

NEINVAZIVNO PRENATALNO TESTIRANJE

JASENKA WAGNER*

Prenatalna dijagnostika obuhvaća niz dijagnostičkih postupaka kojima ispitujemo postojanje bolesti ili patološkog stanja kod ploda. Kod oko 4% novorođenčadi nalazimo bolesti koje u potpunosti ili djelomično imaju gensku etiologiju, bilo da se radi o kromosomskom poremećaju, monogenskoj bolesti ili poligenskoj/multifaktorijskoj bolesti. Prenatalno genetičko testiranje odnosi se na primjenu metoda molekularne genetike i citogenetike tijekom trudnoće s ciljem postavljanja dijagnoze ploda u rizičnim trudnoćama. Metode koje se primjenjuju u svrhu prenatalne dijagnostike dijele se na invazivne i neinvazivne. Invazivne metode su pouzdane i točne, no nose mali rizik za majku i za plod. Neinvazivne metode su bezopasne kako za majku tako i za plod, no nedovoljno točne da bi bile dijagnostičke. Otkrićem prisutnosti slobodne fetalne DNA u cirkulaciji trudnice 1997. godine, neinvazivna prenatalna dijagnostika postala je jedno od najdinamičnijih područja istraživanja u medicini. Termin neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT) uglavnom se odnosi na neinvazivno prenatalno testiranje ploda na aneuploidije analizom slobodne DNA iz krvi majke. Iako se radi o visokodiferentnoj tehnici, ona se i dalje smatra naprednom metodom probira, a ne dijagnostičkim testom. Za očekivati je da će brzi razvoj tehnologije u skoroj budućnosti omogućiti neinvazivnu detekciju i fetalnih submikroskopskih aneuploidija, monogenskih poremećaja, čitavog fetalnog genoma kao i analizu metiloma i transkriptoma, odnosno, da će analiza slobodne fetalne DNA iz krvi majke u budućnosti istisnuti sekvencioniranje egzoma u invazivno dobivenim uzorcima.

Deskriptori: NEINVAZIVNO PRENATALNO TESTIRANJE, ANEUPLOIDIJA, SLOBODNA FETALNA DNA, NEINVAZIVNA PRENATALNA DIJAGNOSTIKA, MAJČINA PLAZMA, PRENATALNI PROBIR

Skrćenice:

NIPT - neinvazivno prenatalno testiranje; NIPD - neinvazivna prenatalna dijagnostika; BMI - indeks tjelesne mase; UZV - ultrazvuk; PAPP-A - plazmatki protein trudnoće A; NN - nuhalni nabor; bHCG - beta podjedinica humanog korionskog gonadotropina; PCR - lančana reakcija polimerazom; CPM - ograničeni placentalni mozaicizam; CNV - promjena broja ponavljanja; PPV - pozitivna prediktivna vrijednost

Prenatalna dijagnostika obuhvaća niz dijagnostičkih postupaka kojima ispitujemo postojanje bolesti ili patološkog stanja kod ploda. Kod oko 4% novoro-

đenčadi nalazimo bolesti koje u potpunosti ili djelomično imaju gensku etiologiju, bilo da se radi o kromosomskom poremećaju, monogenskoj bolesti ili poligenskoj/multifaktorijskoj bolesti. Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu 2010. godine donijelo je Nacionalnu preporuku za prenatalni probir i dijagnostiku kromosopatija prema kojoj se neinvazivni testovi probira preporučuju u nisko rizičnih trudnoća, odnosno trudnica mlađih od 36 godina koje imaju negativnu osobnu ili obiteljsku anamnezu, a invazivna prenatalna dijagnostika trudnicama s navršениh 36 godina života i starijim zbog dokazanog povećanog rizika za sindrom Down, ali i za druge sindrome uzrokovane promjenama kromosoma, posebno trisomijama. Osim zbog pođmakle dobi trudnice, invazivna prenatalna dijagnostika medicinski je opravdana i preporučuje se u: pozitivne ili opterećene obiteljske i/ili reproduktivne anamneze, pozitivnih ultrazvučnih biljega kromosopatija i pozitivnog nalaza testova probira prvog ili drugog tromjesečja (1).

Prenatalno genetičko testiranje odnosi se na primjenu metoda molekularne genetike i citogenetike tijekom trudnoće s ciljem postavljanja dijagnoze ploda u rizičnim trudnoćama. Provodi se kada: 1) je rizik da se radi o genetičkom poremećaju fetusa velik; 2) postoji siguran test za prenatalno utvrđivanje promjene kromosoma ili gena; 3) je liječenje rođenog djeteta nedostupno ili nemoguće; 4) je poremećaj težak pa vrijedi prekinuti trudnoću; 5) je prekid trudnoće prihvatljiv za oba partnera (2).

Preporuke Hrvatskog društva za humanu genetiku o genetičkom informiranju upućuju na neophodnost genetičkog informiranja prije zahvata i nakon dobivanja rezultata ispitivanja. Genetičko informiranje je komunikacijski proces koji pomaže osobama s genetičkim opterećenjem da donesu odluke koje su u skladu s njihovim stajalištima i vrijednostima te je njegova osnovna zadaća da donese dobrobit i umanj, ili posve ukloni, moguće štetne posljedice rezultata genetičkog te-

*Laboratorij za medicinsku genetiku
Katedra za medicinsku biologiju i genetiku,
Medicinski fakultet
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Adresa za dopisivanje:
Doc. dr. sc. Jasenka Wagner,
spec. med. biokemije i lab. medicine
Laboratorij za medicinsku genetiku
Katedra za medicinsku biologiju i genetiku,
Medicinski fakultet
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
31000 Osijek, Josipa Huttlera 4
E-mail: jwagner@mefos.hr

stiranja (3). Genetički probir je traganje u populaciji za osobama određenog genotipa. I u ovom slučaju, informacija prije i poslije ispitivanja mora biti sastavni dio programa probira (3).

Povijest u današnje vrijeme opće-prihvaćenog prenatalnog (antenatalnog) probira započinje 70-ih godina prošlog stoljeća spoznajom o povezanosti povišene razine α -fetoproteina (AFP) u majčinu serumu i oštećenja neuralne cijevi. Slijedeći značajan napredak bila je fetalna ultrasonografija nakon čega, početkom 80-ih godina prošlog stoljeća, dolazi do otkrića biokemijskih biljega za Downov sindrom (4).

Neinvazivni prenatalni testovi probira temelje se na mjerenju koncentracije određenih biokemijskih biljega u krvnom serumu trudnice i nalazu ultrazvuka (UZV), a uzimaju u obzir i dob trudnice te stadij trudnoće. Najučinkovitiji neinvazivni test probira koji se provodi u okviru našeg zdravstvenog sustava je kombinirani probir u 1. tromjesečju. On uključuje mjerenje debljine nuhalnog nabora (NN) i dvaju biokemijskih biljega u majčinom serumu (plazmatski protein trudnoće-A (PAPP-A) i slobodna β podjedinica humanog korionskog gonadotropina (β HCG)). Prema literaturnim podacima, stopa detekcije Down sindroma primjenom kombiniranog probira iznosi i do 90%. Iako je osjetljivost ovih metoda visoka, njihova je specifičnost relativno mala te se ovi testovi smatraju metodom probira koja uključuje ili isključuje nužnost invazivnog zahvata i genetičke analize kao najtočnije potvrde dijagnoze (5).

Najčešće primjenjivane invazivne metode prenatalne dijagnostike su amniocenteza, biopsija korionskih resica i kordocenteza. Svrha je njihove primjene dobivanje stanica i/ili tkiva ploda pogodnih za različite pretrage: citogenetičke, molekularno-genetičke i biokemijske. Budući da se radi o invazivnim metodama, u vrlo malom broju slučajeva moguće su komplikacije nakon zahvata. Rizik za najgoru moguću komplikaciju nakon zahvata, pobačaj, iznosi 0,5-1% za amniocentezu, 1-2% za biopsiju korionskih resica te oko 1% za kordocentezu (2).

Posljednjih nekoliko desetljeća uloženi su veliki naponi u otkrivanje i razvoj točnijih neinvazivnih testova koji bi u budućnosti trebali zamijeniti invazivne tehnike. Usprkos obećavajućim preliminarnim rezultatima nakon otkrića fetalnih stanica u krvotoku majke 1979., analiza fetalnih stanica do danas nije zaživjela u kliničkoj praksi (6). U radu objavljenom 1997. u Lancetu, Dennis Lo i suradnici dokazali su prisutnost slobodne fetalne DNA u krvi majke, točnije, utvrdili su muški spol ploda analizom sljedova gena s Y kromosoma (7). Ovo otkriće označilo je prekretnicu u razvoju neinvazivnih prenatalnih molekularno-genetičkih analiza i približilo nas krajnjem analitičkom cilju: razvoju neinvazivne prenatalne dijagnostike (8).

Daljnja istraživanja pokazala su da koncentracija slobodne fetalne DNA raste tijekom gestacije te da nakon 10. gestacijskog tjedna udio fetalne frakcije iznosi 3-13% (8). Udio fetalne frakcije ovisi o majčinom BMI, gestacijskoj dobi, fetalnoj aneuploidiji, plodnosti trudnoće. Utvrđeno je da je eliminacija slobodne fetalne DNA iz majčine cirkulacije nakon poroda izrazito brza ($t_{1/2}=16,3$ minute), što povećava specifičnost analize slobodne fetalne DNA i značajno je razlikuje od analize fetalnih stanica u majčinom krvotoku koje mogu zaostati u krvi majke i nekoliko godina nakon poroda (9, 10). Slobodna fetalna DNA porijeklom je iz stanica placente, sinciciotrofolasta, te je u odnosu na majčinu slobodnu DNA kraća (fragmenti manji od 200 parova baza), degradiranija i hipometilirana (11).

Spoznaja da fetomaternalna barijera nije nepropusna zbog čega se stanice i DNA fetusa nalaze i u majčinoj cirkulaciji omogućuje testiranje genetičkog materijala fetusa sakupljenog iz majčine cirkulacije na neinvazivan način. Izdvajanje slobodne DNA iz cirkulacije majke puno je jednostavnije od prikupljanja fetalnih stanica. Nemogućnost odvajanja majčine od fetalne slobodne DNA dugo je vremena bila 'kočnica' za masovniju primjenu analize slobodne fetalne DNA iz trudničke plazme. Zbog tog razloga, prve razvijene metode koje su analizirale slobodnu fetalnu DNA bile su molekularno-genetičke metode koje su analizi-

rale one dijelove fetalnog genoma po kojima je fetus različit od majke: sekvence porijeklom od oca ili de novo nastale.

Prva primjena analize slobodne fetalne DNA bila je u svrhu neinvazivnog određivanja spola ploda, a vrlo brzo nakon toga razvijena je i metoda za utvrđivanje fetalnog RhD statusa kod RhD negativne trudnice (12, 13). Neinvazivno određivanje fetalnog RhD statusa je jedina primjena analize slobodne fetalne DNA u rutinskoj kliničkoj praksi u europskim zdravstvenim sustavima, iznimka je Velika Britanija gdje je i neinvazivno određivanje spola dio zdravstvene skrbi.

Tek otkriće metode masivnog paralelnog sekvencioniranja (MPS) i razvoj bioinformatičkih alata omogućilo je testiranje aneuploidija (14, 15). Iako ova metodologija ima visoku cijenu, a analize su dugotrajne i kompleksne, napredak tehnologije te provođenje velikih kliničkih studija tijekom posljednjih godina doveli su do razvoja suvremenih neinvazivnih prenatalnih testova koji analiziraju slobodnu DNA iz majčine krvi (NIPT). Prvi takav test predstavljen je 2011. godine te od tada iznimno brzo proširen po čitavom svijetu. Sve do pojave NIPT, uobičajena mjesta razvoja i uvođenja novih tehnologija bila su sveučilišta i/ili sveučilišne klinike. U ovom slučaju, primat su imali komercijalni laboratoriji koji su s prvim testiranjima krenuli 2011. godine i u posljednjih 4-5 godina značajno izmijenili ovo dijagnostičko područje. Tri su varijante NIPT prisutne na tržištu:

- masivno paralelno sekvenciranje čitavog genoma koje karakterizira 10-20 milijuna očitavanja te potencijal za utvrđivanje aneuploidija svih kromosoma; temelji se na sekvenciranju i brojanju velikog broja pojedinačnih DNA fragmenata iz plazme koji se, temeljem usporedbe s referentnim genomom, pridružuju kromosomu s kojeg potječu;
- ciljano sekvenciranje kromosoma kojim se radi manji broj očitavanja, jeftinije i brže se dođe do rezultata, ali se dobije manja količina informacija o genomu;

- sekvenciranje SNP lokusa na kromosomima od interesa koje uzima u obzir relativni kvantitativni doprinos majčinog i očevog genoma u plazmi, ne zahtijeva referentnu vrijednost te ima potencijal za utvrđivanje triploidije; u jednoj reakciji umnaža se 20000 SNP sekvenci koje se nakon toga sekvenciraju, odrede njihovi položaji na kromosomima te procjeni radi li se o monosomičnom, disomičnom ili trisomičnom fetusu (16, 17).

Svaka od spomenutih NIPT metodologija ima svoje prednosti, npr. metode masivnog i paralelnog sekvencioniranja omogućavaju veću dubinu sekvencioniranja u slučaju niske razine fetalne frakcije slobodne DNA ili u slučaju testiranja malih promjena u broju ponavljanja (eng. copy number variation, CNV). SNP metoda može isključiti neravnotežu u genomu koja je majčinog porijekla, otkriti dodatno prisutne haplotipove u smjesi slobodne DNA koji ukazuju na neotkrivenu višestruku trudnoću ("vanishing twin" fenomen), pružiti informaciju o roditeljskom podrijetlu aneuploidije, ukazati na diandričnu triploidiju, ne-očinstvo, konsangvinitet i uniparentalnu disomiju. U slučaju kada se radi o trudnoći začetoj doniranom jajnom stanicom, može detektirati dodatne fetalne alele koji nisu prisutni kod trudnice (17, 18). S obzirom na veliku vjerojatnost da je upravo aneuploidija razlog gubitka jednog od blizanaca u slučaju blizanačke trudnoće, neotkrivena zaostala slobodna fetalna DNA odumrlog ploda može utjecati na konačan NIPT rezultat. Mogućnost SNP metode da identificira dodatne fetalne haplotipove trebala bi u konačnici dovesti do manjeg broja lažno pozitivnih rezultata (18-20).

Trenutna NIPT ograničenja su relativno velik udio neuspjelih analiza (2,6%-5,4%) te usmjerenost na najčešće trisomije. Kako se ipak još uvijek radi o testu probira, javlja se i određeni postotak lažno pozitivnih (0,25-1%) i lažno negativnih rezultata (manje od 1%) te se svaki pozitivan rezultat NIPT testa mora potvrditi referentnom metodom (16). Uz nekoliko rijetkih iznimaka, testiranje se provodi u obliku "direct to consumer" testova, nalazi se izrađuju u roku od 10-ak dana i priopćavaju bez genetičkog savjetovanja (17). Rezultati validacijskih NIPT studija pokazali su da je točnost detekcije sindroma Down 99,5%, sindroma Edwards 99% i sindroma Patau 79-92% (Tablica 1) (21, 22).

NIPT testiranje je neuspješno u oko 2% slučajeva, a uglavnom ovisi o udjelu fetalne frakcije u ukupnoj slobodnoj DNA u cirkulaciji (23). Na udio slobodne frakcije utječu: indeks tjelesne mase trudnice, gestacijska dob, tip aneuploidije, višeploidnost i mozaicizam (24). Višestruke trudnoće su jedan od razloga netočnog rezultata: primjerice, u slučaju dizigotnih blizanaca, fetalna frakcija po pojedinom fetusu bit će niža, a još veće razrjeđenje slobodne fetalne DNA frakcije dogodit će se u slučaju kada je jedan od blizanaca euploidan, a drugi aneuploidan (23).

Među lažno pozitivnim slučajevima značajni su biološki razlozi poput ograničenog placentarnog mozaicizma, uniparentalne disomije, mozaicizma kod majke, gubitak jednog od blizanaca, maligno oboljenje trudnice (18, 25, 27, 30-32, 34-36). Razlog za lažno negativan rezultat uglavnom je ograničeni placen-

tarni mozaicizam (28, 29). Zbog svega navedenoga, treba naglasiti da je ultrazvučna dijagnostika i dalje nezaobilazna kao komplementarna metoda prenatalne dijagnostike u svrhu isključivanja strukturnih fetalnih anomalija.

Vrlo brzo nakon predstavljanja NIPT-a 2011. godine, *The American College of Obstetricians and Gynaecologists*, objavili su 2012. smjernice za implementaciju NIPT u postojeće prenatalne protokole prema kojoj NIPT treba biti opcija nakon patološkog nalaza kombiniranog probira, a prije invazivnog zahvata (37). Najnovija smjernica iz 2015. naglašava da pacijentice kojima zbog 'tehničkih' razloga nije mogao biti izdan nalaz trebaju biti dodatno informirane, predložiti im se detaljan ultrazvučni pregled te invazivan dijagnostički zahvat jer kod njih postoji povećan rizik za aneuploidiju. Pacijenticama općenito treba biti naglašeno da NIPT ne zamjenjuje invazivni dijagnostički test te da se NIPT analizom ne analiziraju svi kromosomi. NIPT nije tehnika koja može detektirati oštećenja neuralne cijevi te defekte u ventralnoj stjenci. NIPT se ne bi trebalo nuditi kao zaseban test niti se temeljem njega može donijeti odluka o prekidu trudnoće. Pacijenticama treba pojasniti da uredan NIPT nalaz ne daje garanciju za urednu trudnoću. ACOG smjernice zaključuje preporukom da je i nadalje optimalni neinvazivni probirni test za sve trudnice, kombinirani probir u 1. tromjesečju. Razlog tome je što NIPT u populaciji žena niskog rizika ima nisku PPV, te što se primjenom samo NIPT-a 'gubi' oko 10% kromosomske patologije koju je moguće detektirati kombiniranim probirom. Također, ne preporučuje

Tablica 1.

Karakteristike NIPT za aneuploidije kod pacijentica kojih je rezultat analize bio informativan (16. gestacijski tjedan), preuzeto iz *Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 640. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstet Gynecol 2015; 126: 31-7.*

	osjetljivost (%)	specifičnost (%)	dob 25 g. PPV (%)	dob 40. g. PPV (%)
trisomija 13	99.3	99.8	33	87
trisomija 18	97.4	99.8	13	68
trisomija 21	91.6	99.9	9	57
spolni kromosomi	91.0	99.6		

PPV - pozitivna prediktivna vrijednost

se istovremena primjena nekoliko različitih testova probira jer je financijski nepovoljna. NIPT se ne preporučuju za višeploidne trudnoće kao ni rutinski probir na mikrodelecije sindrome. Ukoliko se ultrazvučno primijeti strukturna anomalija ploda, odmah se preporučuje invazivni dijagnostički test (38).

Kao rezultat četverogodišnje primjene NIPT u zemljama u kojima je primjena NIPT široko prihvaćena, zamijećen je pad broja ostalih prenatalnih testova: npr. u SAD kombiniranog probira za 50%, amniocenteze za 76%, CVS za 54%; invazivnih zahvata u Francuskoj za 30%, u Švicarskoj za 67%. Posljedično, smanjen je i broj gubitaka fetusa kao posljedice komplikacija invazivnog zahvata. No, stopa detekcije nije povećana te je smanjen postotak otkrivenih drugih kromosomskih abnormalnosti koje bi standardna kariotipizacija detektirala (39).

Posljednje dvije godine, osim NIPT testiranja aneuploidija kromosoma 13, 18 i 21, provode se i analize poremećaja spolnih kromosoma, a moguće je utvrditi i strukturne kromosomske promjene (40). Razvijene su i NIPT analize za mikrodelecije sindrome (22q11.2, 1p36, Cri-du-Chat, Prader-Willi/Angelman), monogenske bolesti (Wilsonova bolest, kongenitalna adrenalna hiperplazija),

neke rijetke bolesti (Gaucherova bolest) pa čak i za neinvazivno prenatalno testiranje cjelogenomskog broja ponavljajućih sekvenci (eng. CNV's) (Tablica 2) (41-46).

Nedavno su objavljeni rezultati sekvencioniranja fetalnog metiloma i transkriptoma iz uzorka majčine krvne plazme. Još je otprilike poznato da je posteljica, koja je primarni izvor slobodne fetalne DNA u majčinoj plazmi, globalno hipometilirana u odnosu na druga tkiva. Istraživanjem metilacijskih biljega specifičnih za posteljicu pokazano je da se metilacijski status posteljice mijenja tijekom gestacije. Dakle, vjerojatno je moguće pratiti dinamiku metilacijskih promjena kod fetusa analizom majčine plazme. Ovaj pristup omogućava potencijalno neinvazivno praćenje fizioloških i patoloških procesa kod ploda. Npr. ukoliko fetus ima trisomiju 21, metilacijski status majčine plazme bit će snižen u odnosu na euploidnu trudnoću, i to bi se trebalo zamijetiti kao statistički značajna razlika između euploidnih i aneuploidnih trudnoća (47).

Glavna prednost primjene slobodne fetalne DNA iz krvi majke je neinvazivnost, odnosno, neškodljivost kako za majku tako i za plod. Druga važna prednost pred konvencionalnim testovima

probira mogućnost je provođenja testiranja tijekom svih stadija trudnoće. Biološke karakteristike slobodne fetalne DNA su takve da je njen udio to veći što je veći stupanj trudnoće, što dodatno pridonosi točnosti rezultata. Nasuprot tome, biokemijski biljezi koji se koriste u konvencionalnim metodama probira imaju ograničenu dijagnostičku vrijednost s obzirom na tjedan trudnoće.

Uz spomenute prednosti primjene slobodne fetalne DNA iz krvi majke, postoje i ograničenja koja u ovom trenutku sprječavaju analizu slobodne fetalne DNA da postane klinički dijagnostički test. Radi se o komercijalno dostupnim genetičkim testovima (DTC, eng. direct to consumer) koji se često provode bez adekvatnog genetičkog savjetovanja. Ponekad su pogrešno interpretirani kao dijagnostički testovi, a zapravo su testovi probira čiji se patološki rezultat mora potvrditi invazivnom metodom. U mnogim zemljama svijeta ne postoji zakonska regulativa niti stručne smjernice koje bi regulirale provođenje NIPT, a zdravstvena osiguranja u pravilu ne pokrivaju troškove testiranja. Testiranja slobodne fetalne DNA usmjerena su na najčešće trisomije, ne detektiraju druge kromosomske abnormalnosti, samo aneuploidije čitavih kromosoma. Postoji relativno velik udio

Tablica 2.

Tehnike, testovi i metode prenatalne dijagnostike s razdobljima trudnoće kada ih je optimalno provesti

INVAZIVNE TEHNIKE		NEINVAZIVNE TEHNIKE			
Dijagnostička metoda	Gestacijski tjedan	Testovi probira	Gestacijski tjedan	Dijagnostički testovi	Gestacijski tjedan
biopsija korionskih resica	11.-14.	kombinirani probir (NN, PAPP-A, beta-HCG)	11.-14.	genetički spol ploda	10.-40.
amniocenteza	15.-18.	dvostruki test (bHCG, AFP)	15.-18.	Rh genotip ploda	10.-40.
kordocenteza	18.-22.	trostruki test (bHCG, AFP, nE)	15.-18.		
		četverostruki test (bHCG, AFP, nE, Inhibin A)	15.-18.		
		NIPT trisomije 21,18,13	10.-40.		
		NIPT ostale aneuploidije (trisomija 16 i 22)	10.-40.		
		NIPT monogenske bolesti	10.-40.		
		NIPT mikrodelecijski sindromi	10.-40.		
		NIPT rijetke bolesti	10.-40.		

NIPT - neinvazivno prenatalno testiranje; PAPP-A - plazmatski protein trudnoće A; NN - nuhalni nabor; bHCG - beta podjedinica humanog korionskog gonadotropina; nE - nekonzjugirani estriol

neuspjelih analiza (2,6%-5,4%), a jedan od razloga je niska koncentracija slobodne fetalne DNA. NIPT nije validiran za višeploidne trudnoće te se svaki pozitivni rezultat NIPT testa mora potvrditi referentnom metodom (17). Pretraga fetalne DNA iz krvi majke u svrhu utvrđivanja fetalne trisomije nije dijagnostički test i iz razloga što je u ovom slučaju uzorak DNA porijeklom iz placente, a kariotip ploda i posteljice se u iznimno rijetkim situacijama ne podudaraju (pojava 'ograničenog placentarnog mozaicizma'). Ovo je važno kada odlučujemo o potvrdnom testu, da li odabrati CVS ili amniocentezu? Ukoliko je CVS izabrana metoda, obavezno treba dugotrajno kultivirati stanice mezenhimalne strome koje nastaju iz ekstraembrijskog mezoderma jer one bolje odražavaju kariotip fetusa od citrofoblasta, stanica vanjskog sloja korionskih resica, iz kojeg dobijamo kratko-trajnu kulturu.

NIPT polako evoluirao prema fetalnoj molekularnoj kariotipizaciji zahvaljujući istraživanjima koja su pokazala da je moguće sekvencionirati čitav fetalni genom neinvazivnim uzorkovanjem. Osim toga, nedavno je pokazano da je analizom slobodne fetalne DNA i slobodne fetalne RNA moguće proučavati fetalni metilomski i transkriptomski profil te potencijalno omogućiti praćenje fizioloških i patofizioloških procesa neinvazivno, koristeći majčinu krv. Odavno postoje i dokazi da se slobodna DNA može koristiti kao biomarker za placentu i općenito za patologiju trudnoće. Uzevši sve ovo u obzir, možemo očekivati da će analiza slobodne fetalne DNA iz krvi majke u budućnosti istisnuti sekvencioniranje egzoma u invazivno dobivenim uzorcima.

Ono što stručnjaci trebaju istražiti i stručna udruženja definirati je: propisati analitičke i kliničke karakteristike testova, regulirati etička pitanja te procijeniti ekonomičnost primjene slobodne fetalne DNA iz krvi majke u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici. Znanstvenicima pak ostaje zadatak da objasne molekularni mehanizam otpuštanja i uklanjanja slobodne fetalne DNA, da otkriju imaju li slobodne nukleinske kiseline u majčinoj plazmi biološku funkciju te da istraže može li se fetalni metilomski i transkriptomski profil iskoristiti u procjeni

i praćenju poremećaja u trudnoći poput pre-eklampsije i preuranjenog poroda.

NOVČANA POTPORA/FUNDING
Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL
Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST
Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form* at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

LITERATURA

- Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu Hrvatskog liječničkog zbora. Nacionalna stručna preporuka za prenatalni probir i dijagnostiku kromosomopatija. *Gynaecol Perinatol* 2010; 19: 119-26.
- Brajenović-Milić B, Stipoljev F. Prenatalna dijagnostika. u: Čulić V, Pavelić J, Radman M i sur. Genetičko informiranje u praksi. Zagreb, Medicinska naklada; 2016; 277-83.
- Barišić I. Postavke hrvatskog društva za humanu genetiku. u: Čulić V, Pavelić J, Radman M i sur. Genetičko informiranje u praksi. Zagreb, Medicinska naklada; 2016; 8-11.
- Prenatalno testiranje i genetika reprodukcije. u: Turnpenny P, Ellard S. Emeryeve osnovne medicinske genetike (14. izdanje). Zagreb, Medicinska naklada; 2011; 325-38.
- Đurić K. Biokemijski testovi probira i njihova primjena u Hrvatskoj. *Paediatr Croat.* 2015; 59: 125-9.
- Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1453-5.
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
- Wagner J. Free DNA-new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochem Med* 2012; 22: 24-38.
- Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-24.
- Bianchi DW, Lo YMD. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 119-31.
- Alberty M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent ND, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27: 415-8.
- Rijnders JPR, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAMJ and Christiaens GCML. Fetal Sex Determination From Maternal Plasma in Pregnancies at Risk for Congenital Adrenal Hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 374-8.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079-85.
- Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20458-63.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16266-71.
- Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road? *Clin Chem.* 2014; 60: 78-87.
- Wagner J. Primjena slobodne fetalne DNA iz krvi majke za probir aneuploidija: prednosti i ograničenja. *Paediatr Croat.* 2015; 59: 118-24.
- 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: 212-7.
- Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirizlar E, Stošić 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 (79): 1-9.
- Fleischer J, Archana Shenoy A, Katherine Goetzinger K, Cottrell CE, Baldridge D, White FV and Shinawi M. Digynic triploidy: utility and challenges of noninvasive prenatal testing. *Clinical Case Reports* 2015; 3: 406-10.

21. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296-305.
22. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 890-901.
23. Peter Benn. Non-Invasive Prenatal Testing Using Cell Free DNA in Maternal Plasma: Recent Developments and Future Prospects, *J Clin Med* 2014; 3: 537-65.
24. Ferres MA, Hui L, Bianchi DW. Antenatal non-invasive DNA testing: clinical experience and impact. *Am J Perinatol.* 2014; 3: 577-82.
25. Hochstenbach R, Nikkels PGJ, Elferink MG, Oudijk MA, van Oppen C, van Zon P et al. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast: proof from an unique case. *Clinical Case Reports* 2015; 3: 489-91.
26. Mennuti MT, Cherry AM, Morrissette 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: 415-9.
27. McNamara CJ, Limone LA, Westover T, Miller RC. Maternal source of false-positive fetal sex chromosome aneuploidy in noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol.* 2014; 123: 69-70.
28. Mao J, Wang T, Wang BJ, Liu YH, Li H, Zhang J, Cram D, Chen Y. Confined placental origin of the circulating cell free fetal DNA revealed by a discordant non-invasive prenatal test result in a trisomy 18 pregnancy. *Clin Chim Acta.* 2014; 433: 190-3.
29. Hochstenbach R, Page-Christiaensen GCML, van Oppen AC, Lichtenbelt KD, van Harsell JT, Brouwer H et al. Unexplained False Negative Results in Noninvasive Prenatal Testing: Two Cases Involving Trisomies 13 and 18. *Case Reports in Genetics.* Volume 2015; 926545: 7.
30. Hall AL, Drendel HM, Verbrugge JL, Reese AM, Schumacher KL, Griffith CB et al. Positive cell-free fetal DNA testing for trisomy 13 reveals confined placental mosaicism. *Genet Med.* 2013; 15: 729-32.
31. Wang Y, Zhu J, Chen Y, Lu S, Chen B, Zhao X et al. Two cases of placental T21 mosaicism: challenging the detection limits of non-invasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2013; 33: 1207-10.
32. Pan M, Li FT, Li Y, Jiang FM, Li DZ, Lau TK, Liao C. Discordant results between fetal karyotyping and non-invasive prenatal testing by maternal plasma sequencing in a case of uniparental disomy 21 due to trisomic rescue. *Prenat Diagn.* 2013; 33: 598-601.
33. Choi H, Lau TK, Jiang FM, Chan MK, Zhang HY, Lo PS, Chen F, Zhang L, Wang W. Fetal aneuploidy screening by maternal plasma DNA sequencing: 'false positive' due to confined placental mosaicism. *Prenat Diagn.* 2013; 33: 198-200.
34. Crooks K, Edwardsen G, O'Connor S, Powell C, Vargo D, Vora N and Kaiser-Rogers K. Cell-free DNA testing in a trisomy 21 pregnancy with confined placental mosaicism for a cell line with trisomy for both chromosomes 18 and 21. *Clinical Case Reports* 2016; 4: 19-22.
35. Duggo N, Padula F, Mobili L, Brizzi C, D'Emidio L, Cigninin P et al. Six consecutive false positive cases from cell-free fetal DNA testing in a single referring centre. *Journal of Prenatal Medicine* 2014; 8: 31-5.
36. Amant F, Veheercke 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: 814-9.
37. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 1532-4.
38. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 640. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2015; 126: 31-7.
39. Warsof SL, Larion S and Abuhamad AZ. Impact of NIPT on diagnostic procedures. *Prenatal Diagnosis* 2015; 35: 972-9.
40. Wang T, Chengying Duan C, Shen C, Xiang J, Quanze He Q, Ding J. Detection of complex deletions in chromosomes 13 and 21 in a fetus by noninvasive prenatal testing. *Molecular Cytogenetics* 2016; 9: 3.
41. Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212 (332): 1-9.
42. Rapacchia G, Lapucci C, Pittalis MC, Youssef A and Farina A. The First Case Report in Italy of Di George Syndrome Detected by Noninvasive Prenatal Testing. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology*, Volume 2015; 813104: 3.
43. Weigang Lv, Xianda Wei, Ruolan Guo, Qin Liu, Yu Zheng, Jiazhen Chang et al. Noninvasive Prenatal Testing for Wilson Disease by Use of Circulating Single-Molecule Amplification and Resequencing Technology (cSMART). *Clinical Chemistry* 2015; 61 (1): 172-81.
44. New MI et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99: 1022-30.
45. Zeevi DA, Altarescu G, Weinberg-Shukron A, Zahdeh F, Dinur T, Chicco G et al. Proof-of-principle rapid noninvasive prenatal diagnosis of autosomal recessive founder mutations. *J Clin Invest.* 2015; 125: 3757-65.
46. Lefkowitz RB, Tynan JA, Liu T et al. Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genome-wide detection of fetal copy number variants. *Am J Obstet Gynecol* 2016.
47. Wong AI, Lo YM. Noninvasive fetal genomic, methylomic, and transcriptomic analyses using maternal plasma and clinical implications. *Trends Mol Med.* 2015; 21: 98-108.

Summary

NONINVASIVE PRENATAL TESTING

J. Wagner

Prenatal diagnosis is a complex diagnostic procedure whose aim is to investigate whether illness or pathological condition in the fetus is present. Around 4% of the newborn are born with the some kind of a genetic condition: chromosomopathy, monogenic disease or polygenic/multifactorial disorder. Prenatal genetic testing is performed using molecular genetics or cytogenetic techniques with the aim to make a diagnosis in high risk pregnancies. Prenatal diagnostic methods are either invasive or noninvasive. Invasive methods are reliable and true, but carry small risk for fetus and for mother. Noninvasive methods are risk free, but not reliable enough to be considered diagnostic, rather screening tests. With the discovery of the presence of free fetal DNA in maternal circulation in 1997, noninvasive prenatal diagnosis has become one of the most propulsive fields in medicine. Term noninvasive prenatal testing (NIPT) is usually used when we talk about noninvasive prenatal testing of aneuploidies by analyzing free DNA form maternal blood. Although highly specific technique, it is still considered advanced method of screening and not a diagnostic test. It can be expected that technological advancements will provide noninvasive detection of fetal submicroscopic aneuploidies, monogenic diseases, fetal genome as well as methylom and transcriptome analysis. In a future, analysis of free fetal DNA from maternal blood will probably replace exome sequencing of invasively obtained samples.

Descriptors: NONINVASIVE PRENATAL TESTING, ANEUPLOIDY, FREE FETAL DNA, NONINVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS, MATERNAL PLASMA, PRENATAL SCREENING

Primljeno/Received: 21. 3. 2016.

Prihvaćeno/Accepted: 7. 4. 2016.