

## Suvremene metode prenatalne dijagnostike

**Jasenska Wagner**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Medicinski fakultet  
Katedra za medicinsku biologiju  
Laboratorij za citogenetiku

Kontakt:

Jasenska Wagner  
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku  
Medicinski fakultet  
Katedra za medicinsku biologiju  
Laboratorij za citogenetiku  
J. Huttlera 4, 31000 Osijek  
Tel. 031 512826, Fax. 031 505615  
Mob. 091 5018088, E-mail: [jwagner@mefos.hr](mailto:jwagner@mefos.hr)

Pregledni članak

UDK 618.21-073

Prispjelo: 26. siječnja 2010.

Metode koje se primjenjuju u suvremenoj prenatalnoj dijagnostici mogu biti invazivne i neinvazivne. Uobičajene invazivne metode, poput amniocenteze i biopsije korionskih resica, primjenjuju se posljednjih tridesetak godina. Posljednjih dvadesetak godina intenzivno se razvijaju neinvazivne tehnike koje trebaju biti potpuno bezopasne, i za majku, a i za plod, te lako dostupne široj trudničkoj populaciji. U radu je dan pregled najčešće primjenjivanih rutinskih tehnika prenatalne dijagnostike te najnovija dostignuća u tom području, s naglaskom na mogućnosti primjene analize slobodne fetalne DNA iz krvne plazme majke.

**Ključne riječi:** Trudnoća; Prenatalna dijagnostika; Fetalne aneuploidije; Trostruki test; Kombinirani probir; Ultrazvuk; Amniocenteza; Biopsija korionskih resica; Slobodna fetalna DNA; Krvna plazma.

### UVOD

Prenatalna dijagnostika obuhvaća niz dijagnostičkih postupaka kojima ispituje postojanje bolesti ili patološkoga stanja kod ploda. Svrha je prenatalne dijagnostike omogućiti pravovremene medicinske postupke u svrhu liječenja ili upoznavanja roditelja s bolešću ploda kako bi na osnovi dobivenih informacija pravodobno donijeli odluku o ishodu trudnoće (1).

Dijagnostičko prenatalno testiranje uključuje invazivne i neinvazivne tehnike. Invazivne tehnike uključuju ulazak sonde ili igle u majčinu maternicu te mogu, iako rijetko, uzrokovati oštećenja majke, a i ploda. Primjena invazivnih dijagnostičkih metoda ograničena je na pacijentice kod kojih postoji apsolutna indikacija za zahvat, odnosno na one s visoko rizičnom trudnoćom. Neinvazivne tehnike, nazvane još i metode probira, upućuju na povećani rizik za neku bolest, ali ne mogu potvrditi postojanje bolesti

ploda. Metode probira uključuju ultrazvučni pregled i mjerenje biokemijskih biljega u majčinu serumu. Namijenjene su svim trudnicama bez obzira na njihovu dob i osobno ili obiteljsko genetičko opterećenje. Te metode zbog neinvazivnosti, jednostavnije tehničke izvedbe i niže cijene imaju širu primjenu u trudničkoj populaciji. Ako se neinvazivnim metodama utvrdi povećani rizik za neku bolest, potvrda ili isključenje dijagnoze postiže se invazivnim metodama (1).

Genetičko savjetovanje jest postupak kojim se daju obavijesti o mogućnostima razvoja i prenošenja nasljedne bolesti na potomstvo te o mogućoj prevenciji. Rezultati analiza provedenih u svrhu postavljanja prenatalne dijagnoze, naročito ako se radi o invazivnom zahvatu i patološkom nalazu, roditeljima trebaju biti priopćeni i pojašnjeni od strane educirane osobe, tj. u genetičkom savjetovaštvu medicinskoga genetičara. Roditelji bi trebali i prije samoga testiranja biti upućeni u

osjetljivost, specifičnost te prednosti i nedostatke svake od metoda prenatalne dijagnostike te u mogućnosti koje im se pružaju u slučaju patološkoga nalaza. U tom slučaju rezultati će im biti razumljiviji, a donošenje odluke o zadržavanju ili prekidu trudnoće donekle olakšano. Uloga je genetičkoga savjetnika pružanje svih važnih obavijesti i podrške roditeljima, no on nikada ne bi smio utjecati na konačnu odluku roditelja jer ona treba biti isključivo njihova (1).

### Invazivne tehnike prenatalne dijagnostike

Invazivne tehnike za postavljanje prenatalne dijagnoze kromosomskih i genetičkih bolesti dio su rutinske porodničke skrbi. Njihov je krajnji cilj u slučaju mogućnosti rađanja djeteta s poremećajem, roditeljima dati mogućnost izbora, potvrditi prisutnost ili odsutnost poremećaja, omogućiti smirenje, ohrabrenje i smanjenje anksioznosti ili pak omogućiti prekid trudnoće.

Današnje su općeprihvaćene indikacije za invazivni zahvat sljedeće (1):

- Trudnička dob iznad 35 godina
- opterećena osobna ili obiteljska anamneza (strukturni poremećaj kromosoma ili genetički poremećaj u jednoga ili oba roditelja, rađanje djece s trisomijama u obitelji, prethodne trudnoće s dokazanim kromosomskim ili genetičkim poremećajima, prethodne trudnoće s rađanjem malformiranoga ploda, habitualni pobačaj)
- abnormalan ultrazvučni nalaz
- povišen rizik nakon biokemijskoga probira
- indikacije zbog psiholoških razloga
- ostalo (teratogene virusne infekcije ili izlaganje mutagenim agensima tijekom trudnoće, konsagvinitet roditelja).

Amniocenteza je najstarija i najčešće primjenjivana metoda invazivne prenatalne dijagnostike i smatra se "zlatnim standardom". Kultiviranje stanica plodove vode u svrhu kariotipizacije prvi put objavljeno je 1966. godine u Lancetu u radu autora Steelea i Brega (2). Uvođenjem dugačke igle u amnijsku šupljinu maternice pod ultrazvučnom kontrolom dobiva se plodova voda. Nakon centrifugiranja plodove vode izdvoje se vijabilne amnijske stanice koje se mogu odmah rabiti za dijagnostiku ili se iz njih uspostavi stanična kultura. Nakon dva tjedna kultiviranja, stanice plodove vode koriste se za kariotipizaciju ili za određivanje metaboličkih i razvojnih poremećaja ploda biokemijskim metodama i metodama molekularne genetike. Općenito je prihvaćeno da se za svaki tjedan

trudnoće može uzeti po 1 ml plodove vode za analizu (obično se aspirira 15-20 ml plodove vode). Optimalno je vrijeme za izvođenje rane amniocenteze od 15. do 17. gestacijskoga tjedna s obzirom na odnos stanica ploda i tekućine. Učestalost spontanih pobačaja kao najteže komplikacije rane amniocenteze nije do danas precizno definirana te se smatra da je rizik od spontanoga pobačaja u jednoplodnim trudnoćama nakon amniocenteze 0.5-1% (0.3-1.5%), ovisno o izvoru (3).

Tehniku uzimanja i ispitivanja korionskih resica prvi put je izveo K. Valenti 1965. godine (4). Usavršena je 1983. godine kada je transvaginalni pristup zamijenjen transabdominalnim te je biopsija korionskih resica (CVS, eng. chorion villus sampling) postala daleko manje opasna nego u početku primjene (5). Izvodi se između 11. i 14. tjedna gestacije, a u literaturi je ponekad nalazimo i pod nazivom „rana placentocenteza“. Korionske resice potrebno je odmah nakon dobivanja očistiti od mogućih primjesa majčinoga tkiva. Od dobivenoga materijala ploda moguće je uspostaviti kratkotrajnu kulturu stanica citotrofoblasta (48h) ili dugotrajnu kulturu mezenhimalnih stanica (2 tjedna). Korionske resice pogodan su biološki materijal za primjenu širokoga spektra metoda molekularne biotehnologije, za mjerenje katalitičkih koncentracija enzima te za morfološku analizu. Prema literaturi, rizik je za plod i trudnoću prilikom izvođenja CVS-a 1-2% (prema nekim autorima i 2-4%), što je dvaput više nego kod amniocenteze. Osnovna je prednost uzimanja korionskih resica pred amniocentezom mogućnost dobivanja nalaza prenatalne dijagnoze već u prvom tromjesečju trudnoće, jer je za većinu biokemijskih i molekularnih analiza dovoljno 1-10 dana. Osim toga, amniocentezom se dobije mnogo manje tkiva za molekularna ispitivanja u odnosu na količinu korionskoga tkiva dobivenoga biopsijom. Ako je nakon dijagnoze potreban prekid trudnoće, vjerojatnije su manje komplikacije za trudnicu nego u drugom tromjesečju trudnoće (6,7,8).

Invazivne metode prenatalne dijagnostike koje se nešto rjeđe primjenjuju jesu placentocenteza (od 1971. godine) i kordocenteza (od 80-ih godina prošloga stoljeća). Placentocenteza (biopsija posteljice) invazivni je zahvat prenatalne dijagnostike kojim se pod ultrazvučnom kontrolom aspirira posteljično tkivo u 2. i 3. tromjesečju trudnoće (u literaturi se javlja kao termin i „kasna placentocenteza“) (9). Predlaže se kao metoda izbora u slučajevima visokorizičnih trudnoća u kojih postoji značajan manjak plodove vode te u slučaju kada je potrebna veća količina DNA u odnosu na onu koja se dobije amniocentezom (10,11).

Primjena CVS-a temelji se na pretpostavci da su kromosomski sadržaj ploda i korionskoga tkiva identični. Nedostatak placentocenteze dvopostotna je mogućnost da se kariotip posteljice (ekstraembrionalnih stanica) razlikuje od kariotipa ploda (stanica embrija). Pojavu ograničenoga placentarnog mozaicizma (CPM, engl. confined placental mosaicism) prvi put su opisali Kalousek i Dill 1983. godine (12). CPM je češći u kratkotrajnoj kulturi stanica citotrofoblasta nego u dugotrajnoj kulturi mezenhimalnih stanica. Ako mutacija nastane samo u trofoblastu ili u stanicama ekstraembrionalnoga mezoderma progenitora, nastaje promjena u posteljici, a nema je u plodu. Kromosopatija u posteljici zahtijeva obvezno daljnje istraživanje i dokaz nalazi li se promjena i u plodu, odnosno zahtijeva primjenu amniocenteze ili kordocenteze (9).

Kordocenteza (transabdominalno uzimanje krvi ploda iz pupkovine) primjenjuje se ako je rizik za neku bolest otkriven nakon 20. tjedna gestacije, ako je najbolji izvor informacija vezanih za pretpostavljenu bolest upravo fetalna krv te u svim slučajevima kada se citogenetička analiza plodove vode ili korionskih resica mora ponoviti (u slučaju mozaicizma, neuspjeloga kultiviranja ili za potvrdu nalaza). Fetalna se krv prvi put dobila zahvaljujući fetoskopiji 1978. godine (13), a za razvoj novije, sigurnije tehnike zaslužan je Daffos i sur. 1983. godine (14). U odnosu na plodovu vodu i korionske resice, fetalna krv omogućuje višestruka istraživanja u prenatalnoj dijagnostici. Osim toga, sama metoda može poslužiti i kao injekcija, što je otvorilo mogućnost fetalne terapije, a ne samo dijagnostike. Taj se zahvat najranije može izvesti između 18. i 20. tjedna, a nakon toga tijekom cijele trudnoće. Ovisno o gestacijskom tjednu i indikaciji, uzima se 2-3 ml fetalne heparinizirane krvi (15). Osim analize kromosoma (za koju su u ovom slučaju potrebna 3 dana), indikacije za ispitivanje krvi fetusa u prenatalnoj su dijagnostici i intrauterine infekcije, određivanje krvne grupe fetusa (kod Rh imunizacije), koagulopatije, hemoglobinopatije, imunodeficijencije, trombocitopenije te neimunološki fetalni hidrops. U slučaju sumnje na intrauterinu infekciju provode se serološke analize na prisutnost toksoplazmoze, rubele, varicella, parvovirusa, citomegalovirusa, i to nakon 22. gestacijskoga tjedna (15). Suvremena tehnologija i iskustvo ginekologa, uz suradnju laboratorija, smanjili su rizike tog zahvata na manje od 1% (16). Nešto je češća komplikacija (6.6%) vezana uz primjenu toga zahvata pojava bradikardije u ploda (17), no ona je u pravilu reverzibilna.

Zahvat koji se u današnje vrijeme iznimno rijetko primjenjuje jest biopsija plodova tkiva, najčešće kože, a tek u 22.-24. tjednu gestacije (1).

Moguće komplikacije invazivnih zahvata jesu spontani pobačaji, prijevremeni porod, krvarenja majke i ploda, kontrakcije maternice, abrupcija posteljice, otjecanje plodove vode, infekcije, ozljeda ploda i Rh imunizacija. Zbog mogućnosti Rh imunizacije, klinička je praksa kod nas i u svijetu primjena imunoprofilakse kod svake Rh negativne trudnice prije invazivnoga zahvata, ali i kod spontanoga ili induciranoga pobačaja, izvanmaternične trudnoće, nakon porođaja Rh pozitivnoga djeteta te u slučaju fetomaternalne transfuzije (hemoragije) tijekom trudnoće (18).

Najnovija metoda prenatalne dijagnostike koja omogućuje postavljanje vrlo rane prenatalne dijagnoze u roditelja kod kojih postoji rizik za nasljednu gensku bolest jest predimplantacijska genetička dijagnostika (PGD, engl. preimplantation genetic diagnosis). Provodi se prije implantacije embrija u maternicu, najčešće na razini zigote, a nakon oplodnje in vitro (IVF, engl. in vitro fertilization), kako bi se odredio genetički status embrija roditelja s poznatim genetičkim bolestima. Analiza se provodi na jednoj ili dvjema stanicama, blastomerama, dobivenima biopsijom iz osmostaničnoga embrija (19). Analitičke su tehnike koje se primjenjuju za analizu pojedinačnih stanica fluorescentna in situ hibridizacija (FISH, engl. fluorescence in situ hybridization) za određivanje spola i aneuploidnosti i lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. polymerase chain reaction) za sva ostala ispitivanja (19). Samo se zdravi embriji implantiraju u maternicu. Također je moguće analizirati i oocite, odnosno primarna i sekundarna polarna tijela, stanice nastale tijekom mejotičkoga sazrijevanja jajne stanice (19). Analiza polarnih tijela koja se danas sve više upotrebljava umjesto analize ili usporedno s analizom blastomera, isključuje manipulaciju embrijem, što je etički prihvatljivije. Danas je PGD alternativa prenatalnoj dijagnostici i terapijskom pobačaju kod pacijenata s bolestima vezanim uz kromosom X, monogenim bolestima (naročito autosomno recesivnim) te aneuploidijama (19). U kliničkoj praksi primjenjuje se od 1989. godine. Rezultate PGD-a preporučuje se provjeriti nekom od metoda prenatalne dijagnostike (19). PGD trenutačno ne radi ni jedan centar u Republici Hrvatskoj.

Najčešće su primijenjivane tehnike invazivne prenatalne dijagnostike, i u svijetu a i u našoj zemlji, biopsija korionskih resica u prvom tromjesečju trudnoće i amniocenteza u drugom tromjesečju.

## Uloga ultrazvuka u prenatalnoj dijagnostici

Sve do uvođenja ultrazvuka (UZV) u dijagnostičku praksu 1961. godine (20), bolesti ploda, uključujući i nasljedne, dijagnosticirale su se tek nakon rođenja. Primjenom ultrazvuka porodništvo dobiva mogućnost proučavanja rasta i razvoja ploda te otkrivanja plodovnih anomalija. Izravna pomoć UZV-a omogućuje da se već tijekom rane gestacije ispituje morfologija ploda, dok se posredno mogu uz pomoć UZV-a, bez veće opasnosti po plod i majku, uzimati za ispitivanje različite plodove stanice, tkiva i tekućine (21) primjenom tehnika opisanih u prethodnom poglavlju.

Ultrazvučna dijagnostika posljednjih je dvadesetak godina doživjela široku primjenu kao neinvazivna, osjetljiva metoda probira u neselecioniranoj populaciji trudnica. Otkrivanje fetalnih malformacija u ranom razdoblju znakovito smanjuje rađanje djece sa strukturalnim defektima, a time i stopu perinatalnoga morbiditeta i mortaliteta. Prepoznavanje specifičnih strukturalnih anomalija ranoga intrauterinog zastoja rasta ploda te promjena količine plodove vode omogućuje bolji antenatalni probir i dijagnostiku kromosomskih poremećaja.

Dijagnostička vrijednost ultrasonografije u otkrivanju fetalnih kongenitalnih malformacija ovisi o vrsti malformacije, gestacijskoj dobi, iskustvu pretraživača i o tome radi li se o visoko rizičnoj trudnici za određenu nasljednu bolest kod koje se provodi ciljano pretraživanje u svrhu otkrivanja specifičnih fetalnih malformacija. Određeni poremećaji ranoga razvoja embrija mogu se uočiti već u prvom tromjesečju trudnoće pomoću transvaginalne ultrasonografije. Detaljno poznavanje anatomije i fiziologije ljudskoga ploda te njegova razvitka nužno je za razlikovanje normalnih fizioloških od patoloških promjena. Ciljani ultrazvučni pregled u drugom tromjesečju trudnoće vrlo je koristan kod otkrivanja većih a, i onih vrlo malih kongenitalnih malformacija ploda. Prenatalna dijagnostika nekromosomskih sindroma oslanja se na uočavanje specifičnih morfoloških promjena ploda. Precizna morfološka ultrazvučna istraživanja u najvećem su broju slučajeva moguća između 15. i 20. tjedna trudnoće. Prije toga gestacijskoga razdoblja prenatalna dijagnoza treba se temeljiti na rezultatima testova zasnovanih na tehnikama molekularne biologije u obiteljima gdje je specifična mutacija koja uzrokuje određenu bolest poznata. Određivanje specifičnih ultrazvučnih biljega određenih nasljednih bolesti omogućuje probir plodova s povećanim rizikom za određenu genetsku bolest ili mikrodelecijski sindrom, posebice kod plodova sa novonastalom mutacijom jer je ona najčešći uzrok

takvih poremećaja. Fetalna ehokardiografija ima veliku važnost kao komplementarna tehnika probira, jer veliki dio malformiranih plodova ima udruženu srčanu grešku (22).

## Neinvazivne tehnike prenatalne dijagnostike

Početak devedesetih godina prošloga stoljeća dolazi 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 UZV-a, a uzimaju u obzir i trudničinu dob te stadij trudnoće (tablice 1. i 2.). Određivanje biokemijskih biljega u majčinu krvotoku, zbog nepotpune osjetljivosti i specifičnosti, metoda je probira koja uključuje ili isključuje nužnost invazivnoga zahvata i citogenetičke analize kao najtočnije potvrde dijagnoze (23).

Biološke i analitičke varijacije razine biljega aneuploidije ploda u majčinu krvotoku uzrok su ograničene osjetljivosti i specifičnosti biokemijskoga probira, tj. pojave lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata. U biološke čimbenike ubrajamo majčinu starost, tjelesnu težinu, rasnu i etničku pripadnost, višestruku trudnoću, pušenje i kronične bolesti metabolizma poput diabetesa mellitusa. Uzrok analitičkim varijacijama mogu biti postupci uzorkovanja, pohrane i transporta uzorka te svojstva imunokemijskih metoda (23).

Najčešći uzrok pogreške u izračunu rizika jest netočno procijenjena gestacijska dob u trenutku uzorkovanja. Točnost određivanja gestacijske dobi u trenutku uzimanja uzorka krvi ključan je dio biokemijskoga probira jer se dinamika izlučivanja biljega tijekom trudnoće intenzivno mijenja iz tjedna u tjedan, a rizik se dobiva usporedbom individualnih vrijednosti biljega i medijana razina u euploidnim trudnoćama specifičnih za gestacijsku dob (23).

Uspješnost neinvazivnoga pristupa u otkrivanju sindroma Down ovisi o ravnoteži osjetljivosti i specifičnosti probira. Ona uvelike ovisi o odabiru granične vrijednosti u prosudbi rezultata. Granična je vrijednost najčešće rizik sindroma Down prema dobnom kriteriju primjene amniocenteze, odnosno kariotipizacije, kao metode točnošću od 99,9%. Dobna granica opravdanosti uzorkovanja plodove vode određena je ravnotežom rizika trisomije 21 u trudnoći i rizika pobačaja koji nosi invazivan zahvat. Najčešće je granična vrijednost jedna od vrijednosti u rasponu od 1:200 do 1:300, što je rizik trisomije 21 prema 35 i 37 godina starosti. Drugi kriterij



odabira granične vrijednosti željena je stopa lažno pozitivnih rezultata (23).

Pri određivanju rizika za fetalne malformacije, individualna koncentracija biljega u serumu majke i debljina nuhalnoga nabora (NN) dijeli se medijanom koncentracija u neugroženim trudnoćama specifičnima za gestacijsku dob i izražava kao vrijednost MoM (engl. multiple of median). Uporabom specifično prilagođenih računalnih programa računa se rizik fetalne aneuploidije, odnosno oštećenja neuralne cijevi iz algoritamskih odnosa koncentracija serumskih biljega, gestacijske dobi, majčine dobi i ostalih anamnestičkih majčinih podataka (23).

U suvremenoj neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici koriste se sljedeći biokemijski i ultrazvučni biljezi:

- I. Nuhalni nabor (NN, engl. nuchal fold), nuhalno zadebljanje (engl. nuchal thickness), ili nuhalno prosvjetljenje (engl. nuchal translucency) sinonimi su kojima se opisuje abnormalno nakupljanje tekućine u potkožnom tkivu nuhalne regije, što se ultrazvukom prepoznaje kao različito veliko hipoehogeno područje, smješteno straga u medijalnoj liniji vrata, između kože i kralježnice. Patofiziološki se najčešće radi o poremećaju drenaže limfne tekućine, ali uzrok može biti i kongestija zbog kongenitalne srčane greške, neki hematološki poremećaji i sl. Povećanje NN-a u odnosu na dužinu ploda (tjeme - trtica; CRL, engl. crown rump length) tijekom prvoga tromjesečja nalazi se u oko 70% plodova sa sindromom Down, 50-60% plodova sa sindromom Edwards te u oko 35% plodova sa sindromom Patau. Zadebljani NN povezuje se i s povećanim rizikom za Turnerov sindrom, u slučajevima udruženim s fetalnim hidropsom. Mjerenje nuhalnoga nabora, uz pridržavanje standardiziranih kriterija mjerenja, smatra se najdjelotvornijim biljegom fetalnih aneuploidija u razdoblju od 11. do 14. gestacijskoga tjedna (prvo tromjesečje). Naime, mjerenjem samo toga biljega, u kombinaciji s trudničkom dobi postiže se stopa detekcije fetalnih aneuploidija od 70-75% uz stopu lažno pozitivnih nalaza od 5% (25). Graničnom vrijednošću smatra se 3.0 do 3.5 mm (23).
- II. Alfa-fetoprotein (AFP), po kemijskoj strukturi glikoprotein, glavni je protein plazme u ranom životu ploda. Sintetizira se u malim količinama u žumanjčanoj vreći, a nakon njene degeneracije, u fetalnoj jetri u većim količinama. Visoka koncentracija AFP u plodovoj vodi i majčinu serumu uspješno dijagnosticira 80-90% slučajeva nepotpunoga zatvaranja opni središnjega živčanog

sustava fetusa u drugom tromjesečju trudnoće još od sedamdesetih godina prošloga stoljeća. Iako su kasnije otkriveni biljezi koji pojedinačno ili u kombinacijama učinkovitije otkrivaju aneuploidije fetusa, AFP je i danas dio svakoga biokemijskog probira u drugom tromjesečju trudnoće jer jedini otkriva i otvorena oštećenja neuralne cijevi (AFP MoM>2.5 znači pozitivan probir za oštećenja neuralne cijevi) (23).

- III. Estriol je količinski dominantan estrogen u trudnoći i biljeg je funkcije fetalne nadbubrežne žlijezde i placente. Tijekom drugoga tromjesečja kod plodova sa sindromima Down i Edwards, razina estriola u krvotoku majke niža je u odnosu na medijan razina u euploidnim trudnoćama (MoM=0.74). Nekonjugirani estriol (nE3) koristi se u biokemijskom probiru fetalnih aneuploidija od 1998. godine, najčešće u kombinaciji s AFP i hCG (23).
- IV. Humani korionski gonadotropin (HCG) glikoprotein je građen od dvije nekovalentno vezane podjedinice,  $\alpha$  i  $\beta$ , koje se sintetiziraju neovisno u stanicama sinciotrofoblasta već za vrijeme implantacije. Dinamika razine slobodnoga  $\beta$ HCG u majčinu krvotoku prati dinamiku intaktnoga HCG: nagli porast do 10. gestacijskoga tjedna, a zatim postupno opadanje do 18. gestacijskoga tjedna, kada dostiže koncentraciju od 10% vršne vrijednosti koja se zadržava do porođaja. Od ukupne količine  $\beta$  podjedinice HCG u majčinu krvotoku, 1% je u slobodnom obliku, dok je ostatak vezan u dimerni HCG. Početkom devedesetih godina prošloga stoljeća uočena je djelotvornost slobodne  $\beta$  podjedinice HCG u razlikovanju euploidnih i aneuploidnih trudnoća (MoM=2.1 do 2.5). Za razliku od ukupnoga  $\beta$ HCG i intaktnoga HCG, slobodna  $\beta$  podjedinica potencijalan je biljeg fetalnih aneuploidija i u prvom tromjesečju trudnoće, od 10. do 14. gestacijskoga tjedna (23).
- V. Inhibin A dimerni je glikoprotein koji nastaje disulfidnim vezanjem  $\alpha$  i  $\beta_A$  polipeptidnih lanaca. U trudnoći ga u početku stvara žuto tijelo, a od 10. tjedna predominantno posteljica. Točna uloga inhibina A u trudnoći nije poznata. Razina inhibina A u majčinu krvotoku kod trudnoće sa sindromom Down povišena je u prvom i u drugom tromjesečju (24). Zbog nestabilnosti reagensa te visoke stope lažno pozitivnih rezultata analiza Inhibina A dugo nije zaživjela u kliničkoj praksi (23,24).
- VI. Plazmatski protein trudnoće A (PAPP-A, engl. pregnancy associated plasma protein A) veliki je glikoprotein veličine 200 kDa koji pripada metzincin superfamiliji metaloproteinaza. Sinteza PAPP-A odvija se u sinciotrofoblastima, a u serumu trudnice mjerljiv je od 8. gestacijskoga tjedna.

TABLICA 1.

Neinvazivni testovi (metode probira) u prenatalnoj dijagnostici (\*uz stopu lažno pozitivnih rezultata od 5%)

TABLE 1

Noninvasive tests (screening methods) in prenatal diagnosis (\*a false positive rate of 5%)

Naziv testa Test	Tromjesečje Trimester	Biljezi Markers	Stopa detekcije sindroma Down* (%) Down syndrome detection rate * (%)
dvostruki double	II. II	AFP + slobodna $\beta$ HCG AFP + free $\beta$ HCG	63
trostruki triple	II. II	AFP + slobodna $\beta$ HCG + nE3 AFP + free $\beta$ HCG+uE3	69
četverostruki quadruple	II. II	AFP + slobodna $\beta$ HCG + nE3 + inhibin A AFP + free $\beta$ HCG+uE3 + inhibin A	72
kombinirani combined	I. I	NN + slobodna $\beta$ HCG + PAPP-A NF + free $\beta$ HCG+PAPP-A	89

PAPP-A se u trudnoćinu serumu nalazi u obliku heterotetramernoga kompleksa s proformom eozinofilnoga glavnoga bazičnog proteina (proMBP) koju također sintetizira placenta. Koncentracija PAPP-A raste tijekom trudnoće, no njegove karakteristične promjene, povezane s fetalnom kromosopatijom, vidljive su do 13. gestacijskoga tjedna. Razina proteina PAPP-A značajno je snižena u trudnoćama sa sindromima Down i Edwards, a optimalno je razdoblje za analizu toga serumskoga biljega od 9. do kraja 12. gestacijskoga tjedna. Progresijom trudnoće, razlika koncentracije PAPP-A-e između normalne i trudnoće s plodom sa sindromom Down smanjuje se. Mjerenje PAPP-A-e, uz mjerenje slobodne  $\beta$ HCG i debljine NN, koristi se u ranom kombiniranom ultrazvučno-biokemijskom probiru kromosopatija (25,-26,27).

Neinvazivni su se testovi, do prije nekoliko godina izvodili isključivo u drugom tromjesečju trudnoće i, ovisno o vrsti testa, uključivali su mjerenje dvaju ili više serumskih biljega iz krvi trudnica. Razvojem ranoga kombiniranoga ultrazvučno-biokemijskoga probira, koji uključuje mjerenje debljine nuhalnoga nabora te dvaju biokemijskih biljega, moguće je testiranje provesti već u prvom tromjesečju trudnoće. Prednost je probira u prvom tromjesečju ranije postavljanje dijagnoze te, u slučaju potrebe za prekidom trudnoće, manje rizičan

pobačaj (25). Kombinacijom mjerenja debljine NN i dvaju biokemijskih biljega u majčinu serumu (PAPP-A i slobodna  $\beta$ HCG) postignut je do danas najdjelotvorniji neinvazivni test probira: kombinirani probir u prvom tromjesečju. Retrospektivna studija izvedena na 210 slučajeva trisomije 21 i 1000 kontrolnih uzoraka pokazala je stopu detekcije sindroma Down od 89% uz stopu lažno pozitivnih rezultata od 5%. Pokazano je i da se takvim mjerenjem može detektirati 90% drugih kromosomskih anomalija uz stopu lažno pozitivnih rezultata od 1% (27,28). U našoj zemlji rutinski se provode kombinirani probir u prvom tromjesečju te dvostruki i trostruki test u drugom tromjesečju trudnoće. Stopa detekcije sindroma Down primjenom neinvazivnih testova probira prikazana je u tablici 1.

#### Fetalne stanice i slobodna fetalna DNA u prenatalnoj dijagnostici

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

Otkriće prisutnosti fetalnih stanica u majčinu krvotoku probudilo je nadu u napredak na tom području jer su fetalne stanice dobar izvor genetičkoga materijala fetusa kod kojega nema interferencija od strane majčine DNA.

„Praotkriće“ toga fenomena potječe još iz 1893. godine kada je njemački patolog Georg Schmorl, prilikom obdukcije trudnice umrle od preeklampsije, pronašao trofoblaste u njenim plućima. Godine 1979. Herzenberg je pronašao stanice s kromosomom Y u perifernoj krvi trudnica koje su nosile muški plod, a 1990. godine Diana Bianchi je dokazala „muške“ stanice kod žena koje su rodile sinove prije više desetljeća (29,30,31).

Fetalne stanice normalno fiziološki migriraju u različita majčina tkiva, pa tako i u krv, ali su prisutne u iznimno malim količinama: oko 2-12 fetalnih stanica nalazimo u 1 ml majčine krvi. Osim što ih je teško izdvojiti iz majčine cirkulacije, nedostatak im je i to što mogu zaostati u majčinu organizmu godinama nakon poroda te tako interferirati u dijagnostičkim postupcima u kasnijim trudnoćama. Primjena analize fetalnih stanica do danas nije zaživjela u dijagnostičkoj praksi usprkos višegodišnjem naporom radu mnogih istraživačkih skupina i brojnim obećavajućim preliminarnim rezultatima. Jedan od takvih radova, koji je bio i značajno medijski popraćen, jest onaj skupine iz Hong Konga iz 2000. godine objavljen u Lancetu (32). Autori toga rada dijagnosticirali su plod s Downovim sindromom primjenom FISH proba za kromosome 21, 18, 13 i Y na majčinoj krvi. Ukupan broj ispitanica bio je 13 (10 s euploidnom trudnoćom i 3 s trisomičnom), i sve su trudnoće točno dijagnosticirane. Ubrzo nakon toga provedena je velika kolaborativna studija (33) čiji su rezultati, objavljeni 2002. godine, pokazali značajno nižu specifičnost metode (70%) u odnosu na preliminarne rezultate, te je i ta metoda napuštena.

Postojanje slobodne DNA (engl. cell free DNA / circulating free DNA / free DNA) u čovjekovoj cirkulaciji poznato je još od pedesetih godina prošloga stoljeća kada su Mandel i Matais uspjeli dokazati prisutnost nukleinskih kiselina u čovjekovoj plazmi (34). To veliko otkriće tada nije izazvalo posebnu pozornost. Nešto veće zanimanje znanstvene javnosti izazvao je rad iz 1977. godine koji upozorava na potencijalnu primjenu slobodno cirkulirajuće DNA u tumorskoj dijagnostici te u praćenju uspješnosti antitumorske terapije (35). Najveći interes za istraživanje slobodno cirkulirajuće DNA izazvali su Dennis Lo i sur. 1997. svojim otkrićem prisutnosti slobodno cirkulirajuće fetalne DNA u majčinoj krvi otvorivši time mogućnost primjene analize slobodno cirkulirajuće DNA u neinvazivnoj prenatalnoj dijagnostici (36). Time je otkriven novi, alternativni izvor fetalnoga genetičkog materijala za prenatalnu dijagnostiku. U tom pionirskom radu, primjenom metode ugniježdeni PCR (engl. nested PCR) te analizom PCR produkata gel-elektroforezom, detektirana je slobodno cirkulirajuća fetalna DNA (cffDNA, engl. cell free fetal

DNA) u majčinoj plazmi i serumu, ili točnije, utvrđen je muški spol ploda amplifikacijom DYS14 biljega gena TSPY koji se nalazi na kromosomu Y (36).

Nakon toga otkrića, daljnja istraživanja usmjerena su prema povećanju osjetljivosti detekcije cffDNA te prema otkrivanju značajki cffDNA. Ugniježdeni PCR zamijenjen je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. real time PCR), što je značajno povećalo osjetljivost, brzinu i robusnost detekcije cffDNA te ujedno smanjilo mogućnost kontaminacije. Otkriveno je da cffDNA koncentracija raste tijekom gestacije te da njen udio u ukupnoj slobodno cirkulirajućoj DNA u ranoj trudnoći iznosi oko 3.4% (0.39-11.9%), a u kasnoj oko 6.2% (2.33-11.4%) (37). Utvrđeno je da je eliminacija cffDNA iz majčine cirkulacije nakon poroda izrazito brza ( $t_{1/2}$ =16.3 minute) te da već dva sata nakon poroda cffDNA više nije detektibilna (38), što povećava specifičnost analize cffDNA i značajno je razlikuje od fetalnih stanica u majčinom krvotoku koje mogu zaostati u majčinoj krvi i nekoliko godina nakon poroda (39). Slobodno cirkulirajuća fetalna DNA porijeklom je iz stanica placente, sinciotrofoblasta, (40) te je pokazano da je u odnosu na majčinu slobodno cirkulirajuću DNA kraća, degradiranija i hipometiliranija. U nekim je slučajevima detektibilna već od 4. gestacijskoga tjedna, točnije, 14 dana nakon IVF zahvata (41). Prisutnost cffDNA dokazana je i u drugim majčinim tjelesnim tekućinama kao što su plodova voda, urin, likvor i peritonejska tekućina (42).

Prva primjena slobodno cirkulirajuće fetalne DNA bila je u svrhu neinvazivnoga određivanja spola ploda te je do danas objavljen velik broj istraživanja na tu temu. U većini istraživanja koja su se koristila PCR-om u stvarnom vremenu, postignuta je osjetljivost od 87 do 100% i specifičnost od 98 do 100% (43). Uobičajeno korišteni biljezi za utvrđivanje plodova spola jesu SRY, amelogenin (AMELY) i DYS14; analiza je pouzdana od 5. gestacijskoga tjedna, a primjenjuje se kod sumnje na X vezanu bolest da bi se u slučaju ženskoga ploda izbjegla primjena invazivnoga zahvata, za potvrdu genetičkoga spola u slučaju ultrazvučno otkrivenoga nedovoljno oblikovanoga ili dvosmislenoga spolovila te pri sumnji na kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju da bi se u slučaju muškoga ploda izbjegla primjena deksametazona (43-45). Danas je poznato više od 300 nasljednih poremećaja vezanih uz X kromosom od kojih su samo neki karakterizirani na molekularnoj razini. Ako je majka prenositelj spolno vezanoga recesivnog gena, ženski potomci neće biti bolesni, dok je vjerojatnost za muške potomke da će biti bolesni 50%. U takvim slučajevima, u svrhu prenatalne dijagnoze, dovoljno je odrediti samo plodov spol. Ta analiza rutinski se primjenjuje u

nekoliko europskih država te je npr. u Velikoj Britaniji (na uzorku od 160 žena) zabilježeno smanjenje broja invazivnih testova za 45% kao posljedica primjene rane neinvazivne dijagnostike fetalnoga spola (46).

Osim u svrhu određivanja plodova spola, slobodno cirkulirajuća fetalna DNA najčešće se upotrebljava za utvrđivanje fetalnoga RhD statusa kod RhD negativne trudnice koja ima povećan rizik za razvoj hemolitičke bolesti novorođenčeta zbog prijašnje trudnoće ili povišenoga titra protutijela. Određivanjem plodova RhD statusa može se utvrditi ima li fetus rizik za razvoj hemolitičke bolesti te treba li majka antenatalnu antiD-imunoglobulinsku profilaksu. Donedavno, fetalni RhD genotip bilo je moguće odrediti samo na invazivno dobivenom uzorku. U trudnoćama s rizikom za razvoj hemolitičke bolesti, svaki invazivni postupak dovodi do povišenja majčinoga antiRhD titra te posljedično i do razvoja bolesti. Stoga je naročito korisno u takvim slučajevima imati mogućnost neinvazivnoga pristupa. Klinička praksa u našoj zemlji u svrhu izbjegavanja Rh imunizacije jest antenatalna primjena imunoprofilakse kod RhD negativne trudnoće prilikom invazivnoga zahvata, pobačaja, izvanmaternične trudnoće te fetomaternalne transfuzije (krvarenja) tijekom trudnoće. Postnatalno se imunoprofilaksa primjenjuje kod svih RhD negativnih trudnica u roku od 72 sata nakon porođaja RhD pozitivnoga djeteta. U nekim europskim zemljama, antenatalna profilaksa primjenjuje se na čitavoj populaciji RhD negativnih žena u 28. i/ili 34. gestacijskom tjednu jer se smatra da pomaže u prevenciji aloimunizacije uzrokovane fetomaternalnim krvarenjem tijekom trećega tromjesečja trudnoće. U slučaju bijele rase, kod koje je udio Rh negativnih osoba oko 15%, takva neselektivna primjena antenatalne profilakse dovodi do toga da oko 40% RhD negativnih trudnica primi terapiju koja im uopće nije potrebna. S obzirom da je antiD-gamaglobulin humani, a ne rekombinantni krvni pripravak, jasno je da njegova primjena sa sobom nosi i određeni rizik za prijenos neprepoznatih virusa i priona. Ta je analiza zasad jedina primjena analize cffDNA u rutinskoj praksi te je npr. u Velikoj Britaniji gotovo u potpunosti zamijenila invazivno testiranje (47-49).

Mjerenje koncentracije slobodno cirkulirajuće fetalne DNA u majčinoj plazmi treća je najčešća primjena slobodno cirkulirajuće fetalne plazmatske DNA. Naime, utvrđeno je da je njezina koncentracija kod različitih oblika patoloških trudnoća povišena te se istražuje kao potencijalni biljeg patologije trudnoće poput preuranjenoga poroda, fetalne aneuploidije, idiopatskoga polihidramnija, zastoja u rastu ploda, preeklampsije, fetomaternalnoga krvarenja (50-56).

S obzirom da je trenutačno tehnički nemoguće odvojiti majčinu od fetalne slobodno cirkulirajuće DNA i da je majčina slobodno cirkulirajuća DNA prisutna u značajnom suvišku te interferira s analizom cffDNA, mogućnosti neinvazivne prenatalne analize cffDNA na različite monogenske bolesti ograničene su na mutacije koje su paternalno naslijeđene ili su nastale de novo. U literaturi je zabilježena prenatalna neinvazivna dijagnostika  $\beta$ -talasemije major (57), miotonične distrofije (58), ahondroplazije (59), Huntingtonove bolesti (60) i cistične fibroze (61).

Otkriće prisutnosti tumorske i donorske transrenalne DNA usmjerilo je istraživanja fetalne DNA u smjeru detekcije fetalne DNA u majčinu urinu, no rezultati analiza dugo su bili proturječni (62,63). Tek nedavnim istraživanjem, u kojem je značajno smanjena veličina amplificiranih regija (63), povećana je osjetljivost detekcije fetalne DNA u majčinu urinu.

Glavni analitički problem i ograničavajući čimbenik za širu primjenu analize cffDNA iz trudničke plazme nemogućnost je odvajanja majčine od fetalne slobodno cirkulirajuće DNA. Istraživanja cffDNA čiji je cilj nadvladati to ograničenje temelje se na tri osnovna eksperimentalna pristupa:

1. obogaćivanje fetalne frakcije slobodno cirkulirajuće DNA u plazmi tretmanom formaldehidom ili frakcioniranjem slobodne plazmatske DNA na temelju razlika u veličini fragmenata između majčine i fetalne DNA (64,65);
2. traženje fetalno specifičnih epigenetičkih biljega ili biljega glasničke RNA specifičnih za placentu (66,67);
3. razvoj visoko diskriminirajuće kvantitativne metode za analizu broja kromosoma primjenom precizne metode digitalni PCR (68) ili genetičkoga sekvenciranja druge generacije (69,70).

## ZAKLJUČAK

Amniocenteza i biopsija korionskih resica već su dugi niz godina najčešće korištene metode prenatalne dijagnostike. Radi se o invazivnim zahvatima čija primjena nosi određeni rizik za majku i plod. Radi izbjegavanja toga rizika, u posljednjih dvadeset godina razvijane su metode za obogaćivanje udjela fetalnih stanica prisutnih u majčinoj cirkulaciji, a sve u svrhu neinvazivnoga uzorkovanja fetalnoga materijala pogodnoga za biokemijske, genetičke i kromosomske analize. Usprkos svim uložnim naporima, analiza fetalnih stanica nikada nije zaživjela u kliničkoj praksi.



Otkrićem prisutnosti slobodno cirkulirajuće fetalne DNA u majčinoj cirkulaciji otvorile su se nove mogućnosti za razvoj sigurnijih metoda prenatalne dijagnostike. Osnovni problem kod analize slobodno cirkulirajuće fetalne DNA iz majčine krvi, nemogućnost je razdvajanja majčine od fetalne DNA. Majčina DNA prisutna je u značajnom suvišku i interferira pri analizama fetalne DNA. Stoga su trenutačne mogućnosti analize fetalne DNA ograničene na analizu onih dijelova fetalnoga genoma po kojima se fetus razlikuje od majke. Takve analize su analiza spola i RhD statusa ploda kod RhD negativne majke, koje su u nekim europskim zemljama već zaživjele u rutinskoj praksi. Primjenom tih tehnika moguće je ne samo izbjeći invazivni zahvat ili nepotrebnu terapiju već ostvariti i uštede zdravstvenom sustavu.

Posljednjih deset godina objavljeni su pozitivni rezultati mnogih istraživanja čiji je jedini cilj bilo postizanje „svetog grala“ prenatalne dijagnostike: neinvazivnosti. Radilo se o istraživanjima provedenim na malom broju uzoraka te korištenjem sofisticiranih tehnologija u istraživačkim laboratorijima. Na žalost, rezultati tih istraživanja još uvijek nisu primjenjivi u rutinskim dijagnostičkim laboratorijima. U skladu je s tim spoznajama i preporuka stručnih društava i uglednih stručnjaka da se u svrhu neinvazivne prenatalne dijagnostike u prvom tromjesečju primjenjuje kombinirani ultrazvučno-biokemijski probir, a u drugom tromjesečju trostruki test. Ti testovi smatraju se referentnim testovima za pojedino tromjesečje i u odnosu na njih vrednuju se svi novi testovi. Iako se već dugo primjenjuju (trostruki test rutinski već 10 godina), svrha, mogućnosti i ograničenja tih testova često su nepoznanica pacijenticama, a ponekad i samim kliničarima, što upućuje na potrebu za stalnom izobrazbom svega osoblja uključenoga u porodničku skrb. Obzirom na visoku stopu detekcije Downova sindroma primjenom kombiniranoga ultrazvučno-biokemijskoga probira (90%), na mogućnost postavljanja dijagnoze već u prvom tromjesečju te na interaktivnost samoga testa, realno je očekivati da će taj test i u našoj trudničkoj populaciji uskoro postati široko prihvaćen, kao što je to posvuda u svijetu.

## LITERATURA

1. Zergollern Lj. Razvoj prenatalne dijagnostike u Hrvatskoj. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 3-15.
2. Steele MW, Breg WR. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet*. 1966;1:383-5.
3. Mišković B, Kos M. Amniocenteza. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K. Prenatalna dijagnostika i terapija, urednici. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 121-30.
4. Valenti K. Chromosomal study of trophoblastic tissue. *Am J Obstet Gynecol*. 1965;92:211-20.
5. Brambati B, Simoni G. Fetal diagnosis of trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. *Lancet*. 1983;1:586.
6. Stipoljev F, Citogenetika. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 187-204.
7. Fumić K. Prenatalna dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 205-28.
8. Hećimović S, Tanacković G, Pavelić K. Primjena metoda molekularne genetike u prenatalnom otkrivanju nasljednih oboljenja. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 247-78.
9. Singer Z. Biopsija posteljice u suvremenoj perinatologiji. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 151-72.
10. Podobnik M, Ciglar S, Singer Z, Podobnik-Sarkanji S, Duić Z, Skalak D. Transabdominal chorionic villus sampling in the second and third trimesters of high-risk pregnancies. *Prenat Diagn*. 1997;17:125-33.
11. Brambati B, Tului L. Chorionic villus sampling and amniocentesis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1995;17:197-201.
12. Kalousek DK, Dill FJ. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science*. 1983;221:665-7.
13. Rodeck CH, Campbell S. Sampling of pure fetal blood by fetoscopy in second trimester of pregnancy. *Br Med J*. 1978;2:728-31.
14. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. A new procedure for fetal blood sampling in utero: Preliminary results of fifty three cases. *Am J Obst Gynecol*. 1983;146:985-7.
15. Mišković B, Kos M, Kordoocenteza. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 131-42.
16. Piolet BW, Socol ML, MacGregor S, Ney JA, Dooley SL. Cordocentesis: an appraisal of risks. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;159:1497-500.
17. Weiner CP, Wenstrom KD, Sipes SL, Williamson RA. Risk factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:1020-5.
18. Latin V. Rhesus imunizacija (hemolitička bolest fetusa i novorođenčeta). U: Kurjak A, i sur. Ginekologija i perinatologija. Zagreb; Naprijed: 1989. str. 813-30.
19. Husnjak K. Preimplantacijska genetska dijagnostika. U: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 279-94.

20. Donald I, Brown TG. Demonstration of tissue interfaces within the body by ultrasonic echo sounding. *Brit J Radiol.* 1961;34:539.
21. Kos M, Kurjak A. Ultrazvučni biljezi kromosopatija. U: Kurjak A, Stavljanić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 61-78.
22. Stipoljev F. Prenatalni probir plodova rizičnih za pojavu kromosomskih i genskih poremećaja. *Pediatr Croat.* 2004;48:192-6.
23. Huderer-Đurić K, Suchanek E. Biokemijski probir sindroma Down u trudnoći. U: Kurjak A, Stavljanić-Rukavina A, Pavelić K, urednici. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Nakladnička kuća Tonimir; 2000. str. 173-86.
24. Harrison G, Goldie D. Second-trimester Down's syndrome serum screening: double, triple or quadruple marker testing? *Ann ClinBiochem.* 2006;43:67-72.
25. Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2007;145C:18-32.
26. Fialova L, Malbohan IM. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): theoretical and clinical aspects. *Bratisl Lek Listy.* 2002;103:194-205.
27. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;13: 231-7.
28. Cuckle H. Time for total shift to first trimester Down's screening. *Lancet.* 2001;358:1658-9.
29. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol.* 1999;105:574-83.
30. 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.
31. 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.
32. Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet.* 2000;356:1819-20.
33. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, i sur. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn.* 2002;22:609-15.
34. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Acad Sci Paris.* 1948;142:241-3.
35. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37:646-50.
36. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, i sur. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
37. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM i sur. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:768-75.
38. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;64:218-24.
39. Bianchi DW, Lo YMD. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:119-31.
40. Albetty M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent ND, i sur. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27:415-8.
41. 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.
42. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential—a review. *Placenta.* 2004;25SupplA:S93-S101.
43. Avent ND, Chitty LN. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn.* 2006;26:598-603.
44. Honda H, Miharuru N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet.* 2002;110:75-9.
45. Rijnders PR, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:374-8.
46. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:69-75.
47. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, i sur. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998;339:1734-8.
48. 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.
49. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008;336:816-8.
50. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YMD. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998;352:1904-5.
51. Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn.* 2000;20:795-8.
52. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn.* 2000;20:838-41.
53. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, Farina A. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:480-4.
54. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2002;21:77-83.
55. Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY, Lo YMD. Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:712-6.
56. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, i sur. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem.* 2002;48:353-4.
57. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DHK, Lo YMD. Prenatal exclusion of thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002;360:998-1000.

58. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:301-2.
59. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single gene disorder from maternal plasma. *Lancet*. 2000;356:1170.
60. Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Cantalapiedra D, i sur. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol*. 2008;15:1338-44.
61. Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, i sur. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibros*. 2008;7:505-10.
62. Majer S, Bauer M, Magnet E, Strele A, Giegerl E, Eder M, i sur. Maternal urine for prenatal diagnosis—an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat Diagn*. 2007;27:1219–23.
63. Shekhtman EM, Anne K, Melkonyan HS, Robbins DJ, Warsof SL, Umansky SR. Optimization of transrenal DNA analysis: detection of fetal DNA in maternal urine. *Clin Chem*. 2009;55:723–9.
64. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, i sur. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA*. 2004;291:1114-9.
65. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kong A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*. 2004;50:1002-11.
66. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YMD. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2002;48:35–41.
67. Lo YMD, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, i sur. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med*. 2007;13:218-23.
68. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwand P, i sur. 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.
69. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, i sur. 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.
70. 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.

## CURRENT METHODS IN PRENATAL DIAGNOSIS

Jasenska Wagner

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek,  
Department of Medical Biology, Cytogenetics Laboratory

Correspondence to :

Jasenska Wagner

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek,  
Department of Medical Biology, Cytogenetics Laboratory,  
J.Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: [jwagner@mefos.hr](mailto:jwagner@mefos.hr)

Review

### ABSTRACT

Current methods used for prenatal diagnosis can be invasive or noninvasive. Common invasive techniques, like amniocentesis or chorionic villus biopsy, have been used for the last thirty years. During the last twenty years, extensive work in development of noninvasive techniques has been done. General goal of noninvasive methods is to be completely safe and available to all pregnant women. In this review, most commonly used techniques of prenatal diagnosis as well as recent developments in the field are being presented, especially possible application of analysis of cell free fetal DNA from maternal plasma.

**Keywords:** Pregnancy; Prenatal diagnosis; Aneuploidy; Triple test; Combined screening, Ultrasonography; Amniocentesis; Chorion villi biopsy; Cell free fetal DNA; Maternal plasma