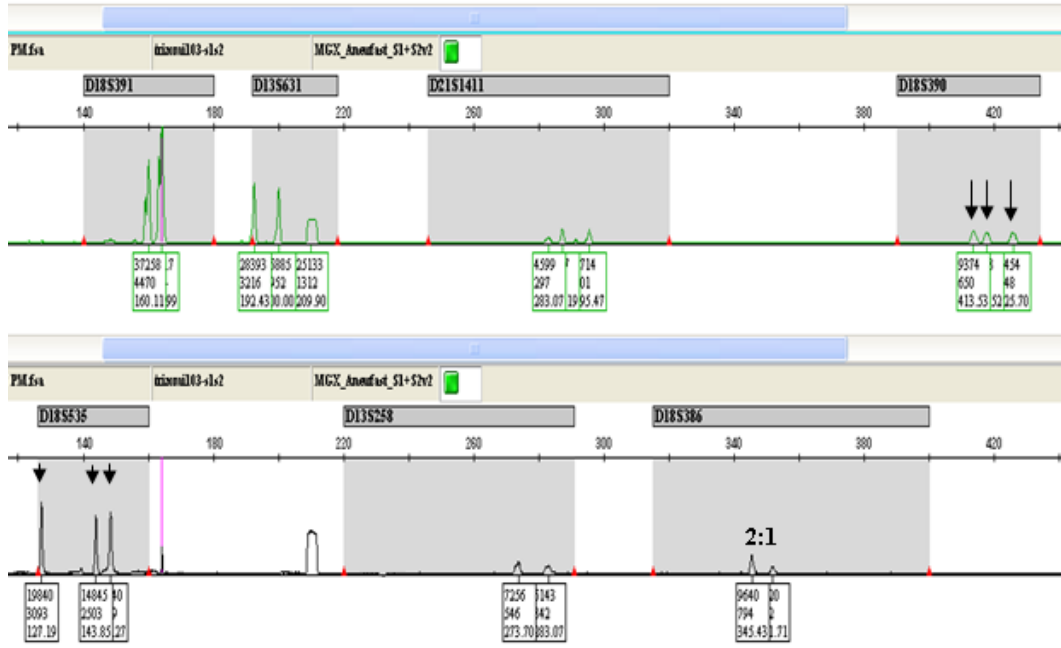
Kliniğimize prenatal tanı için gelen amniyotik mayii örnekleri 16-20 gebelik haftasına aitti ve en önemli endikasyon ileri anne yaşı ikinci en sık endikasyon prenatal tanı testi pozitifliği olarak tespit edildi. Tablo 1'de çalışmamızdaki endikasyonlar ve oranları verilmiştir.



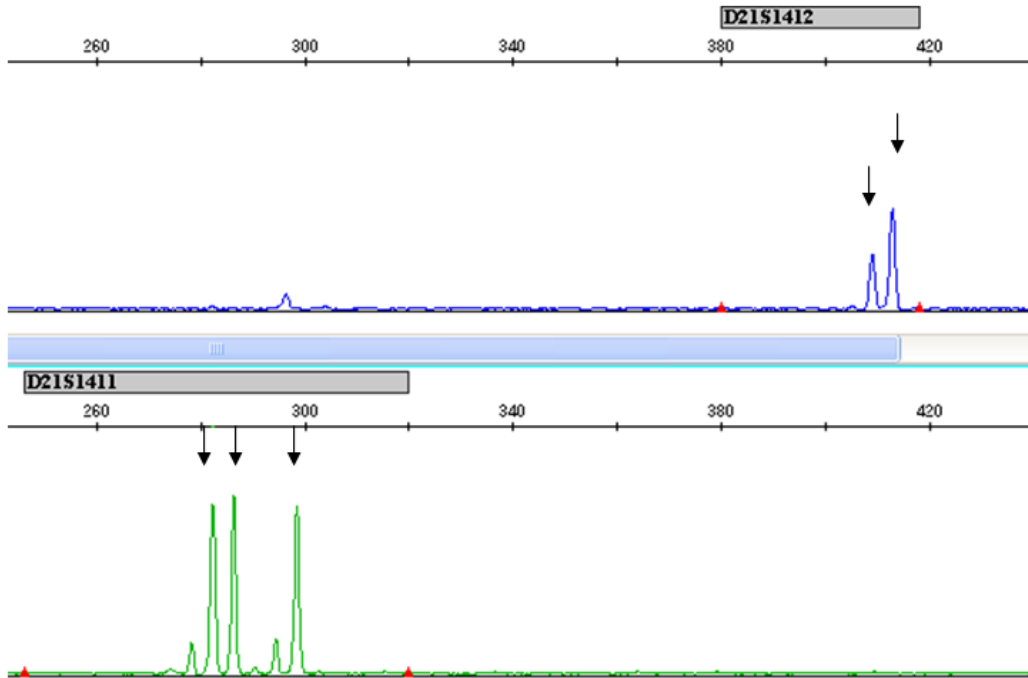
Şekil 1. Normal bir fetüse ait QF-PCR analiz sonuçları.



Şekil 2. Trizomi 13 (Patau sendromu) tanısı alan fesusu ait amniyon mayii QF-PCR profilleri. Kromozom 13 trizomisine ait elde edilen STR profilleri oklarla gösterilmiştir.



Şekil 3. Trizomi 18 (Edward sendromu) tanısı alan fetusa ait amniyon sıvısı QF-PCR profilleri. Kromozom 18 trizomisine ait elde edilen STR profilleri oklarla gösterilmiştir.



Şekil 4. Down sendromlu bir olguya ait QF-PCR profilleri. Kromozom 21 trizomisine ait elde edilen STR profilleri oklarla gösterilmiştir.

## Tartışma

Bu araştırmada laboratuvarımızın iki yıllık rutin prenatal tanıda QF-PCR uygulaması yaparak 300 gebede elde edilen klinik uygulama sonuçlarımızı sunduk. Bizim sonuçlarımıza göre QF-PCR prenatal tanıda hızlı ve güvenilir bir şekilde sonuç sağlayarak ivedilikle karar verme olanağı vermektedir. Uygulamalarımızda etkilenmiş kromozomların elde edildiği tüm örneklerdeki yaygın anoploidiler başarıyla saptandı.

Çalışmamızdaki 300 vakada QF-PCR ile sitogenetik analiz sonuçları arasında herhangi bir uyumsuzluk yoktu. X ve Y kromozomları için Amelogenin gen markırları, X kromozomal STR'leri ve Y'ye spesifik SRY bölgesi cinsiyet kromozomlarının tayini için kullanıldı. Amelogenin hem X (AMEL X) ve hem Y (AMEL Y) üzerinde bulunur ve bu iki gen büyüklük farklılıklarından dolayı cinsiyet saptamada bir markır olarak kullanılır. Böylece bu gen dişi ve erkeklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ek olarak X (X22, HPRT, DXYS218) ve Y (SRY, DXYS218) kromozom spesifik STR markırlarının kullanılması cinsiyet kromozomlarının doğru bir şekilde belirlenmesine yardımcı olmaktadır [11, 12]. Trizomik kromozomların parental orjini ve prezigotik ya da postzigotik orjinli olup olmadığı geleneksel sitogenetik veya diğer analitik tekniklerle belirlenemez. Kromozomal polimorfik STR markırları parental örneklerle eş zamanlı olarak analiz edilirse trizomik kromozomların parental orjinini belirlemek için kullanılabilir. Anne ve babadaki PCR fragmentlerinin uzunluklarının fetüsünki ile karşılaştırılması ekstra kromozom orjinini açığa çıkarır. Bazı olgularda her iki ebeveynin STR markırlarının aynı olması durumunda bu markırlar uninformatif (bilgi verici olmayan) olarak değerlendirilirler. Trizomik sendromlar için kullanılan ultrason kriterleri yada serum tarama testlerinde yüksek risk varlığında trizomik sendromların hızlı bir şekilde doğrulanması yada dışlanması hamileliğin takibi ile ilgili karar vermeye yardımcı olmaktadır. QF-PCR, FISH ve klasik sitogenetik karyotipleme tekniklerine göre hem daha hızlı hem daha kolay bir yöntemdir. Ayrıca anoploidi durumlarında fazladan kromozomun hangi ebeveyne ait olduğu tespit edilebilmektedir. Ek olarak maternal kontaminasyon saptanabilmektedir. Bununla birlikte QF-PCR'ın prenatal tanıda birkaç olumsuz yanı da bulunmaktadır. Örneğin QF-PCR ile mozaisizmlerin saptanması mümkün olmayabilir (özellikle anormal hücreler %15-%20'nin altında ise). QF-PCR delesyonların tespiti için uygun bir metod değildir. Nadir durumlarda bir kromozom için test edilen tüm STR markırları uninformatif olabilir. Böyle örnekler FISH ve karyotiplendirme yöntemleri ile test edilmelidirler. Biz çalışmamızda 13, 18, 21 nolu kromozomlar için 4'er adet STR markırı, X ve Y kromozomları için 5 adet STR markırı kullandık (Tablo 2). Bu markırlardan en az ikisinin informatif (bilgi verici) olması durumunda kromozomu normal olarak değerlendirdik (Şekil 1, normal). Bir veya daha az bilgi verici STR markırı bulunması durumunda 13 nolu kromozom için 2 adet 18 ve 21 nolu kromozomlar için üçer adet XY için ise 4 adet ek STR markırı değerlendirdik (Tablo 3). Ayrıca trizomik fetuslarda da ilgili kromozom için ek STR markırları ile tekrarlayarak doğruladık. QF-PCR otozomlar ve cinsiyet kromozomlarındaki sayısal bozuklukları test etmede etkin ve güvenilirliği ispatlanmış bir yöntemdir. Prenatal tanıda ucuz ve basit uygulanabilen bir tanı yöntemidir. Hastaların büyük çoğunluğunda X, Y, 13, 18 ve 21 nolu kromozomlardaki anomaliler saptanabilmektedir. Bu nedenle ebeveynin endişelerini kısa zamanda azaltan ve tedavi sürecini hızlandıran bir yöntemdir.

## Referanslar

1. Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 1995; 17: 661-4.
2. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellites and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 1997; 17: 1299-311.
3. Pertl B, Kopp S, Kroisel P, Häusler M, Sherlock J, Winter R, Adinolfi M. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex, *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 899-906.
4. Pertl B, Pieber D, Lercher-Hertlieb A, Orescovic I, Häusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1176-9.
5. Findlay I, Tóth T, Matthews P, Marton T, Quirke P, Papp Z. Rapid trisomy diagnosis (21, 18, and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats:

- applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 266-75.
6. Verma L, Macdonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hultén M. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 1998; 352: 9-12.
  7. Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hackelöer BJ, Kerber S, Kochhan L, Held KR. 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.
  8. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 854-65.
  9. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Eppelen JT. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of >3000 cases. *Fetal Diagn Ther* 1999; 14: 193-7.
  10. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 9-23.
  11. Jobling MA, Lo IC, Turner DJ, Bowden GR, Lee AC, Xue Y, Carvalho-Silva D, Hurles ME, Adams SM, Chang YM, Kraaijenbrink T, Henke J, Guanti G, Mckeown B, Van Oorschot RA, Mitchell RJ, de Knijff P, Tyler-Smith C, Parkin EJ. Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 307-16.
  12. Murphy KM, Cohen JS, Goodrich A, Long PP, Griffin CA. Constitutional duplication of a region of chromosome Yp encoding AMELY, PRKY, and TBL1Y: implications for sex chromosome analysis and bone marrow engraftment analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 408-13.