

Primjena slobodne fetalne DNA-a iz krvi majke za probir aneuploidija: prednosti i ograničenja

Jasenska Wagner*

Prenatalna dijagnostika obuhvaća niz dijagnostičkih postupaka kojima ispituje postojanje bolesti ili patološkog stanja kod ploda. Metode koje se primjenjuju radi prenatalne dijagnostike dijele se na invazivne i neinvazivne. Otkrićem prisutnosti slobodne fetalne DNA u cirkulaciji trudnice 1997.g., neinvazivna prenatalna dijagnostika postala je jedno od najdinamičnijih područja istraživanja u medicini. Primjena analize slobodnog DNA-a iz majčine krvi za detekciju fetalnog rhesus D antigen statusa i fetalnog spola rasprostranjena je dijagnostička metoda u europskim kliničkim laboratorijima. Za razliku od spomenutih, neinvazivno prenatalno testiranje ploda na aneuploidije i dalje se smatra naprednom metodom probira, a ne dijagnostičkim testom. Kao i svaka druga laboratorijska tehnika, i ova ima svoje prednosti i ograničenja. S obzirom na to da je riječ o prenatalnoj dijagnostici, iznimno je važno da mogućnosti ovih testova i područje njihove primjene razumiju medicinsko osoblje i budući roditelji. Brzi razvoj tehnologije u skoroj budućnosti omogućit će neinvazivnu detekciju i fetalnih submikroskopskih aneuploidija, monogenetskih poremećaja ili čak analizu čitavog fetalnog genoma. Prije uvođenja analize slobodnog fetalnog DNA-a u rutinsku praksu, potrebno je regulirati etička pitanja poput autonomije i prava nerođenog djeteta, dostupnosti testiranja i mogućnost selekcije spola iz nemedicinskih razloga.

Ključne riječi: prenatalna dijagnoza; aneuploidija; kromosomski poremećaji

Prenatalna dijagnostika obuhvaća niz dijagnostičkih postupaka kojima ispituje postojanje bolesti ili patološkog stanja ploda. Dobivena informacija omogućava budućim roditeljima da aktivno, uz pomoć liječnika, odlučuju o daljnjem tijeku i ishodu trudnoće.

Kod oko 4% novorođenčadi nalazimo bolesti koje u potpunosti ili djelomično imaju genetičku etiologiju, bilo da je riječ o kromosomskom poremećaju, monogenetskoj bolesti ili poligenetskoj/multifaktorskoj bolesti (1). Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu 2010. godine je donijelo Nacionalnu preporuku za prenatalni probir i dijagnostiku kromosomopatija, prema kojoj se neinvazivni testovi probira preporučuju u nisko rizičnim trudnoćama, odnosno u trudnicama mlađih od 36 godina, koje imaju negativnu osobnu ili obiteljsku anamnezu, a invazivna prenatalna dijagnostika trudnicama s navršених 36 godina života i starijim zbog dokazanog povećanog rizika za Downov sindrom, ali i za druge sindrome uzrokovane promjenama kromosoma, posebno trisomije. Osim zbog poodmakle dobi trudnice, inva-

zivna prenatalna dijagnostika medicinski je opravdana i preporučuje se; u pozitivnoj ili opterećenoj obiteljskoj i/ili reproduktivnoj anamnezi, kod pozitivnih ultrazvučnih nalaza kromosomopatija i pozitivnog nalaza testova probira prvog ili drugog tromjesečja (2).

Definitivnu prenatalnu dijagnozu većine genskih i kromosomskih poremećaja nije moguće postaviti bez provedbe invazivnih zahvata, koji pak nose rizik za majku i plod. Zato su se dugi niz godina tražile nove, pouzdane i prikladne metode za primjenu u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici.

* Laboratorij za medicinsku genetiku, Katedra za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek

Adresa za dopisivanje:

Doc. dr. sc. Jasenska 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, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, e-mail: jwagner@mefos.hr

Primljeno/Received: 17. 2. 2015., Prihvaćeno/Accepted: 14. 5. 2015.

Početak devedesetih godina prošlog stoljeća došlo je do razvoja neinvazivnih metoda prenatalne dijagnostike poznatih još i kao metode probira (engl. *screening methods*). One se temelje na mjerenju koncentracije određenih biokemijskih biljega u krvnom serumu trudnice i nalazu ultrazvuka (UZV), a uzimaju u obzir i dob trudnice te stadij trudnoće. Do prije nekoliko godina izvodili su se isključivo u 2. tromjesečju trudnoće i, ovisno o tipu testa, uključivali su mjerenje dvaju ili više serumskih biljega iz krvi trudnice. Kombinacijom mjerenja debljine nuchalnog nabora (NN) i dvaju biokemijskih biljega u majčinom serumu (plazmatski protein trudnoće-A (PAPP-A) i slobodna β podjedinica humanog korionskog gonadotropina (β HCG)) postignut je (donedavno) najučinkovitiji neinvazivni test probira: kombinirani probir u 1. tromjesečju (3). Usprkos svim naporima uložnim u razvoj biokemijskih testova probira, stopa lažno pozitivnih rezultata kod ovih testova iznosi 1.9-5.2%, a lažno negativnih 12-23% (4). Zbog nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti, ovi se testovi smatraju metodom probira koja uključuje ili isključuje nužnost invazivnog zahvata i citogenetičke analize kao najtočnije potvrde dijagnoze (5).

Vjerovalo se da će nakon otkrića fetalnih stanica u majčinom krvotoku (6) vrlo brzo doći do razvoja definitivnih neinvazivnih metoda prenatalne dijagnostike, jer su fetalne stanice dobar izvor genetičkog materijala fetusa kod kojeg nema interferencija od strane majčinog DNA-a te su stoga pogodne za biokemijske, genske i kromosomske analize. No kad je 1990. god. *Diana Bianchi* otkrila stanice s Y kromosomom kod žena koje su rodile sinove prije više desetljeća (7, 8), dokazano je da fetalne stanice mogu zaostati u majčinom organizmu godinama nakon porođaja te tako interferirati u dijagnostičkim postupcima u kasnijim trudnoćama. Primjena analize fetalnih stanica do danas nije zaživjela u dijagnostičkoj praksi, usprkos brojnim obećavajućim preliminarnim rezultatima (9).

Novi, alternativni izvor fetalnog genetičkog materijala za prenatalnu dijagnostiku otkrili su *Dennis Lo i sur.* radom objavljenim u *Lancetu* 1997. god. U spomenutom radu, autori su dokazali prisutnost slobodnog fetalnog DNA-a u majčinoj krvi, odnosno utvrdili su muški spol djeteta analizom slijeda gena s Y kromosoma (10). Daljnja istraživanja pokazala su da koncentracija slobodnog fetalnog DNA-a raste tijekom gestacije (11) te da doseže vrhunac između 10. i 21. gestacijskog tjedna kad udio fetalne frakcije iznosi 10-20%. Udio fetalne frakcije ovisi o majčinom BMI-u, gestacijskoj dobi, fetalnoj aneuploidiji, plodnosti trudnoće. Utvrđeno je da je eliminacija slobodnog fetalnog DNA-a iz majčine cirkulacije nakon porođaja izrazito brza ($t_{1/2}=16.3$ minute), te da već dva sata nakon porođaja više nije detektabilna (12), što povećava specifičnost analize slobodnog fetalnog DNA-a i značajno je razlikuje od analize fetalnih sta-

nica u majčinom krvotoku koje mogu zaostati u krvi i nekoliko godina nakon porođaja (13). Slobodni fetalni DNA podrijetlom je iz stanica placente, sinciotrofoblasta (14), te je u odnosu na majčin slobodni DNA kraća, degradiranija i hipometilirana. U nekim slučajevima detektabilna je već od 4. gestacijskog tjedna, točnije, 14 dana nakon IVF zahvata (15). Prisutnost slobodnog fetalnog DNA-a dokazana je i u drugim tjelesnim majčinim tekućinama kao što su plodova voda, urin, likvor i peritonejska tekućina (16).

Prva primjena analize slobodnog fetalnog DNA-a bila je radi neinvazivnog određivanja spola ploda, za što je postignuta osjetljivost od 87-100% i specifičnost od 98-100% (17). Analiza slobodnog fetalnog DNA-a radi određivanja spola ploda pouzdana je od 5. gestacijskog tjedna, a primjenjuje se kod sumnje na X vezanu bolest da bi se u slučaju ženskog ploda izbjegla primjena invazivnog zahvata, za potvrdu genetičkog spola u slučaju ultrazvučno otkrivenog nedovoljno oblikovanog ili dvosmislenog spolovila te pri sumnji na kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju (18, 19).

Osim radi određivanja spola ploda, analiza slobodnog fetalnog DNA-a najčešće se primjenjuje za utvrđivanje fetalnog RhD statusa kod RhD negativne trudnice, koja ima povećan rizik za razvoj hemolitičke bolesti novorođenčeta zbog prijašnje trudnoće ili povišenog titra protutijela. Neinvazivno određivanje fetalnog RhD statusa je jedina primjena analize slobodnog fetalnog DNA-a u rutinskoj kliničkoj praksi u europskim zdravstvenim sustavima. Iznimka je Velika Britanija gdje je i neinvazivno određivanje spola dio zdravstvene skrbi (20). Analiza slobodnog fetalnog DNA-a iz majčine krvi za detekciju fetalnog rhesus D antigen statusa i fetalnog spola testovi su koji se primjenjuju radi neinvazivne prenatalne dijagnostike.

Glavni analitički problem i ograničavajući faktor za širu primjenu analize slobodnog fetalnog DNA-a iz trudničke plazme nemogućnost je odvajanja majčinog od fetalnog slobodnog DNA-a. Tijekom godina primjenjivali su se različiti eksperimentalni pristupi ne bi li se nadvladalo ovo ograničenje. Najviše uspjeha postignuto je primjenom tzv. digitalnog PCR (21) i genetičkog sekvenciranja druge generacije (22, 23). Ovim tehnikama, uz pomoć bioinformatike, mjeri se relativna količina slobodnog DNA-a kromosoma 21 (direktno se mjeri ukupan broj kopija kromosoma 21 u odnosu na referentni kromosom) te se na taj način procjenjuje broj kromosoma 21 (ili bilo kojeg drugog) u uzorku koji sadrži smjesu fetalnog i majčinog slobodnog DNA-a.

Nedostatak tehnike genetičkog sekvenciranja druge generacije je visoka cijena, dugotrajnost i kompleksnost analize, no daljnji napredak tehnologije te provođenje velikih kliničkih studija tijekom posljednjih godina doveli su do razvoja suvremenih neinvazivnih prenatalnih testova (NIPT)

koji analiziraju slobodni DNA iz majčine krvi. Tri su inačice NIPT-a prisutne na tržištu:

- masivno paralelno sekvenciranje čitavog genoma koje karakterizira 10-20 milijuna očitavanja te potencijal za utvrđivanje aneuploidija svih kromosoma; temelji se na sekvencioniranju i brojanju velikog broja pojedinačnih DNA fragmenata iz plazme i dodjeljivanju odgovarajućem kromosomu
- ciljano sekvenciranje kromosoma kojim se radi manji broj očitavanja, jeftinije i brže se dođe do rezultata, ali se dobije manja količina informacija o genomu: uključuje dodatni početni korak u kojem se selektivno umnažaju odabrane regije na kromosomima od interesa (13, 18, 21) te nakon toga evaluira postoji li višak signala s pojedinog kromosoma u odnosu na drugi
- SNP sekvenciranje 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 (4); u jednoj reakciji umnaža se 20 000 SNP sekvenca koje se nakon toga sekvenciraju, odrede položaji na kromosomima te procijeni je li riječ o monosomičnom, disomičnom ili trisomičnom fetusu

Iako imaju iznimno visoku stopu detekcije Downovog sindroma (Tablica 1.) već u 10. gestacijskom tjednu, NIPT se još ne smatraju dijagnostičkim testovima i najčešće se primjenjuju kao sekundarni testovi probira kod žena koje imaju visok rizik nakon tradicionalnih probirnih protokola. Ispitivani su i validirani u jednoplodnim trudnoćama s rizikom trisomije 21 zbog majčine visoke dobi, patološkog nalaza biokemijskog probira, osobne ili obiteljske anamneze aneuploidije ili patološkog nalaza UZV-a. Prvi takav test predstavljen je u listopadu 2011. godine te od tada iznimno brzo proširen po čitavom svijetu, zahvaljujući komercijalnim laboratorijima. Trenutna NIPT ograničenja su relativno velik udio neuspjelih analiza (2,6%-5,4%) te usmjerenost na najčešće trisomije. Kako je ipak još i sad riječ 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: amniocentezom ili biopsijom korionskih resica (24).

Primjena analize slobodnog DNA-a iz majčine krvi za detekciju fetalnog rhesus D antigen statusa i fetalnog spola u

europskim kliničkim laboratorijima smatra se dijagnostičkim testom. Neinvazivno prenatalno testiranje ploda na aneuploidije i dalje se smatra naprednom metodom probira, a ne dijagnostičkim testom. Uz nekoliko rijetkih iznimaka, testiranje se provodi u obliku *direct to consumer* testova, bez genetičkog savjetovanja.

Vrlo brzo nakon predstavljanja NIPT-a 2011. god. stručna udruženja poput *The American College of Obstetricians and Gynaecologists* objavila su smjernice za implementaciju NIPT-a u postojeće prenatalne protokole, odnosno preporučila da se NIPT nudi samo trudnicama s visokim rizikom za aneuploidiju, a da invazivne metode budu primijenjene samo kod trudnica s iznimno visokim rizikom za aneuploidiju, odnosno da NIPT bude opcija nakon patološkog nalaza kombiniranog probira, a prije invazivnog zahvata (25). Na ovaj način NIPT je smanjio broj invazivnih testova, no nije poboljšao stopu detekcije te je smanjio postotak otkrivenih drugih kromosomskih abnormalnosti koje bi standardna kariotipizacija detektirala. NIPT nije validiran za višepodne trudnoće, a osim testiranja na najčešće trisomije, mogu se ispitati abnormalnosti u spolnim kromosomima te odrediti spol ploda (26).

Do danas je provedeno više od 10 kliničkih istraživanja validacije NIPT-a za visoko rizičnu populaciju trudnica (27, 28). Rezultati NIPT studija pokazali su da je točnost detekcije sindroma Down 99,5%, sindroma Edwards 99% i sindroma Patau 79-92%. Pet kliničkih istraživanja na kombiniranoj populaciji (i niskorizične i visokorizične trudnoće) pokazalo je slične rezultate: visoku stopu detekcije i nisku stopu lažno pozitivnih rezultata (0,2%) (29).

NIPT testiranje je neuspješno u oko 2% slučajeva, a uglavnom ovisi o udjelu fetalne frakcije u ukupnom slobodnom DNA-u u cirkulaciji. Većina laboratorija za graničnu vrijednost udjela fetalne frakcije u ukupnom slobodnom DNA-u uzimaju 4% i to navode na nalazima. Ako je udio fetalne frakcije manji od 4%, uzorak se ne može interpretirati (30). Na udio slobodne frakcije utječu: indeks tjelesne mase trudnice, gestacijska dob, tip aneuploidije, višeploidnost i mozaicizam. Među lažno pozitivnim slučajevima značajni su biološki razlozi poput ograničenog placentnog mozaicizma, uniparentne disomije, mozaicizma kod majke, gubitak jednog od blizanaca, maligna bolest trudnice (31). Zbog svega navedenoga, ultrazvučna dijagnostika je i dalje vrlo važna kao komplementarna metoda prenatalne dijagnostike radi isključivanja strukturnih fetalnih anomalija.

Višestruke trudnoće su jedan od razloga netočnog rezultata: npr. u slučaju dizigotnih blizanaca, fetalna frakcija po pojedinom fetusu bit će niža, a još veće razrjeđenje slobodnog fetalnog DNA-a frakcije dogodit će se u slučaju kada je jedan od blizanaca euploidan, a drugi aneuploidan (30).

TABLICA 1. Karakteristike neinvazivnog prenatalnog testiranja u detekciji trisomije kromosoma 21, 18 i 13

Aneuploidija	Osjetljivost (%) (95% CI)	Specifičnost (%) (95% CI)
Trisomija 21	98.6–100 (95.9–100)	100 (99.1–100)
Trisomija 18	97.2–100 (85.5–99.9)	100 (99.2–100)
Trisomija 13	78.6–91.7 (49.2–99.9)	100 (99.2–100)

CI – Interval pouzdanosti

TABLICA 2. Neki primjeri neslaganja rezultata neinvazivnog prenatalnog testiranja i fetalnog kariotipa

NIPT rezultat	Fetalni kariotip	CVS	Referenca
T13	46,XX (amniocenteza)	CPM: 46,XX,+13,der(13; 13)(q10; q10)[5] (kratkotrajna kultura)	31
T13	46,XY (fetalno tkivo)	CPM: 47,XY,+13 (kratkotrajna kultura)	33
T13	46,XY (amniocenteza i krv iz pupčane vrpce)	CPM:47, XY,+13 [10]/46, XY [12]	36
T21	46,XX,upd (21)mat	CPM: T21	38
T22	normalan nalaz sekvencioniranjem uzorka krvi iz pupčane vrpce	CPM: T22	39
47,XXY	46,XY (amniocenteza)	CPM: 49,XXX,+7,+21 [24]/46,XY [6]	34
T21	T18	T21 and T18 mozaicizam	35
Lažno negativan	T21	euploidne stanice u placenti	37

T – trisomija, CPM – ograničeni placentni mozaicizam

TABLICA 3. Usporedba NIPT metodologija za detekciju aneuploidija

analitički parametar	kromosom	masivno paralelno sekvenciranje čitavog genoma	ciljano sekvenciranje kromosoma od interesa	SNP sekvenciranje lokusa na kromosomima od interesa
osjetljivost detekcije trisomije ⁴ (%)	21	98.6	100	100
	18	100	97.2	100
	13	91.7	78.6	100
specifičnost detekcije trisomije ⁴ (%)	21	99.8	100	100
	18	99.7	99.8	100
	13	99.0	99.4	100
broj uzoraka bez rezultata ³⁰ (%)	21	2.3 (2-2.7)	4.3 (3.8-4.7)	7.7 (6.3-9.2)
	18	2.0 (1.9-2.6)	4.3 (3.9-4.9)	7.6 (6.3-9.2)
	13	2.8 (2.4-3.3)	3.2 (2.6-3.9)	7.7 (6.3-9.2)
broj lažno pozitivnih rezultata ³⁰ (%)	21	0.19 (0.11-0.33)	0.01 (0-0.09)	0 (0-0.29)
	18	0.15 (0.08-0.28)	0.08 (0.03-0.19)	0.09 (0-0.54)
	13	0.32 (0.2-0.51)	0.06 (0-0.25)	0 (0-0.28)
stopa detekcije ³⁰ (%)	21	99 (97.7-99.7)	99.4 (96.4-100)	100 (96.8-100)
	18	97.6 (92.8-99.5)	97.9 (92.2-99.9)	96.4 (80.8-100)
	13	89.2 (74.7-96.3)	81.8 (51.2-96.0)	100 (79.7-100)

Literaturno najzastupljeniji razlog netočnih NIPT nalaza je ograničeni placentni mozaicizam (Tablica 2.) (30-38). Tijekom proteklih godina nekoliko istraživanja dokazalo je da je fetalni slobodni DNA placentarnog podrijetla. Budući da je pojavnost ograničenog placentarnog mozaicizma (nepodudarnost kariotipova posteljice i ploda) otprije poznat fenomen koji se javlja u 1-2% slučajeva biopsije korionskih resica, jasna je biološka podloga ovakvih nalaza (30, 31).

Svaka od ranije spomenutih NIPT metodologija ima svoje prednosti, npr. metode masivnog i paralelnog sekvenciranja omogućavaju veću dubinu sekvenciranja u slučaju niske razine fetalne frakcije slobodne DNA ili u slučaju testiranja malih promjena u broju ponavljanja (engl. *copy number variation*, CNV). SNP metoda trebala bi moći isključiti neravnotežu

u genomu koja je majčinog porijekla, otkriti dodatno prisutne haplotipove u smjesi slobodne DNA koji bi ukazivali na neotkrivenu višestruku trudnoću (*vanishing twin* fenomen), pružiti informaciju o roditeljskom podrijetlu aneuploidije, ukazati na diandričnu triploidiju, ne-očinstvo, konsangvinitet i uniparentnu disomiju. U slučaju kada se radi o trudnoći začetoj doniranom jajnom stanicom, trebala bi moći detektirati dodatne fetalne alele koji nisu prisutni kod trudnice (40). 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 mogla bi utjecati na konačan NIPT rezultat. Mogućnost SNP metode da identificira dodatne fetalne haplotipove trebala bi u konačnici dovesti do manjeg broja

lažno pozitivnih rezultata (41). Usporedba NIPT metodologija temeljem nekih od analitičkih karakteristika prikazana je u Tablici 3.

Glavna prednost primjene slobodnog fetalnog DNA-a iz majčine krvi za probir aneuploidija 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 slobodnog fetalnog DNA-a su takve da je njegov udio to veći što je veći stupanj trudnoće, što dodatno pridonosi točnosti rezultata. Nasuprot tome, biokemijski biljezi koji se primjenjuju u konvencionalnim metodama probira imaju ograničenu dijagnostičku vrijednost s obzirom na tjedan trudnoće.

Uz spomenute prednosti primjene slobodnog fetalnog DNA-a iz majčine krvi za probir aneuploidija, postoje i ograničenja koja u ovom trenutku sprječavaju analizu slobodnog fetalnog DNA-a da postane klinički dijagnostički test. Riječ je o komercijalno dostupnim genetičkim testovima (DTC, engl. *direct to consumer*) koji se često provode bez adekvatnog genetičkog savjetovanja. Katkad su pogrešno interpretirani kao dijagnostički testovi, a zapravo su testovi probira kojih se patološki rezultat mora potvrditi invazivnom metodom. U mnogim zemljama svijeta ne postoji zakonska regulativa ni stručne smjernice koje bi regulirale provođenje NIPT-a, a zdravstvena osiguranja u pravilu ne pokrivaju troškove testiranja. Testiranja slobodnog fetalnog DNA-a usmjerena su na najčešće trisomije, ne detektiraju druge kromosomske abnormalnosti, samo aneuploidije čitavih kromosoma. Postoji relativno velik udio neuspjelih analiza (2,6%-5,4%), a jedan od razloga je niska koncentracija slobodnog fetalnog DNA-a. NIPT nije validiran za višeploidne trudnoće te se svaki pozitivan rezultat NIPT testa mora potvrditi referentnom metodom. Posljedica provođenja NIPT –a je smanjenje invazivnih testova, no nije poboljšalo stopu detekcije te je smanjilo postotak otkrivenih drugih kromosomskih abnormalnosti koje bi standardna kariotipizacija detektirala.

Iako je NIPT vrlo brzo prošao put od temeljnih laboratorijskih istraživanja do kliničke primjene, unatoč tome što je NIPD za određivanje RHD i SRY statusa dio rutinske antenatalne skrbi u mnogim dijelovima Europe i što je NIPT za najčešće autosomne aneuploidije u procesu integracije u kliničku skrb širom svijeta, NIPT za aneuploidije još i sad nije dijagnostički test.

Novost u prenatalnom probiru, određivanje fetalnog spola i aneuploidije gonosoma zahtijeva daljnje studije, a za očekivati je da će se u bliskoj budućnosti, uz daljnju pomoć bioinformatike, mogućnosti testiranja proširiti na detekciju submikroskopskih abnormalnosti i monogenskih poreme-

ćaja, a vjerojatno i čitavog genoma. Ono što buduće studije trebaju istražiti i stručna udruženja definirati je: propisati analitičke i kliničke karakteristike testova, regulirati etička pitanja te procijeniti ekonomičnost primjene slobodnog fetalnog DNA-a iz majčine krvi u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici.

Kratice:

NIPT – neinvazivno prenatalno testiranje
NIPD – neinvazivna prenatalna dijagnostika
BMI – indeks tjelesne mase
UZV – ultrazvuk
PAPP-A – plazmatski protein trudnoće A
NN – nuhalni nabor
βHCG – beta podjedinica humanog korionskog gonadotropina
PCR – lančana reakcija polimerazom
CPM – ograničeni placentni mozaicizam
CNV – promjena broja ponavljanja

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Svi autori jednako su doprinijeli izradi rada/All authors have equally contributed to a manuscript writing

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

1. Zergollern Lj. Razvoj prenatalne dijagnostike u Hrvatskoj. u: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K. Prenatalna dijagnostika i terapija. 1. izd. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 3-15.
2. Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu Hrvatskog liječničkog zbora. Nacionalna stručna preporuka za prenatalni probir i dijagnostiku kromosomopatija. *Gynaecol Perinatol*. 2010;19:119-26.
3. Cuckle H. Time for total shift to first trimester Down's screening. *Lancet*. 2001;358:1658-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06724-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06724-1)
4. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive Prenatal prenatal Testingtesting: The future future is is Nownow. *Rev Obstet Gynecol*. 2013;6:48-62.
5. Huderer-Đurić K, Suchanek E. Biokemijski probir sindroma Down u trudnoći. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K. Prenatalna dijagnostika i terapija. 1. izd. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 173-86.
6. 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.3.1453>
7. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105:574-83. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01383.x>
8. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:705-8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.2.705>
9. Wagner J. Suvremene metode prenatalne dijagnostike. *Medicinski vjesnik*. 2010;42:37-48.
10. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
11. Wagner J. Free DNA-new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochem Med*. 2012;22:24-38. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2012.004>
12. 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. <http://dx.doi.org/10.1086/302205>
13. Bianchi DW, Lo YMD. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann NY Acad Sci*. 2001;945:119-31. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03872.x>
14. Albetty 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. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1700>
15. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev*. 2007;83:563-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.11.001>
16. Bianchi DW. Circulating Fetal DNA: Its origin and diagnostic potential – A review. *Placenta*. 2004;25:93-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2004.01.005>
17. Avent ND and Chitty LN. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn*. 2006;26:598-603. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1493>
18. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0029-7844\(01\)01480-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0029-7844(01)01480-6)
19. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: Impact impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13:69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2007.12.007>
20. 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. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00165.x>
21. Lun FMF, Tsui NBY, Chan KCA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:19920-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810373105>
22. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810641105>
23. 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808319105>
24. 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. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2013.202663>
25. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol*. 2012;120:1532-4. <http://dx.doi.org/10.1097/01.AOG.0000423819.85283.f4>
26. Chiu RW. Noninvasive prenatal testing by maternal plasma DNA analysis: Current practice and future applications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2014;74:48-53. <http://dx.doi.org/10.3109/00365513.2014.936681>
27. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, 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. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2011.73>
28. 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. <http://dx.doi.org/10.1097/AOG.0b013e31824fb482>
29. Lo JO, Cori D F, Norton ME, Caughey AB. Noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol Surv*. 2014;69:89-99. <http://dx.doi.org/10.1097/OGX.0000000000000029>
30. Peter Benn. Non-invasive prenatal testing using cell free DNA in maternal plasma: Recent recent developments and future prospects. *J Clin Med*. 2014;3:537-65. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm3020537>
31. Ferres MA, Hui L, Bianchi DW. Antenatal noninvasive DNA testing: clinical experience and impact. *Am J Perinatol*. 2014;3:577-82. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1371706>
32. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*. 2014;35:S64-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.014>
33. 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;209:415-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jajog.2013.03.027>
34. McNamara CJ, Limone LA, Westover T, Miller RC. Maternal source of false-positive fetal sex chromosome aneuploidy in noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol*. 2014;123:695-705. <http://dx.doi.org/10.1097/01.AOG.0000447381.48282.c3>
35. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.03.011>
36. Hall AL, Drendel HM, Verbrugge JL, et al. Positive cell-free fetal DNA testing for trisomy 13 reveals confined placental mosaicism. *Genet Med*. 2013;15:729-32. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2013.26>
37. 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. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.4212>
38. 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. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.4069>
39. 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. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.4024>
40. Cuckle H, Benn P, Pergament E. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy as a clinical service. *Clin Biochem*. 2015; <http://dx.doi.org/10.106/j.clinbiochem.2015.02.011> (Article in press)
41. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, 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.e1-9.

SUMMARY

Use of free fetal DNA from maternal blood in screening for aneuploidies: advantages and limitations

J. Wagner

Prenatal diagnosis includes an array of diagnostic procedures performed to identify the existence of a disease or pathologic condition in the fetus. The methods employed in prenatal diagnosis are divided into invasive and noninvasive ones. Detection of free fetal DNA in maternal circulation in 1997 made noninvasive prenatal diagnosis one of the most dynamic fields of research in medicine. Analysis of free fetal DNA from maternal blood for detection of fetal rhesus D antigen status and fetal sex has become a widely used diagnostic method in European clinical laboratories. Unlike those mentioned above, noninvasive prenatal fetal testing for aneuploidies is still considered as a screening method rather than a diagnostic test. Like any other laboratory technique, it also has some advantages and limitations. As it is prenatal diagnosis, it is of utmost importance for both medical professionals and parents to understand the possibilities of these tests and areas of their application. In the near future, fast technological advances will certainly enable noninvasive detection of fetal sub-microscopic aneuploidies, monogenic disorders or even the analysis of the whole fetal genome. Prior to introducing analysis of free fetal DNA in daily routine, some ethical issues such as autonomy and rights of the unborn fetus, availability of testing and the possibility of sex selection for non-medical reasons should be properly regulated.

Keywords: prenatal diagnosis; aneuploidy; chromosome aberrations