

Metode molekularne dijagnostike u prenatalnoj medicini

Molecular diagnostic methods in prenatal medicine

Luca Zaninović¹, Ana Katušić Bojanac^{2,3}, Marko Bašković^{1,3*}

¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zavod za biologiju, Zagreb, Hrvatska

³Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (CERRM), Zagreb, Hrvatska

Sažetak. Prenatalna medicina u smislu probira kromosomskih abnormalnosti fetusa nastala je 70-ih godina prošlog stoljeća. U 21. stoljeću, s razvojem tehnologija napredne i brze analize genoma, kao što su kromosomalni *microarray* te sekvenciranje genoma sljedeće generacije, prenatalna dijagnostika proširila se s najčešćih aneuploidija na detekciju i brojnih drugih strukturalnih kromosomskih poremećaja (povećanje broja kopija gena, delecije, duplikacije), kao i monogenih bolesti. Osim klasičnih invazivnih tehnika (biopsija korionskih resica, amniocenteza) kojima se prikupljaju stanice za citogenetičku i genomsku analizu, danas je moguće neinvazivno analizirati genom fetusa putem analize slobodne deoksiribonukleinske kiseline (DNK) (engl. *cell-free deoxyribonucleic acid*) izolirane iz krvi majke. S obzirom na svoju relativno veliku točnost, jednostavnost i mogućnost rane primjene, izgledno je da će ovakvo neinvazivno testiranje zamijeniti klasični probir u prvom tromjesečju koji je kombinirao biokemijske i fetalne ultrazvučne parametre. Nema sumnje da će neinvazivni probir analizom cfDNA, uz korištenje modernih tehnologija sekvenciranja, sve više postati dijagnostički iskoristiv u prenatalnoj medicini. Ipak, problem možda leži u analizi genomskih podataka gdje se katkad detektiraju promjene u slijedu nukleotida za koje je klinička signifikantnost nepoznata i još ne postoji jasno definiran postupnik kliničkog djelovanja nakon takvih podataka. Cilj ovog preglednog rada je iz različitih izvora, kliničkih podataka, preglednih članaka te metaanaliza izložiti koherentan pregled suvremenih probirnih i dijagnostičkih molekularnih metoda u prenatalnoj medicini. Istaknute su prednosti i mane korištenja metoda probira te analitičke mogućnosti pojedinih molekularnih metoda, s krajnjim kritičkim osvrtom i konceptualizacijom budućnosti ovakvih postupaka.

Ključne riječi: neinvazivno prenatalno testiranje; prenatalna dijagnoza; slobodan DNK

Abstract. Prenatal medicine, in terms of screening for fetal chromosomal abnormalities, originated in the 70s of the last century. In the 21st century, with the development of advanced and rapid genome analysis technologies, such as chromosomal microarray and next-generation genome sequencing, prenatal diagnostics has expanded from the most common aneuploidies to detection of many other structural chromosomal abnormalities (DNA copy number variations, deletions, duplications), as well as monogenic diseases. In addition to classical invasive techniques (chorionic villus sampling, amniocentesis) that collect cells for cytogenetic and genomic analysis, today it is possible to non-invasively screen the fetal genome by analysing cell-free DNA isolated from the mother's blood. Given its relatively high accuracy, simplicity, and early application potential, it is likely that such non-invasive testing will replace classical first-trimester screening that combined biochemical and fetal ultrasound parameters. There is no doubt that non-invasive screening by cfDNA analysis, along with the use of modern sequencing technologies, will certainly become increasingly diagnostically useful in prenatal medicine. However, the problem may lie in the analysis of genomic data where variations in nucleotide sequences are detected, with unknown clinical significance, and there is not yet a clearly defined clinical action procedure after such data. The aim of this review paper is to present a coherent overview of modern screening and diagnostic molecular methods in prenatal medicine from various sources, clinical data, review articles, and meta-analyses. The advantages and disadvantages of using screening methods and the analytical possibilities of individual molecular methods are highlighted, with the ultimate critical review and conceptualization of the future of such procedures.

Keywords: cell-free nucleic acids; noninvasive prenatal testing; prenatal diagnosis

***Dopisni autor:**

Dr. sc. Marko Bašković, dr. med.
Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet
Znanstveni centar izvrsnosti za
reproduktivnu i regenerativnu medicinu
(CERRM)
Šalata 3, 10000 Zagreb, Hrvatska
E-mail: baskovic.marko@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Probir (engl. *screening*) je postupak koji se provodi u određenoj asimptomatskoj populaciji kako bi se detektirali pojedinci s povećanim rizikom za razvoj specifičnog poremećaja ili bolesti te se zatim uputili na daljnje dijagnostičke pretrage s ciljem definitivnog dokaza ili opovrgnuća pretpostavljene dijagnoze¹. Preduvjeti da bi neka bolest uopće bila primjerena za provedbu probira jesu da je detektibilna u pretkliničkom stadiju, da je liječiva te da ostavlja ozbiljne posljedice ako se s liječenjem ne počne na vrijeme. Također, nužno je da probirni test bude visoke osjetljivosti i specifičnosti za traženi poremećaj, da nije štetan za pacijenta te da je adekvatne cijene i lako praktično provediv².

Kada se govori o antenatalnom probiru, u prvom se redu misli na ultrazvučni i biokemijski probir koji se nude svim trudnicama u Republici Hrvatskoj, dok u novije vrijeme u sve širu primjenu ulazi i metoda neinvazivnog probira (engl. *non-invasive prenatal testing*; NIPT) analizom slobodnog DNK iz krvi majke³. Specifičnosti antenatalnog probira jesu da je pacijent zapravo majka fetusa prije 22. tjedna trudnoće pa je u slučaju bolesti osim ranog liječenja (npr. kongenitalne adrenalne hiperplazije) moguća i terminacija trudnoće ukoliko se radi o poremećaju nespojivim sa životom ili onome koji bi iznimno ugrožavao kvalitetu života novorođenčeta⁴. Također, od velike je važnosti i termin provođenja probira te vrijeme čekanja rezultata, što zbog brze promjene referentnih vrijednosti biomarkera u trudnoći, tako i zbog etičkih pitanja vezanih za eventualni prekid trudnoće⁵.

Prvi probiri anomalija fetusa započeli su 70-ih i 80-ih godina 20. stoljeća kada je prvi put uočena povezanost između razine određenih biokemijskih markera u serumu majke i malformacija fetusa. U isto vrijeme počela se razvijati i fetalna ultrasonografija koja je omogućila antenatalni uvid u potencijalne anatomske anomalije⁶. Prvi probirni testovi bili su orijentirani ka otkrivanju anomalija zatvaranja neuralne cijevi i Downovog sindroma, dok je danas pri određenim indikacijama moguć probir i na brojne druge genetske poremećaje^{7,8}.

U aktualnoj kliničkoj praksi, kao probirni test prvog tromjesečja najzastupljeniji je tzv. kombinirani probir koji uključuje ultrazvučni parametar debljine nuhalnog nabora fetusa te biokemijske parametre PAPP-A (plazma-protein A vezan uz trudnoću, engl. *pregnancy-associated plasma protein A*) i slobodne podjedinice beta-hCG-a (beta-humani korionski gonadotropin, engl. *beta human chorionic gonadotropin*) u serumu majke^{9,10}. U drugom tromjesečju moguće je provođenje trostrukog i četverostrukog biokemijskog

Kada se govori o antenatalnom probiru, u prvom se redu misli na ultrazvučni i biokemijski probir koji se nude svim trudnicama u Republici Hrvatskoj, dok u novije vrijeme u sve širu primjenu ulazi i metoda neinvazivnog probira (engl. *non-invasive prenatal testing*; NIPT) analizom slobodnog DNK iz krvi majke.

probira. Trostruki u obzir uzima razine alfa-feto-proteina, hCG-a i nekonjugiranog estriola, a četverostruki još i inhibina A. Integrirani probir jest probir u 1. i 2. tromjesečju u iste trudnoće^{9,11}. Rezultat biokemijskog probira dobiva se tako da se koncentracija biljega izmjerena u majčinu serumu podijeli medijanom specifičnim za gestacijsku dob i kontrolne trudnoće te se zatim dobivene vrijednosti uvrstavaju u formulu koja sadržava populacijske parametre i koeficijente korelacije. Unosi se i modifikacija prema dobi trudnoće. Konačan rezultat zapisan je u obliku omjera, tj. vjerojatnosti da genom fetusa sadrži trisomiju karakterističnu za najčešće sindrome (Downov, Edwardsov, Patauov). Ako je omjer manji od 1 : 250, smatra se urednim nalazom, ako je veći, trudnica se upućuje dalje na invazivnu prenatalnu dijagnostiku. Kao granična vrijednost uzet je omjer 1 : 250 jer je to rizik od komplikacija pri postupku amniocenteze¹². Kombinirani probir, dakle, ne uključuje analizu genoma koja zahtijeva invazivni klinički postupak uzimanja fetalnih stanica tijekom amniocenteze ili biopsije korionskih resica.

S razvojem neinvazivne metode tekućih biopsija, unazad nekoliko godina u laboratorijima širom svijeta nudi se i neinvazivni probir slobodnog fetalnog DNK (engl. *cell-free fetal DNA*; cffDNA)¹³.

Komercijalni testovi koji koriste ovu metodu prvi su put u kliničku primjenu pušteni 2011. godine u Sjedinjenim Američkim Državama. Popularnost im je naglo rasla te je 2018. godine u svijetu primijenjeno 10 milijuna NIPT testova¹⁴. U nekim državama, primjerice Nizozemskoj, NIPT je postao standardna metoda probira kod svih trudnica¹⁵.

Cilj ovog preglednog rada je iz različitih izvora, kliničkih podataka, preglednih članaka te metaanaliza izložiti koherentan pregled metoda molekularne dijagnostike u prenatalnoj medicini. Naglasak je dan ponajviše na principima, postupcima, izazovima i razvoju neinvazivnih prenatalnih dijagnostičkih metoda koje se još nazivaju i metode probira (engl. *screening*), s krajnjim kritičkim osvrtom i konceptualizacijom budućnosti ovakvih postupaka.

NEINVAZIVNI TEST PROBIRA ANALIZOM cfDNA

Ukoliko klasični kombinirani ili cfDNA bazirani probirni testovi pokažu povećan rizik za razvoj kromosomalnog ili genetičkog poremećaja, metodama invazivne prenatalne dijagnostike pribavljaju se fetalne stanice ili tkiva koja se zatim podvrgavaju genetičkom testiranju. Amniocenteza je najprimjenjivija metoda invazivne prenatalne dijagnostike i najčešće se izvodi između 15. i 18. tjedna trudnoće. Biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villous sampling*; CVS) metoda je koja se koristi nešto ranije, između 10. i 12. tjedna trudnoće. Kordocenteza ili perkutana aspiracija krvi pupkovine (PUBS) danas se rijetko izvodi, uglavnom za dijagnostiku hematoloških bolesti, kongenitalnih infekcija i određivanje acidobaznog statusa fetusa. Moguće komplikacije navedenih metoda jesu pobačaj, fetomaternalna hemoragija, ruptura membrana, infekcija i drugo¹⁶⁻¹⁸. Nakon uzorkovanja materijala na njemu se provodi jedna od metoda navedenih u odlomku „Metode analize uzoraka pribavljenih invazivnim postupcima“.

Rizici vezani uz pribavljanje tkiva za analizu pri postupcima invazivne prenatalne dijagnostike nametnuli su potrebu za nekom neinvazivnom metodom koja bi klasificirala, tj. probirala trudnice prema vjerojatnosti da nose plod s genetskim abnormalnostima te bi samo određeni broj žena bio

podvrgnut invazivnom uzorkovanju materijala za genetičko testiranje.

Neinvazivni postupci temelje se na već spomenutom kombiniranom probiru (ultrazvučnom pregledu fetusa uz mjerenje biokemijskih biljega funkcije fetoplacentnog odjeljka iz uzorka venske krvi trudnice)⁹. Unatrag 10 godina moguća je i analiza slobodnog fetalnog DNK iz krvi trudnice, a uvriježen naziv za takvu vrstu analize jest – neinvazivno prenatalno testiranje¹⁴.

Temelj neinvazivnog prenatalnog testiranja (NIPT) uporabom cfDNA iz krvi

Ideja o neinvazivnom prenatalnom testiranju, odnosno probiru temelji se na otkriću Walknowske koja je 1969. kariotipizacijom limfocita iz krvi trudnica pokazala da ih dio ima muški genom. Kasnije je, uvidjevši da su te žene nosile muške fetuse, zaključila da je i dio limfocita u krvi trudnica bio fetalnog podrijetla¹⁹. Ipak, do danas, analiza čitavih fetalnih stanica iz krvotoka majke još uvijek nije u kliničkoj uporabi.

Još 1948. godine Mandel i Metais po prvi su put detektirali cirkulirajuće nukleinske kiseline u krvnom serumu pacijenata oboljelih od raka²⁰. Utvrđeno je da su to zapravo kratki fragmenti DNK veličine do 200 parova baza koji predstavljaju DNK bilo koje apoptotične ili nekrotične stanice čiji se razgradni materijal otpušta u intersticij i preko tkivnih krvnih žila dopijeva u cirkulaciju²¹. Analiza slobodnog DNK iz krvi ponajviše je kliničku primjenu našla u onkologiji, gdje se metodom neinvazivne, tzv. tekuće biopsije (engl. *liquid biopsy*) u krvi potvrđuje mutirani slobodni DNK malignih stanica, no nakon što je dokazano da se u izoliranom krvnom serumu trudnica mogu pronaći fragmenti slobodnog fetalnog DNK, Lo i sur. su već 1997. godine pomoću analize fetalnog DNK iz krvi majke utvrdili muški spol fetusa analizom gena Y-kromosoma te je zadnjih godina još brži napredak primjene analize cfDNA iz krvi upravo primijećen u prenatalnoj medicini²²⁻²⁴.

Uzorkovanje i izolacija slobodnog DNK (cfDNA) za NIPT

NIPT se temelji na detekciji promjena u relativno malom udjelu analiziranog DNK. Upravo zbog toga nužno je održati što veću fetalnu frakciju u prikupljenoj venskoj krvi majke, ponajprije sprje-

čavajući lizu leukocita u uzorku, što se radi na više načina²⁵. Periferna venska krv prikuplja se u K2 EDTA gel-epruvete za molekularnu dijagnostiku (8 mL) ili u Streck epruvetu (10 mL). Zatim se centrifugiraju na 1600 x g tijekom 10 minuta unutar 6 sati od uzorkovanja, nakon čega se 1 mL plazme izdvaja automatskim pipetomom. Plazmu je zatim moguće profiltrirati kroz filtar veličine pora 0,45 µm ili dodatno centrifugirati još 10 minuta na 16000 x g. Iz 3 mL uzorka plazme, cfDNA izdvaja se kitovima za cirkulirajuće nukleinske kiseline²⁶.

Svojstva majčine i fetalne frakcije slobodnog cirkulirajućeg DNK

Slobodni cirkulirajući fragmenti DNK (cfDNA) u krvnoj plazmi i serumu, nastali kao raspadni produkti uslijed nekroze i apoptoze stanica, veličine su do 200 parova baza, a predstavljaju i majčinu i fetalnu frakciju nuklearnog DNK^{22, 24}. Fetalni cfDNA podrijetlom je iz trofoblasta posteljice, a majčin cfDNA potječe od stanica svih organa, od kojih je ipak najzastupljeniji hematopoetski sustav zbog lokacije stanica, njihova brzog obrtaja i direktnog otpuštanja razgradnih produkata u plazmu^{22, 27, 28}.

U NIPT metodi važno je razlikovati i procijeniti majčinu, odnosno fetalnu frakciju cfDNA. Fetalna frakcija (FF) predstavlja udio cfDNA fetalnog podrijetla u ukupnom cfDNA u majčinoj plazmi (zbroy cfDNA fetalnog i cfDNA majčinog podrijetla). Između 11. i 13. tjedna gestacije, kada se najčešće uzimaju uzorci krvi za potrebe NIPT-a, fetalna frakcija iznosi 7-13 %²⁹. Iznimno je važno odrediti razinu fetalne frakcije u uzorku jer o njoj ovisi statistička pouzdanost rezultata i kontrola kvalitete pretrage³⁰. Minimalni FF potreban za provedbu NIPT-a ovisi o molekularnoj metodi kojom se test provodi, a najčešće iznosi 2-4 %. S porastom FF-a raste i pouzdanost rezultata, tj. osjetljivost i specifičnost testa. Ukoliko FF padne ispod granice detekcije (engl. *limit of detection*; LOD) laboratorija, izostat će rezultat testa (engl. *no call*)²⁴.

Fetalna frakcija ovisi o mnogo bioloških faktora te na nju utječu stanja i majke i fetusa. Povećanje majčinog udjela cfDNA, smanjuje fetalnu cfDNA frakciju. Najčešće se to zbiva kod trudnica prekomjerne tjelesne mase kada uslijed inflamatornih procesa i nekroze adipocita dolazi do povećanog otpuštanja cfDNA³¹. Također, udio majčinog cfDNA

povećan je za vrijeme bilo kakvog upalnog procesa u majčinom tijelu, posebno u slučaju autoimunih bolesti i nedostatka vitamina B12^{32,33}. Primijećeno je i da žene na terapiji LMWH (niskomolekularni heparin, engl. *low weight molecular heparin*) imaju manji FF pa se preporučuje uzorkovanje neposredno prije iduće doze heparina³⁴. FF ponajviše ovisi o biološkim karakteristikama fetusa. Tako je pri trisomiji 21. kromosoma povećana fetalna frakcija što pospješuje detekciju Downovog sindroma, dok je kod trisomija 13. i 18. kromosoma FF smanjen³⁵.

Određivanje fetalne frakcije rutinski se provodi u svim laboratorijima prilikom izvođenja NIPT-a, a temelji se na brojnim različitostima između fetalnog i majčinog cfDNA. Fragmenti podrijetla placente kraći su, različito metilirani i imaju drugačiji epigenetički utisak (engl. *epigenetic footprint*), razlikuju se od majčinih po polimorfizmu jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*; SNP), a cfDNA muškog fetusa sadrži Y-kromosom^{36, 37}. Rezultati su, nažalost, često neusporedivi jer ovisi o primijenjenoj metodi za kvantifikaciju³⁸. Pet je glavnih metoda mjerenja FF-a koje se danas koriste u komercijalnim DNK laboratorijima³⁸. Određivanje FF-a koristeći brojenje DNK fragmenata specifičnih za Y-kromosom (npr. DYS-1, DYS-14), moguće je samo u slučajevima kada majka nosi muški fetus³⁹. Metoda bisulfitnog sekvenciranja razlikuje fetalni od majčinog DNK na temelju obrazaca metilacije. Pri njezinom korištenju moguće su tehničke greške u slučaju hipometilacije DNK placente ili varijabilno metiliranog DNK majčina bubrega, jetre i endotela³⁷. Najtočnijim se smatra određivanje koristeći omjere SNP-ova na kromosomima koji nikad nisu monosomični niti trisomični u vijabilnoj trudnoći^{40, 41}. Jedna od mogućnosti je i masivno paralelno sekvenciranje praćeno kapilarnom elektroforezom koja fragmente razdvaja po veličini⁴². Druga varijanta razdvajanja fragmenata po veličini je i *sequence read approach* (SeqFF)⁴³.

Prilagođavanje granične prihvatljive vrijednosti fetalne frakcije kompromis je između statističke pouzdanosti rezultata i *no call* ishoda pretrage.

U blizanačkim trudnoćama ukupni FF je povišen, međutim FF po fetusu 32 % je manji⁴⁴. Ukoliko se radi o monozigotnim blizancima, ova činjenica ne

predstavlja problem pri analizi njihova genoma, ali kod dizigotnih može doći do manje pouzdanosti rezultata ili nemogućnosti očitavanja testa zbog premalog FF-a⁴⁵. Ako se testom detektira aneuploidija, bitno je odrediti je li ona prisutna kod samo jednog ili oba ploda. To se utvrđuje određivanjem trisomične frakcije. Ista vrijednost ukupne fetalne i trisomične frakcije ukazuje na to da je trisomija prisutna kod obaju blizanaca, a upola manja vrijednost trisomične u odnosu na FF sugerira da je trisomija kromosoma prisutna samo kod jednog od blizanaca⁴⁶.

Dijagnostička korisnost i primjena analize slobodnog fetalnog DNK

Uspjeh neinvazivnog testiranja, odnosno analize fetalnog cfDNA, temelji se prvenstveno na neinvazivnosti postupka jer se za analizu cfDNA uzima periferna venska krv majke čime se ni na koji način ne ugrožavaju niti ona niti plod^{26,47}. Osim toga, bazira se i na ranoj mogućnosti primjene već od 9. tjedna trudnoće nadalje⁴⁷, što je ipak ranije nego prilikom biokemijskog probira i invazivnih tehnika. Razvijeni su i *online* kalkulatori koji, nakon što se odabere dijagnostičirana patološka promjena i dob majke, izračunavaju osjetljivost, specifičnost, PPV (pozitivna prediktivna vrijednost) i NPV (negativna prediktivna vrijednost) testa^{48,49}. Ta prednost prepoznata je mahom od visokorizične populacije trudnica (npr. dob majke > 35 godina, oplodnja *in vitro*, višestruki pobačaji itd.)^{45,50}, no porasla je i popularnost korištenja NIPT-a u niskorizičnoj populaciji. Međutim, s obzirom da je prevalencija aneuploidija puno manja u populaciji niskoga rizika, manja je i pozitivna prediktivna vrijednost testa (PPV) (npr. za Downov sindrom 45-75 % u odnosu na 90 % kod žena starijih od 35 godina). S druge strane, u analizi varijacija u broju kopija gena (engl. *copy number variations*; CNV) učestalost detekcije CNV-ova ne ovisi o dobi majke, ali je zbog općenito niske prevalencije u populaciji⁵¹⁻⁵³ te pojave placentalnog mozaicizma u 1-2 % trudnoća, PPV za ovu analizu jako nizak^{54,55}. Također, za detekciju mikrodelecija, analiza cfDNA SNP metodom dostiže PPV od svega 50 %^{54,56}.

Jedna od prvih primjena analize cfDNA bilo je neinvazivno određivanje spola fetusa, za čime po-

stoji potreba kada je majka nositeljica X-vezanih bolesti od kojih mogu oboljeti njezini muški potomci – npr. Duchenneove mišićne distrofije, hemofilije, sindroma fragilnog X-kromosoma, Alportova sindroma itd.^{57,58}. Analiza cfDNA pokazala se korisnim pravovremenim alatom za dijagnozu te intrauterino liječenje kongenitalne adrenalne hiperplazije, a moguće je otkriti i Rh-D status fetusa te time minimizirati bespotrebnu profilaktičku imunizaciju Rh-negativnih majki anti-D imunoglobulinima⁵⁹⁻⁶².

Otkriće masivnog paralelnog sekvenciranja i razvoj bioinformatike omogućili su otkrivanje aneuploidija što je danas i najčešća značajka NIPT analize cfDNA⁶³. Rutinski se analiziraju trisomije 21 (Downov sindrom), 18 (Edwardsov sindrom) i 13 (Patauov sindrom) te promjene u broju spolnih kromosoma. Najviša je točnost detekcije Downovog sindroma (PPV detekcije 99,5 %) zbog višeg FF-a povezanog s ovim sindromom, dok je on u slučaju Edwardsovog i Patauovog sindroma smanjen, pa je i točnost njihove detekcije manja (PPV detekcije 99 % za Edwardsov i 79-92 % za Patauov sindrom)^{45,64,65}. Sve je češća i dijagnostička mikrodelecija i mikroduplikacija iako je nakon potvrde *microarray* analizom dokazan PPV detekcije CNV-ova NIPT metodom od svega 14,89 %⁶⁶. Komercijalno je dostupna detekcija mikrodelecija i mikroduplikacijskih sindroma DiGeorge, 1p36, Cri-du-Chat, Prader-Willi/Angelman^{67,68}, sindroma neosjetljivosti na androgene, sindroma Bannayan-Riley-Ruvalcaba, sindroma Melnick-Fraser, 10q22.3–q23.31 mikrodelecije, sindroma Cornelia de Lange, Cowdenovog sindroma, Dandy-Walkerovog sindroma, distalne artrogripoze tipa 2B, sindroma Dyggve-Melchior-Clausen, Feingoldovog sindroma, Langer-Giedionovog sindroma, mikrodelecije 11q14.2–q14.3, X-vezanog panhipopituitarizma, sindroma Potocki-Lupski (17p11.2 duplikacija), sindroma Saethre-Chotzen, sindroma Smith-Magenis⁶⁹.

U posljednje vrijeme velik je napredak postignut u neinvazivnom testiranju monogenskih bolesti poput miotonične distrofije, cistične fibroze, beta-talasemije major, kongenitalne adrenalne hiperplazije⁷⁰⁻⁷³. U početku je bila moguća samo klinička dijagnostika autosomno dominantno naslijeđenih bolesti od oca ili nastalih *de novo*⁵⁰ jer

je razlikovanje identičnih alela majke i fetusa u plazmi kompleksno^{74,75}. Za neinvazivnu dijagnostiku autosomno recesivnih i X-vezanih bolesti nužan je bio razvoj sekvenciranja nove generacije i digitalne lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) te tehnike određivanja udjela mutiranog i divljeg alela gena od interesa u cfDNA iz majčine plazme (engl. *relative mutation dosage*) i određivanja omjera alela između dva haplotipa uz pomoć analize SNP-ova vezanih za mutirane gene (engl. *relative haplotype dosage analysis*)⁷⁵. Osim toga, moguća je klinička uporaba ovakvog testiranja u forenzici gdje je dokazana osjetljivost metode analize cfDNA u određivanju očinstva od 99 %^{76,77}.

Jedna od mogućnosti u budućnosti jest i sekvenciranje čitavog genoma (engl. *whole genome sequencing*) fetusa iz fragmenata cffDNA zahvaljujući tome što su svi dijelovi genoma zastupljeni u majčinoj plazmi u stalnim relativnim omjerima. Prvi put ovakva analiza izvedena je 2010.⁷⁷. Ukoliko se odjednom detektiraju aneuploidije više kromosoma, najčešće se radi o malignom oboljenju majke, a s obzirom na dob trudnica uglavnom je riječ o karcinomu dojke i hematološkim malignomima⁷⁸⁻⁸¹.

MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKE METODE U PRENATALNOJ MEDICINI

Metode analize cfDNA

Šira primjenjivost metode analize cfDNA uvelike je ovisila o razvoju sekvenciranja nove generacije te je prvi put primijenjena u slijepom kliničkom ispitivanju 2011. godine kada su analizirani uzorci 4664 žena u visokorizičnoj trudnoći sa stopom otkrivanja trisomije 21. kromosoma od 98,6 %⁸². Danas su na tržištu prisutni testovi koji koriste tri različite metode analize cfDNA u smislu otkrivanja aneuploidija, a temelje se na nasumičnom sekvenciranju koje analizira čitav genom ili ciljanom sekvenciranju kojim se sekvenciraju samo regije od interesa.

Metoda sekvenciranja nasumičnim pristupom

Metoda sekvenciranja nasumičnim pristupom (engl. *shotgun massively parallel sequencing*; s-MPS) zasniva se na simultanom sekvenciranju i brojanju milijuna majčinih i fetalnih DNK fragme-

nata veličine otprilike 25 parova baza koji se zatim uz pomoć referentnog humanog genoma točno pridružuju lokusu i kromosomu s kojeg potječu⁸⁶. Višak ili manjak fragmenata DNK pridruženih lokusima smještenima na istom kromosomu u odnosu na referentni euploidni DNK ukazuje na aneuploidiju ploda. Relativni višak fragmenata u slučaju trisomije fetusa bit će malen zbog malenog udjela cffDNA u ukupnom cfDNA (npr. udio fragmenata koji potječu s kromosoma 21 u ukupnom broju analiziranih fragmenata bit će uvećan za samo

U većini država ne postoji zakonom reguliran sustavni probirni program pa se tu NIPT primjenjuje samo kao kontingentni pregled. To znači da su značajke, razvoj i učinkovitost pojedinih NIPT testova pod kontrolom samog komercijalnog proizvođača i često im nedostaje validativna studija.

10 % u slučaju trisomije fetusa pri FF analiziranog uzorka od 20 %). Također, ova metoda koristi se i za otkrivanje mikrodelecija⁸³. Zbog visoke cijene postupka često se u istoj reakciji analiziraju uzorci više pacijentica označeni različitim bar kod sekvencijama. Ovime se na račun smanjenja troška smanjuje i dubina sekvenciranja te osjetljivost i specifičnost metode⁸⁴.

Jedna od mogućih budućih uporaba ove metode jest analiza virusnog cfDNA iz krvi majke u istom aktu. Na taj način, mogla bi se tijekom probirnog testa koji se obično obavlja oko 10. gestacijskog tjedna otkriti i prisutnost virusa koji su čest uzrok intrauterinog zaostajanja u rastu i kongenitalnih malformacija ploda. Zasad je istraživanjem potvrđena mogućnost identifikacije humanog citomegalovirusa i herpes B virusa. Ova otkrića omogućila bi pravovremenu terapiju majke hipereimunim gamaglobulinima te sprječavanje transmisije virusa kroz placentu⁸⁵.

Ciljano sekvenciranje genoma

Ciljano dubinsko sekvenciranje genoma (engl. *target massively parallel sequencing*; t-MPS) metoda je kojom se sekvenciraju i broje fragmenti pridruženi samo regijama od interesa (najčešće 13, 18, 21, X i Y-kromosom). Relativni višak fragmenata podrijetlom s jednog kromosoma u odnosu na druge ukazuje na aneuploidiju ploda.

Iako je ova metoda značajno jeftinija i brža te je odlikuje veća osjetljivost i specifičnost u otkrivanju aneuploidije kromosoma od interesa, pruža manju količinu informacija o genomu fetusa u cjelini. Naime, ovom metodom ne može se otkriti triploidija fetusa niti mikrodelecije^{40, 47}.

Ipak, obje navedene metode omogućuju veliku dubinu sekvenciranja te su kao takve optimalne za obradu uzoraka niske fetalne frakcije slobodnog DNK te u slučajevima testiranja manjih promjena u varijaciji broja kopija⁴⁷.

Polimorfizam jednog nukleotida

Analiza polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*; SNP) detektira promjenu jedne baze koja se pojavljuje u frekvenciji većoj od 1 % unutar populacije. SNP-ovi se pojavljuju u kodirajućim i nekodirajućim regijama genoma. Ovo je jedina metoda analize cfDNA koja razlikuje majčin od fetalnog DNK uzimajući u obzir relativni kvantitativni doprinos majčinog i očevog genoma u plazmi. Zasniva se na simultanoj amplifikaciji 20000 SNP sekvencija. Vjerojatnost aneuploidije i poliploidije fetusa računa se nakon pridruživanja SNP sekvencija položaju na kromosomima. Također, moguća je i analiza homolognih regija kromosoma kojom se može ustvrditi uniparentalna disomija, neočinstvo i konsangvinitet roditelja te roditeljsko podrijetlo aneuploidije ili naslijeđenih mutacija. Nudi i mogućnost otkrivanja mikrodelecija, triploidije i sindroma nestalog blizanca iako potonje ne može razlikovati^{83, 86-88}, a također nije pogodna za analizu trudnoća u kojima trudnica nije biološka majka ploda (donirani oociti, embrij, surogat majka)^{54, 89}.

Komercijalni NIPT testovi

U ponudi je danas velik broj komercijalno dostupnih NIPT testova koji se temelje na analizi cfDNA iz krvi majke.

NIFTY test firme BGI analizira uzorke cfDNA metodom sekvenciranja nasumičnim pristupom (engl. *shotgun massively parallel sequencing*; s-MPS). Omogućuje detekciju trisomija^{9, 13, 16, 18, 21, 22}, aneuploidija spolnih kromosoma te 60 mikrodelecijskih i mikroduplicacijskih sindroma⁶⁹. Na istom principu rade i testovi MaterniT21 (Sequenom) i Verifi (Illumina)^{90, 91}. Harmony test tvrtke Ariosa temelji se na metodama ciljanog dubin-

skog sekvenciranja genoma (engl. *target massively parallel sequencing*; t-MPS) i *microarray*. Također nudi dijagnostiku osnovnih trisomija (13, 18, 21), aneuploidija spolnih kromosoma i mikrodelecijskih sindroma⁹².

Na metodi analize polimorfizma jednog nukleotida (SNP) zasniva se Naterin test Panorama. Njime je moguće dijagnosticirati trisomiju kromosoma 13, 18 i 21, abnormalnosti spolnih kromosoma te pet mikrodelecijskih sindroma (22q11.2 delecijski sindrom, Prader-Willijev, Angelmanov, 1p36 delecijski sindrom i Cri-du-chat). Jedino SNP metodom moguća je i detekcija triploidije te razlikovanje majčinog i fetalnog genoma⁹³. Natera također nudi i Vistara test za 25 monogenetskih bolesti. Neke od njih su ahondroplazija (FGFR3), sindrom Alagille (JAG1), Apertov sindrom (FGFR2), CHARGE sindrom (CHD7), Rettov sindrom (MECP2)⁹⁴.

Unatoč dosta dugoj prisutnosti ovih testova na tržištu, samo u Belgiji i Nizozemskoj, a od 1. lipnja 2021. i u Ujedinjenom Kraljevstvu, NIPT se nudi u okviru nacionalnog programa probira, no uglavnom kao sekundarni test probira i alternativa invazivnom testiranju trudnica klasificiranih kao visokorizične na temelju kombiniranog probira^{95, 96}. U većini država ne postoji zakonom regulirani sustavni probirni program pa se tu NIPT primjenjuje samo kao kontingentni pregled. To znači da su značajke, razvoj i učinkovitost pojedinih NIPT testova pod kontrolom samog komercijalnog proizvođača i često im nedostaje validativna studija. Mogući problemi koji proizlaze iz navedenog jesu opservacije da se NIPT testiranja provode potpuno neselektivno, bez procjene potrebe za njima te bez genetičkog savjetovanja.

INVAZIVNE METODE U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI – ANALIZE UZORAKA FETUSA

Napredak genetike i tehnologije analize genoma omogućio je molekularnu dijagnostiku mnogih bolesti^{97, 98}. Ovo je posebno važno u prenatalnom periodu kada je dijagnostika zasnovana isključivo na analizi fenotipa ograničena na prikaz ultrazvukom i magnetskom rezonancijom⁹⁹.

Dijagnoza u fetalnom razdoblju može biti od iznimne važnosti ukoliko je liječenje moguće započeti antenatalno (npr. kongenitalna adrenalna hiperplazija) ili odmah nakon porođaja⁵⁹.

Prenatalno testiranje ključno je pri odluci o terminaciji trudnoće s obzirom na to da brojne bolesti koje znatno narušavaju kvalitetu života novorođenčeta, nemaju fenotipskih obilježja detektabilnih ultrazvukom¹⁰⁰.

Materijal pribavljen invazivnim postupcima može se podvrgnuti svim molekularnim dijagnostičkim tehnikama, kao i tkiva koja se koriste pri postnatalnoj dijagnostici. Najčešće se tu radi o konvencionalnoj i molekularnoj citogenetici u svrhu otkrivanja aneuploidija i strukturalnih promjena kromosoma, a u novije vrijeme nadopunjuje ih analiza kromosoma na mikročipu (engl. *chromosomal microarray analysis*; CMA) koja ima širi dijapazon primjene jer obuhvaća i komparativnu genomsku hibridizaciju na mikročipu ili mikropostroju (engl. *array comparative genomic hybridization*; aCGH) i analizu polimorfizma jednog nukleotida na mikropostroju (engl. *single nucleotide polymorphisms microarray*; SOMA). Također, moguća je analiza uzoraka metodom istovremenog umnažanja vezanih proba (engl. *multiplex-ligation dependent probe amplification*; MLPA) te svim vrstama sekvenciranja genoma.

Citogenetika je grana genetike koja proučava morfologiju i ponašanje kromosoma za vrijeme diobe. Konvencionalna citogenetika podrazumijeva kariotipizaciju koja je kao najstarija metoda dijagnostike ušla u kliničku primjenu 70-ih godina prošloga stoljeća otkrićem tehnike pruganja (engl. *banding*) kromosoma¹⁰¹. Danas se rutinski primjenjuje tehnika pruganja Giemsa-bojom i tripsinom (*G-banding*)¹⁰². Rezolucija ove dijagnostičke metode iznosi 5-7,5 Mb¹⁰³. Dostupne su još i metode pruganja kvinakrinom (*Q-banding*), R-pruganje, tj. reverzno bojenje od onoga pri G-pruganju i C-pruganje¹⁰⁴. Pri utvrđivanju kariotipa s navedenom rezolucijom moguća je detekcija eventualnih aneuploidija, poliploidija, promjena u broju spolnih kromosoma (X0, XXY, XYY) te velikih strukturalnih aberacija (većih od 5-7,5 Mb).

Molekularna citogenetika odnosi se ponajprije na fluorescentnu *in situ* hibridizaciju (FISH)¹⁰³. Ovom tehnikom moguće je detektirati kompleksne translokacije među kromosomima¹⁰⁵. Koristi se za detekciju aneuploidija i poliploidija na nekultiviranim uzorcima stanica plodne vode¹⁰³. Također, moguća je detekcija delecija, duplikacija i translo-

kacija fragmenata veličine 100-200 Kb¹⁰⁶. Ograničenje ove metode leži u činjenici da je odabir proba za korištenje najčešće određen unaprijed uočenim fenotipskim anomalijama fetusa ili inkonkluzivnim rezultatima kariotipizacije¹⁰⁷.

Kromosomska analiza na mikročipu obuhvaća komparativnu genomsku hibridizaciju na mikročipu ili mikropostroju (aCGH) i analizu polimorfizma jednog nukleotida na mikropostroju (SOMA). Obje metode prvenstveno se koriste za otkrivanje submikroskopskih promjena DNK (mikrodelecija i mikroduplikacija).

Granica rezolucije ove metode je 50-100 Kb. Njome se mogu dijagnosticirati varijacije u broju kopija koje ukazuju na eventualnu uniparentalnu disomiju, mozaicizam ili konsangvinitet. Za razliku od aCGH, SOMA-om se može detektirati i triploidija^{108, 109}.

Prednost CMA u odnosu na kariotipizaciju leži u mogućnosti dijagnostike klinički značajnih submikroskopskih promjena koje otkriva u oko 1 % fetusa normalnog kariotipa upućenih na daljnje pretrage zbog starije dobi majke ili pozitivnog serumskog probira i u 6 % fetusa koji su upućeni na CMA zbog ultrazvučno ustanovljenih strukturalnih anomalija^{107, 110}. Ipak, CMA se uvijek mora provoditi u kombinaciji s kariotipizacijom kako ne bi promaknule balansirane translokacije¹¹¹.

MLPA, tj. metoda istovremenog umnažanja vezanih proba, molekularna je tehnika koja omogućuje detekciju malih delecija i insercija ispod granica rezolucije FISH-a i CMA¹¹². Metoda se temelji na detekciji promjena u broju kopija. Ograničenja primjene ove metode leže u tome što ne može detektirati mozaicizam niskog stupnja, inverzije niti translokacije¹¹³.

Sekvenciranje DNK je određivanje slijeda nukleotida u DNK molekuli. Ovakav način analize gena sve je češći u prenatalnoj dijagnostici. Najjednostavnija i najjeftinija metoda analiza je samo jednog gena. Ona se koristi kada je ultrazvučni nalaz ili nalaz probira visoko specifičan za pojedinu bolest ili ako je u obiteljskoj anamnezi već poznata genetska bolest koja bi se mogla prenijeti na fetus. Ukoliko ultrazvučni nalaz nije visoko specifičan, moguće je koristiti genetske panele za pojedine sindrome, npr. za displaziju skeleta ili za fetalnu akineziju. Ovakvim panelima istodobno

se u jednoj reakciji sekvencira veći broj gena za koje se smatra da mogu uzrokovati utvrđeni poremećaj. Na ovaj način moguće je brže doći do dijagnoze⁹⁹.

Sam vrh tehnologije prenatalne genetske dijagnostike čine cijeloegzomsko sekvenciranje, odnosno sekvenciranje cijelog egzoma čovjeka (engl. *whole exome sequencing*; WES), kao i sekvenciranje cjelokupnog genoma (engl. *whole genome sequencing*; WGS). Američko društvo za medicinsku genetiku i genomiku (engl. *The American College of Medical Genetics and Genomics*; ACMG) preporučuje primjenu WES-a kada obiteljska anamneza i testovi probira ukazuju na patološku promjenu, a drugim metodama prenatalne dijagnostike nije se uspio dijagnosticirati poremećaj¹¹⁴. Također, WES-om se ne mogu otkriti varijacije broja kopija (CNV) pa svakoj analizi mora prethoditi analiza DNA na mikročipu (engl. *microarray*). Isto tako, metoda ne otkriva aneuploidije, poliploidije, translokacije, mikrosatelite. Nažalost, WGS još uvijek nije u kliničkoj primjeni jer se radi o puno skupljoj metodi koja zahtijeva više vremena i ograničena je mogućnost interpretacije varijanti pronađenih među intronima¹¹⁵.

OGRAIČENJA NEINVAZIVNIH I INVAZIVNIH METODA

Ograničenja NIPT metoda

Neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT) pokazalo se kao vrlo učinkovita metoda probira, barem što se tiče procjene rizika za Downov, Patauov i Edwardsov sindrom, što pokazuje njegova primjena u svijetu već od 2012. godine. Iako i dalje popularnost NIPT testova raste, mnogi stručnjaci ukazuju na njihova dijagnostička ograničenja naglašavajući da je potrebno izraditi dobre kliničke smjernice s pomno predviđenim ekonomskim, socijalnim i etičkim problemima koji mogu iznjedrati prije ponude ovakvih testova u nacionalnim zdravstvenim sustavima¹¹⁶.

Prva kritika NIPT-a jest činjenica da se ovdje radi o metodi probira, a ne dijagnostičkom testu⁴⁷. Stoga svaki patološki nalaz (izuzev nalaza monogenetskih bolesti dokazanih metodom analize relativnog udjela haplotipa) zahtijeva potvrdu invazivnom prenatalnom dijagnostikom.

Nadalje, zbog svoje velike popularnosti i korištenja komercijalnih NIPT testova u populaciji niskog rizika, dolazi do pojavnosti lažno pozitivnih rezultata zbog niskog PPV-a u takvoj populaciji, slično kao i kod poremećaja s niskom incidencijom⁵¹⁻⁵³. Primjerice, kod 20-godišnjih trudnica vjerojatnost da nose fetus s Patauovim sindromom je 1 na 11042 te je PPV svega 6 %, tj. 94 od 100 pozitivnih rezultata u ovom slučaju bit će lažno pozitivni^{49, 54}. Drugi razlog jest prisutnost cfDNA odumrlog blizanca u majčinom serumu. Genetski materijal odumrlog blizanca zadržava se još najmanje 8 tjedana u cirkulaciji majke⁵⁵. Razlikovanje ove pojave od stvarne aneuploidije moguće je jedino NIPT metodom koja se temelji na analizi SNP-ova¹¹⁷.

Prepreku NIPT analizi predstavlja i činjenica da je cfDNA podrijetla posteljice u kojoj je u 1-2 % slučajeva prisutan mozaicizam između 10. i 12. gestacijskog tjedna kada se najčešće uzorkuje majčina krv za NIPT analizu^{55, 56}. Ova pojava nerijetko dovodi i do lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Tijekom embrionalnog razvoja, unatoč perzistiranju triploidije u tkivu trofoblasta, moguća je njezina spontana regresija u embrionalnom tkivu i razvoj euploidnog fetusa^{118, 119}. Danas postoji mogućnost određivanja „trisomične frakcije“, tj. relativnog udjela trisomičnog kromosoma u cfDNA u odnosu na fetalnu frakciju. Rezultat u kojem je „trisomična frakcija“ manja od FF sugerira prisutnost placentarnog mozaicizma – „trisomična frakcija“ veća od FF ukazuje na mozaicizam ili malignom majke. Pravom aneuploidijom fetusa smatra se nalaz u kojem su trisomična i fetalna frakcija približno jednake^{46, 120}.

Što se tiče multiplih, blizanačkih trudnoća, NIPT metoda nije idealan odabir zbog smanjenja izolirane fetalne frakcije DNK po fetusu, čime raste šansa za pogrešan nalaz^{44, 121}. Stoga su komercijalno dostupni testovi još uvijek ograničeni na određivanje isključivo trisomija 13, 18 i 21 kod dvojajčanih blizanaca^{86, 93}. Nadalje, ukoliko se analizom utvrdi povećan rizik za trisomiju, NIPT metodom nemoguće je utvrditi o kojem blizancu se radi. Također, ova metoda nije preporučljiva ukoliko je došlo do odumiranja jednog od blizanca jer se njegov cfDNA otpušta u plazmu iz ostataka posteljinih tkiva i do tri mjeseca nakon odumiranja^{24, 122, 123}.

Nijedna od metoda koja se bazira na analizi cfDNA nije pogodna za majke koje imaju transplantiran organ zbog prisutnosti fragmenata još jednog humanog DNK u krvi⁸⁹.

Također, važno je naglasiti da je NIPT analizom nemoguće otkriti anatomske malformacije, oštećenja neuralne cijevi i defekte ventralne stijenke fetusa^{47, 124, 125}.

Naposljetku, NIPT predstavlja metodu probira koja ne zahtijeva razmatranje intervencijskog rizika te ne uključuje kalkulaciju dobi trudnice kao kod biokemijskog probira i u načelu je prikladna za svaku trudnicu. Ipak, potrebno je provođenje genetičkog savjetovanja prije samog testiranja. Razgovorom s trudnicama mora se razjasniti postoje li genetički rizici koje NIPT ne može otkriti (npr. kromosomske translokacije ili monogenske bolesti u obitelji), kao i stanja koja mogu dovesti do lažnih NIPT rezultata visokoga rizika, npr. somatski mozaicizam majke¹²⁶. Isto tako, trudnici se moraju jasno predočiti i ograničenja metode, a to su već prije spomenuta mogućnost lažno pozitivnih, odnosno negativnih rezultata, pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) itd^{127, 128}.

Ograničenja invazivnih metoda

Invazivni postupci prikupljanja uzoraka nose rizik od oštećenja amniona i curenja amnionske tekućine, oštećenja ploda ubodom igle, pobačaja (0,12 % pri amniocentezi, 0,11 % pri postupku biopsije korionskih resica), Rh-senzitizacije trudnice, infekcije¹²⁹⁻¹³¹. Nadalje, glavno ograničenje pribavljanja uzoraka biopsijom korionskih resica jest činjenica da je u otprilike 2 % slučajeva u tkivu posteljice prisutan mozaicizam kojeg nema u tkivu fetusa¹³².

Također, i metode analize uzoraka pribavljenih na ovaj način imaju svoja ograničenja. Npr. rezolucija kariotipizacije je 5-10 Mb, a rezultati znatno ovise o znanju i iskustvu citogenetičara koji pretragu provodi, dok se nalazi ove metode najranije mogu dobiti za četiri dana zbog potrebe kultivacije stanica¹³³. Nadalje, metode FISH i MLPA zahtijevaju točnu indikaciju i sumnju na konkretan genetski poremećaj kako bi se mogla odabrati primjerena sonda za ispitivanje¹³⁴.

Glavni nedostatak CMA jest da ne detektira balansirane translokacije i inverzije. Iako njihova prisutnost najčešće nema kliničku važnost za sam

fetus, mogu biti uzrokom bolesti u sljedećoj generaciji. Triploidiju je moguće detektirati samo uz pomoć SOMA metode, ali ne i aCGH. Poseban problem predstavljaju i slučajni nalazi CNV-ova nepoznata značenja pri interpretaciji rezultata i odluci o daljnjem postupanju¹⁰⁷.

Sekvenciranjem nove generacije ne mogu se detektirati promjene u broju kopija pa ga je potrebno provoditi u kombinaciji s CMA. Nadalje, nije primjerena metoda za dijagnostiku aneuploidija i poliploidija, kao ni translokacija i trinukleotidnih ponavljanja. Vrijeme čekanja rezultata je 2-3 tjedna¹¹⁵.

ZAKLJUČAK

Metode molekularne biologije u medicini svojim su napretkom omogućile određivanje slijeda nukleotida u čitavom genomu čovjeka pa su kao takve našle i kliničku primjenu u dijagnostici genetičkih poremećaja. S otkrićem cfDNA u tjelesnim tekućinama došlo je do razvoja visoko osjetljivih i visoko specifičnih neinvazivnih testova probira na genetičke poremećaje, najviše u onkologiji, no i u prenatalnoj medicini gdje je izgledno da će takva testiranja s vremenom zamijeniti klasične metode probira u nacionalnim zdravstvenim sustavima. Također, čini se da će rasti klinički značaj metoda sekvenciranja cfDNA s ciljem otkrivanja širokog spektra genetskih poremećaja, od aneuploidija do točkastih mutacija sukladno prihvatljivosti njihova učinka i kliničke korisnosti. S druge strane, razvojem metodologije analize cfDNA sekvenciranjem, odnosno povećanjem brojnosti detektabilnih genetičkih promjena, otvara se prostor za sve veću tržišnu entropiju pa je u budućnosti nužno izraditi jasne kliničke smjernice prilikom uvođenja ove metodologije u javnozdravstveni sustav.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Wald NJ. The definition of screening. *J Med Screen* 2001;8:1.
2. Obuchowski NA, Graham RJ, Baker ME, Powell KA. Ten criteria for effective screening: their application to multislice CT screening for pulmonary and colorectal cancers. *AJR Am J Roentgenol* 2001;176:1357-1362.
3. Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu Hrvatskoga liječničkog zbora. Nacionalna stručna preporuka za prena-

- talni probir i dijagnostiku kromosomopatija. *Gynaecol Perinatol* 2010;19:119-126.
4. McCann-Crosby B, Placencia FX, Adeyemi-Fowode O, Dietrich J, Franciskovich R, Gunn S et al. Challenges in Prenatal Treatment with Dexamethasone. *Pediatr Endocrinol Rev* 2018;16:186-193.
 5. Vass CM, Georgsson S, Ulph F, Payne K. Preferences for aspects of antenatal and newborn screening: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* 2019;19:131.
 6. Brajenović-Milić B. Prenatalno testiranje i genetika reprodukcije. In: Turnpenny P, Ellard S (eds). *Emeryeve Osnove Medicinske Genetike*. Zagreb: Medicinska naklada, 2011:325-338.
 7. Cuckle H, Maymon R. Development of prenatal screening – A historical overview. *Semin Perinatol* 2016;40:12-22.
 8. ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin No. 162: Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders. *Obstet Gynecol* 2016;127:108-122.
 9. Durić K. Biokemijski testovi probira fetalnih anomalija. In: Đelmiš J, Orešković S (eds). *Fetalna Medicina i Opstetricija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2014;95-98.
 10. Hixson L, Goel S, Schubert P, Faltas V, Lee J, Narayakkadan A et al. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. *J Lab Autom* 2015;20:562-573.
 11. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 2005;353:2001-2011.
 12. ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007;109:217-227.
 13. Gordon S, Langaker MD. Prenatal Genetic Screening. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Mar 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557702/>.
 14. Samura O. Update on noninvasive prenatal testing: A review based on current worldwide research. *J Obstet Gynaecol Res* 2020;46:1246-1254.
 15. Pös O, Budiš J, Szemes T. Recent trends in prenatal genetic screening and testing. *F1000Res* 2019;8.
 16. Jones TM, Montero FJ. Chorionic Villus Sampling In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 May 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563301/>.
 17. Podobnik M, Podobnik-Brlečić P. Invazivna prenatalna dijagnostika. In: Orešković S, Đelmiš J (eds). *Fetalna Medicina i opstetricija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2014;99-108.
 18. Jindal A, Sharma M, Chaudhary C. Amniocentesis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Apr 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559247/>.
 19. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969;1:1119-1122.
 20. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-243.
 21. Hui L, Maron JL, Gahan PB. Other body fluids as non-invasive sources of cell-free DNA/RNA. In: Gahan, P (ed.). *Circulating nucleic acids in early diagnosis, prognosis and treatment monitoring: An introduction*. New York: Springer, 2015;295-323.
 22. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415-418.
 23. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
 24. Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn* 2020;40:155-163.
 25. Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One* [Internet]. 2011;6. [cited 2021 Apr 15]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025202>.
 26. Giroux S, Badeau M, Jeuken J, Caron A, Girouard J, Rousseau F. Validation of a New Protocol to Collect and Isolate Plasma from Pregnant Women for Noninvasive Prenatal Testing (NIPT). *J Appl Lab Med* 2021;6:743-749.
 27. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002;48:421-427.
 28. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 2016;164:57-68.
 29. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:26-32.
 30. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33:667-674.
 31. Vora NL, Johnson KL, Basu S, Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S, Bianchi DW. A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI. *Prenat Diagn* 2012;32:912-914.
 32. Hui L, Bethune M, Weeks A, Kelley J, Hayes L. Repeated failed non-invasive prenatal testing owing to low cell-free fetal DNA fraction and increased variance in a woman with severe autoimmune disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44:242-243.
 33. Schuring-Blom H, Lichtenbelt K, van Galen K, Elferink M, Weiss M, Vermeesch JR et al. Maternal vitamin B12 deficiency and abnormal cell-free DNA results in pregnancy. *Prenat Diagn* 2016;36:790-793.
 34. Grömminger S, Erkan S, Schöck U, Stangier K, Bonnet J, Schloo R et al. The influence of low molecular weight heparin medication on plasma DNA in pregnant women. *Prenat Diagn* 2015;35:1155-1157.
 35. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem* 2014;60:243-250.
 36. 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 U S A* 2008;105:16266-16271.
 37. Jensen TJ, Kim SK, Zhu Z, Chin C, Gebhard C, Lu T et al. Whole genome bisulfite sequencing of cell-free DNA and

- its cellular contributors uncovers placenta hypomethylated domains. *Genome Biol* 2015;16:78.
38. Wataganara T, Bui TH, Choy KW, Leung TY. Debates on fetal fraction measurement and DNA-based noninvasive prenatal screening: time for standardisation?. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2016;123:31-35.
 39. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 2004;81:638-644.
 40. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:1-9.
 41. Brar H, Wang E, Struble C, Musci TJ, Norton ME. The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:143-145.
 42. Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJW, Sun H et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8583-8588.
 43. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn* 2015;35:810-815.
 44. Hedriana H, Martin K, Saltzman D, Billings P, Demko Z, Benn P. Cell-free DNA fetal fraction in twin gestations in single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening. *Prenat Diagn* 2020;40:179-184.
 45. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;50:302-314.
 46. Brison N, Neofytou M, Dehaspe L, Bayindir B, Van Den Bogaert K, Dardour L et al. Predicting fetoplacental chromosomal mosaicism during non-invasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2018;38:258-266.
 47. Wagner J. Neinvazivno prenatalno testiranje. *Pediatr Croat* 2016;60:46-52.
 48. Grace MR, Hardisty E, Green NS, Davidson E, Stuebe AM, Vora NL. Cell free DNA testing-interpretation of results using an online calculator. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:1-30.
 49. Perinatal Quality Foundation [Internet]. Oklahoma City: NIPT/Cell Free DNA Screening Predictive Value Calculator [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://www.perinatalquality.org/Vendors/NSGC/NIPT/>.
 50. Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy. *N Engl J Med* 2018;379:464-473.
 51. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370:799-808.
 52. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015;372:1589-1597.
 53. Helgeson J, Wardrop J, Boomer T, Almasri E, Paxton WB, Saldivar JS et al. Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2015;35:999-1004.
 54. Guseh SH. Noninvasive prenatal testing: from aneuploidy to single genes. *Hum Genet* 2020;139:1141-1148.
 55. Futch T, Spinosa J, Bhatt S, de Feo E, Rava RP, Sehnert AJ. Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn* 2013;33:569-574.
 56. Bunnell M, Zhang C, Lee C, Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Confined placental mosaicism for 22q11.2 deletion as the etiology for discordant positive NIPT results. *Prenat Diagn* 2017;37:416-419.
 57. Rijnders RJ, 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;98:374-378.
 58. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. Détermination du sexe foetal au cours du premier trimestre de grossesse par analyse du sérum maternel par PCR en temps. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:953-957.
 59. Sayres LC, Cho MK. Cell-free fetal nucleic acid testing: a review of the technology and its applications. *Obstet Gynecol Surv* 2011;66:431-442.
 60. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-1738.
 61. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13:53-57.
 62. 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;42:1079-1085.
 63. Chiu RW, Chan KC, 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 U S A* 2008;105:20458-20463.
 64. 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.
 65. 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.
 66. Pei Y, Hu L, Liu J, Wen L, Luo X, Lu J et al. Efficiency of noninvasive prenatal testing for the detection of fetal microdeletions and microduplications in autosomal chromosomes. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8:1339.
 67. Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, Stosic M, Zimmermann B, Sigurjonsson S et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:1-332.
 68. Rapacchia G, Lapucci C, Pittalis MC, Youssef A, Farina A. The First Case Report in Italy of Di George Syndrome Detected by Noninvasive Prenatal Testing. *Case Rep Obstet Gynecol* 2015;2015:1-3.
 69. NIPT-GenePlanet [Internet]. Zagreb: NIFTY by GenePlanet, c2020 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://nipt-geneplanet.com/hr/>.

70. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:301-302.
71. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, de Alba MR, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946-948.
72. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002;360:998-1000.
73. New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KCA et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1022-1030.
74. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139-151.
75. Jenkins LA, Deans ZC, Lewis C, Allen S. Delivering an accredited non-invasive prenatal diagnosis service for monogenic disorders and recommendations for best practice. *Prenat Diagn* 2018;38:44-51.
76. Ryan A, Baner J, Demko Z, Hill M, Sigurjonsson S, Baird ML et al. Informatics-based, highly accurate, noninvasive prenatal paternity testing. *Genet Med* 2013;15:473-477.
77. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61-91.
78. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA* 2015;314:162-169.
79. Carlson LM, Hardisty E, Coombs CC, Vora NL. Maternal Malignancy Evaluation After Discordant Cell-Free DNA Results. *Obstet Gynecol* 2018;131:464-468.
80. Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, Coe BP, Henson JM, Daza RM et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med* 2015;372:1639-1645.
81. Brison N, Van Den Bogaert K, Dehaspe L, van den Oever JM, Janssens K, Blaumeiser B et al. Accuracy and clinical value of maternal incidental findings during noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Genet Med* 2017;19:306-313.
82. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913-920.
83. Andari MVC, Bussamra SLC, Tedesco TGD, Peixoto PAB, Pares PDBS, Braga A et al. Neinvazivní prenatální testy: jejich přínos a limity. *Ceska Gynekol* 2020;85:41-48.
84. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:15-33.
85. Chesnais V, Ott A, Chaplais E, Gabillard S, Pallares Di, Vauloup-Fellous C et al. Using massively parallel shotgun sequencing of maternal plasmatic cell-free DNA for cytomegalovirus DNA detection during pregnancy: a proof of concept study. *Sci Rep* 2018;8:4321.
86. Wagner J. Primjena slobodne fetalne DNA iz krvi majke za probir aneuploidija: prednosti i ograničenja. *Pediatr Croat* 2015;59:118-124.
87. 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.
88. Samango-Sprouse C, Banjevic M, Ryan A, Sigurjonsson S, Zimmermann B, Hill M et al. SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn* 2013;33:643-649.
89. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211:527.
90. Labcorp [Internet]. Burlington: Testing while expecting-MaterniT 21 Plus, c2022 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.labcorp.com/pregnancy/maternit21-plus>.
91. Illumina [Internet]. San Diego: Verifi and Verifi Plus Prenatal Tests, Inc. c2022 [cited 2021 Jun 26]. Available from: https://www.illumina.com/clinical/illumina_clinical_laboratory/verifi-prenatal-tests.html/.
92. Harmony [Internet]. San Jose: Prenatalni test Harmony, c2016 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://genom.hr/harmony-prenatal-test/>.
93. Natera [Internet]. San Carlos: Panorama NIPT Overview, Inc. c2022 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.natera.com/womens-health/panorama-nipt-prenatal-screening/>.
94. Natera [Internet]. San Carlos: Vistara Single-Gene Disorders Testing Overview, Inc. c2022 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.natera.com/womens-health/vistara-nipt-single-gene-test/>.
95. St George's University Hospitals [Internet]. London: Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) [cited 2021 Jul 9]. Available from: <https://www.stgeorges.nhs.uk/service/maternity-services/your-pregnancy/fetal-medicine-unit/the-safe-test/>.
96. Gadsbøll K, Petersen OB, Gatinois V, Strange H, Jacobsson B, Wapner R et al. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2020;99:722-730.
97. Posey JE, O'Donnell-Luria AH, Chong JX, Harel T, Jhangiani SN, Coban Akdemir ZH et al. Insights into genetics, human biology and disease gleaned from family based genomic studies. *Genet Med* 2019;21:798-812.
98. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell* 2019;177:32-37.
99. Wojcik MH, Reimers R, Poorvu T, Agrawal PB. Genetic diagnosis in the fetus. *J Perinatol* 2020;40:997-1006.
100. Grossman TB, Chasen ST. Abortion for Fetal Genetic Abnormalities: Type of Abnormality and Gestational Age at Diagnosis. *AJP Rep* 2020;10:87-92.
101. Caspersson T, Zech L, Modest EJ. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* 1970;170:762.
102. Spinner NB. Chromosome Banding. *In: Maloy S, Hughes K (eds). Brenner's Encyclopedia of Genetics.* Amsterdam: Elsevier, 2013;546-548.

103. Rinčić M. Molekularna citogenetika nekih neurorazvojnih poremećaja. Zagreb: Medicinski fakultet, 2014. Doktorski rad.
104. Mužinić D, Crkvenac-Gornik K, Tonković-Đurišević I. Prenatalna dijagnostika kromosomopatija. In: Barić I, Stavljenić-Rukavina Ana (eds). Racionalna dijagnostika nasljednih i prirodnih bolesti. Zagreb: Medicinska naklada, 2005.
105. Chromosomal Disorders and Fragile x Syndrome. In: Tsai ACH, Pickler L, Tartaglia N, Hagerman R (eds). Developmental-Behavioral Pediatrics. Amsterdam: Elsevier, 2009;224-234.
106. Genetic Testing Techniques. In: Gomes A, Korf BR (eds). Pediatric Cancer Genetics. Amsterdam: Elsevier, 2018; 47-64.
107. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. Fertil Steril 2018;109:201-212.
108. Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S et al. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. Genome Res 2004; 14:287-295.
109. Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Jänne PA, Chen TH et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res 2004;64:3060-3071.
110. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. N Engl J Med 2012;367: 2175-2184.
111. Redin C, Brand H, Collins RL, Kammin T, Mitchell E, Hodge JC et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. Nat Genet 2017;49:36-45.
112. Bilancia CG, Ganapathi M, Levy B. Prenatal Diagnosis of Chromosome Abnormalities. In: Pandya P, Wapner R, Oepkes D, Sebire N (eds). Fetal Medicine. Amsterdam: Elsevier, 2020;233-246.
113. Schouten J, van Vught P, Galjaard RJ. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies. Methods Mol Biol 2019;1885:161-170.
114. ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. Genet Med 2012;14:759-761.
115. Jelin AC, Vora N. Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. Obstet Gynecol Clin North Am 2018;45:69-81.
116. Verhoef TI, Hill M, Drury S, Mason S, Jenkins L, Morris S et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) for single gene disorders: cost analysis of NIPD and invasive testing pathways. Prenat Diagn 2016;36:636-642.
117. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic 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.
118. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. Hum Reprod Update 2014;20:571-581.
119. Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B et al. The type of fetoplacental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. Prenat Diagn 2015; 35:994-998.
120. Pertile MD, Halks-Miller M, Flowers N, Barbacioru C, Kinnings SL, Vavrek D et al. Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease. Sci Transl Med 2017;9:1240.
121. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol 2015; 45:61-66.
122. Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, Bonnet J et al. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. J Clin Med 2014;3:679-692.
123. Bevilacqua E, Chen K, Wang Y, Doshi J, White K, de Marchin J et al. Cell-free DNA analysis after reduction in multifetal pregnancy. Ultrasound Obstet Gynecol 2020;55: 132-133.
124. Han CS, Platt LD. Noninvasive prenatal testing: need for informed enthusiasm. Am J Obstet Gynecol 2014;211: 577-580.
125. Norton ME, Biggio JR, Kuller JA, Blackwell SC. The role of ultrasound in women who undergo cell-free DNA screening. Am J Obstet Gynecol 2017;216:2-7.
126. Harasim T, Rost I, Klein HG. Current status of non-invasive prenatal testing (NIPT): genetic counseling, dominant methods and overall performance. LaboratoriumsMedizin 2016;40:299-306.
127. Carlson LM, Harris S, Hardisty EE, Hocutt G, Vargo D, Campbell E et al. Use of a novel computerized decision aid for aneuploidy screening: a randomized controlled trial. Genet Med 2019;21:923-929.
128. Mulla BM, Chang OH, Modest AM, Hacker MR, Marchand KF, O'Brien KE. Improving Patient Knowledge of Aneuploidy Testing Using an Educational Video: A Randomized Controlled Trial. Obstet Gynecol 2018;132: 445-452.
129. Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Odibo A, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol 2019; 54:442-451.
130. MayoClinic.org [Internet]. Rochester: Amniocentesis, c1998-2022 [cited 2021 Jun 25]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/amniocentesis/about/pac-20392914/>.
131. MayoClinic.org [Internet]. Rochester: Chorionic villus sampling, c1998-2022 [cited 2021 Jun 25]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/chorionic-villus-sampling/about/pac-20393533>.
132. Kalousek DK, Vekemans M. Confined placental mosaicism. J Med Genet 1996;33:529-533.
133. Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1959;1:711-713.
134. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. Eur J Hum Genet 2007;15:1105-1114.