

# Metode molekularne dijagnostike u prenatalnoj medicini

---

Zaninović, Luca

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:276415>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Luca Zaninović**

**METODE MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE U  
PRENATALNOJ MEDICINI**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Ane Katušić Bojanac i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS KRATICA

**aCGH** (engl. *Array Comparative Genomic Hybridization*) komparativna genomička hibridizacija na mikročipu

**ACMG** (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*) Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku

**cfDNA** (engl. *cell free deoxyribonucleic acid*) slobodna cirkulirajuća deoksiribonukleinska kiselina

**cffDNA** (engl. *cell free fetal deoxyribonucleic acid*) slobodna cirkulirajuća fetalna deoksiribonukleinska kiselina

**CMA** (engl. *chromosomal microarray*) kromosomski mikropostroj

**CNV** (engl. *copy number variation*) varijacija u broju kopija

**CVS** (engl. *chorionic villus sampling*) biopsija korionskih resica

**DNA** (engl. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

**FF** (engl. *fetal fraction*) fetalna frakcija

**FISH** (engl. *Fluorescent in situ Hybridization*) fluorescentna *in situ* hibridizacija

**hCG** humani korionski gonadotropin

**HIV** virus humane imunodeficijencije

**IgG** imunoglobulin G

**ISCN** (engl. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) međunarodni sustav za nomenklaturu kromosoma

**IUGR** (engl. *intrauterine growth restriction*) intrauterino zaostajanje u rastu

**LOD** (engl. *limit of detection*) granica detekcije

**LPO** (engl. *left probe oligonucleotide*) lijeva oligonukleotidna proba

**LMWH** (engl. *low-molecular-weight heparin*) niskomolekularni heparin

**MEM** (engl. *minimum essential medium*) minimalni esencijalni medij

**M-FISH** multipleks- fluorescentna *in situ* hibridizacija

**MLPA** (engl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*) pojačavanja sonde ovisno o multipleksnoj ligaciji

**NGS** (engl. *next-generation sequencing*) sekvenciranje sljedeće generacije

**NIPT** (engl. *noninvasive prenatal testing*) neinvazivno prenatalno testiranje

**NPV** negativna prediktivna vrijednost

**PAPP-A** (engl. *pregnancy-associated plasma protein A*) plazma protein A vezan uz trudnoću

**PCR** (engl. *polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom

**PPV** pozitivna prediktivna vrijednost

**PUBS** (engl. *percutaneous umbilical blood sampling*) perkutano uzorkovanje krvi pupkovine

**Rh** rezus

**RPO** (engl. *right probe oligonucleotide*) desna oligonukleotidna proba

**SKY** (engl. *spectral karyotype*) spektralni kariotip

**s-MPS** (engl. *Shotgun Massively Parallel Sequencing*) masivno paralelno sekvenciranje metodom sačmarice

**SNP** (engl. *single nucleotide polymorphism*) polimorfizam jednog nukleotida

**SOMA** (engl. *SNP Oligonucleotide Microarray Analysis*) mikropostroj analiza polimorfizma jednog nukleotida

**ssDNA** jednolančana deoksiribonukleinska kiselina

**t-MPS** (engl. *Target Massively Parallel Sequencing*) ciljano masivno paralelno sekvenciranje

**VUS** (engl. *variant of unknown significance*) varijanta nepoznata značenja

**WCP** (engl. *whole chromosome painting*) bojenje čitavoga kromosoma

**WES** (engl. *whole exome sequencing*) sekvenciranje čitavog egzoma

**WGS** (engl. *whole genome sequencing*) sekvenciranje čitavog genoma

## Sadržaj

Sadržaj .....	1
SAŽETAK .....	1
SUMMARY .....	2
UVOD .....	1
1. INVAZIVNI POSTUPCI U PRENATALNOJ MEDICINI .....	2
1.1. Amniocenteza .....	3
1.2. Biopsija korionskih resica .....	4
1.3. Kordocenteza .....	4
1.4. Biopsija fetalnih organa i kože .....	5
1.5. Dijagnostička korisnost analize genoma u prenatalnom razdoblju .....	5
2. NEINVAZIVNI POSTUPCI U PRENATALNOJ MEDICINI .....	6
2.1. Temelj neinvazivnog prenatalnog testiranja (NIPT) uporabom cfDNA iz krvi .....	6
2.2. Uzorkovanje i izolacija cfDNA za NIPT .....	7
2.3. Svojstva majčine i fetalne frakcije slobodne cirkulirajuće DNA .....	7
2.4. Dijagnostička korisnost i primjena analize slobodne fetalne DNA .....	9
2.5. Komercijalni NIPT testovi .....	11
3. PRIKAZ MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKIH METODA U PRENATALNOJ MEDICINI .....	13
3.1. Metode analize uzoraka pribavljenih invazivnim postupcima .....	13
3.1.1. Klasična citogenetika .....	13
3.1.2. Molekularna citogenetika .....	14
3.1.3. Kromosomska analiza na mikročipu (CMA) .....	15
3.1.4. MLPA .....	17
3.1.5. Sekvenciranje nove generacije (NGS) .....	19
3.2. Metode analize cfDNA sekvenciranjem u NIPT postupcima .....	22
3.2.1. Masivno paralelno sekvenciranje genoma metodom sačmarice (eng. Shotgun Massively Parallel Sequencing, s-MPS) .....	23
3.2.2. Ciljano sekvenciranje genoma ( eng. Target Massively Parallel Sequencing- t-MPS) .....	23
3.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida (eng. Single nucleotide polymorphism – SNP) .....	24
4. OGRANIČENJA METODA INVAZIVNOG I NEINVAZIVNOG TESTIRANJA .....	24
4.1. Izazovi u metodama invazivnog testiranja .....	24
4.2. Izazovi u metodama prenatalnog neinvazivnog testiranja (NIPT) .....	25
5. ZAKLJUČAK .....	28

6. ZAHVALE.....	29
7. LITERATURA .....	30
8. ŽIVOTOPIS .....	48

# SAŽETAK

## METODE MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE U PRENATALNOJ MEDICINI

Luca Zaninović

Prenatalna medicina u smislu probira genetičkih anomalija fetusa nastala je 60-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 (NGS), prenatalna dijagnostika proširila se s najčešćih aneuploidija na detekciju i brojnih drugih strukturalnih kromosomskih anomalija (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 probirno analizirati genom fetusa putem analize slobodne DNA (engl. cell-free DNA) 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, dočim je u nekim državama EU već uvedeno kao nacionalno podržana probirna metoda za najčešće aneuploidije. Stoga nema sumnje da će neinvazivni probir analizom cfDNA, zajedno uz korištenje modernih tehnologija sekvenciranja zasigurno sve više postati dijagnostički iskoristiv u prenatalnoj medicini. Ipak, problem možda leži u analizi genomskih podataka gdje se katkad detektiraju neobjašnjive 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 meta-analize izložiti koherentan pregled suvremenih metoda molekularne dijagnostike u prenatalnoj medicini, primjenjivih u invazivnim i novijim neinvazivnim postupcima. Budući da se recentno događa porast prevalencije neinvazivnih prenatalnih probira, naglasak rada je na njihovim principima i kliničkim postupcima. 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:** prenatalna dijagnostika, invazivne metode, metode probira, NIPT, citogenetika, sekvenciranje nove generacije, *microarray* analiza, slobodna cirkulirajuća DNA



# **SUMMARY**

## **MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS IN PRENATAL MEDICINE**

Luca Zaninović

Prenatal medicine, in terms of screening for fetal genetic anomalies, originates from the 60s 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 (NGS), prenatal diagnostics has expanded from the most common aneuploidies to the detection of many other structural chromosomal abnormalities (DNA copy number variations, deletions, duplications) as well as monogenic diseases. In addition to the classical invasive techniques (chorionic villus sampling, amniocentesis) that collect cells for cytogenetic and genomic analysis, today it is possible to screen the fetal genome for abnormalities non-invasively by analyzing fetal cell-free DNA isolated from the mother's blood. Given its relatively high accuracy, simplicity and possibility for early application during pregnancy, it is likely that such non-invasive testing will replace conventional first-trimester combined screening using biochemical and fetal ultrasound parameters, while in some EU countries it has already been introduced as a nationally supported screening method for common aneuploidies. Therefore, there is no doubt that non-invasive screening by cfDNA analysis, together with the use of modern sequencing technologies, will certainly become more diagnostically useful in prenatal medicine, yet the problem may lie in genomic data analysis where unexplained changes in nucleotide sequence are sometimes detected, with unknown clinical significance, and there is no clearly defined procedure for clinical action after receiving such data. The aim of this review paper is to present a coherent overview of modern methods of molecular diagnostics in prenatal medicine, applicable in invasive and recent non-invasive procedures, from various sources, clinical data, review articles, and meta-analysis. Since the prevalence of noninvasive prenatal screenings has been expanding recently, the emphasis of the work lies on their principles and clinical procedures. The advantages and disadvantages of using genomic 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:** prenatal diagnostics, invasive methods, screening methods, NIPT, cytogenetics, new generation sequencing, microarray analysis, cell free DNA

## UVOD

Probir (engl. *screening*) je dijagnostički 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 dijagnoze (1). Preduvjeti da bi neka bolest uopće bila primjerena za provedbu probira jesu da je detektabilna 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 provediv (2).

Kada se govori o antenatalnom probiru u prvom se redu misli na ultrazvučni i biokemijski probir koji se nude svim trudnicama u Hrvatskoj (3) dok u novije vrijeme u sve širu primjenu ulazi i metoda neinvazivnog probira (engl. *non-invasive prenatal testing*, NIPT) analizom genoma iz krvi majke. Specifičnosti antenatalnog probira jesu da je pacijent zapravo majka fetusa prije 22. tjedna trudnoće pa je u slučaju dijagnoze bolesti osim ranog liječenja (npr. kongenitalne adrenalne hiperplazije (4)) moguća i terminacija trudnoće ukoliko se radi o poremećaju nespojivom sa životom ili onome koji bi iznimno ugrožavao kvalitetu života novorođenčeta. 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 trudnoće (5).

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 tj. novorođenčeta. U isto vrijeme počela se razvijati i fetalna ultrasonografija koja je omogućila antenatalni uvid u potencijalne anatomske anomalije (6). Prvi probirni testovi bili su orijentirani ka otkrivanju anomalija zatvaranja neuralne cijevi (7) i Downova sindroma (8), dočim je danas pri određenim indikacijama moguć probir i na brojne druge genetske poremećaje.

U aktualnoj kliničkoj praksi, kao probirni test prvog tromjesečja najzastupljeniji je tzv. kombinirani probir koji uključuje ultrazvučni parametar debljine nuhalnog nabora fetusa te kao biokemijske parametre PAPP-A i slobodne podjedinice beta-hCG-a u serumu majke (9,10). U drugom trimestru moguće je provođenje trostrukog i četverostrukog biokemijskog probira.

Trostruki u obzir uzima razine alfa-fetoproteina, hCG-a i nekonjugiranog estriola, a četverostruki još i inhibina A. Integrirani probir jest probir u 1. i 2. tromjesečju u iste trudnice (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 uvrštavaju u formulu koja sadržava populacijske parametre i koeficijente korelacije. Unosi se i modifikacija prema dobi trudnice. Konačan rezultat zapisan je u obliku omjera tj. vjerojatnosti da fetus boluje od određenog genetičkog, najčešće Down sindroma. Ako je omjer manji od 1:270, smatra se urednim nalazom, ako je veći, trudnica se upućuje dalje na invazivnu prenatalnu dijagnostiku. Kao granična vrijednost uzeta je 1:270 jer je to rizik od komplikacija pri postupku amniocenteze (12). Kombinirani probir dakle ne uključuje analizu genoma, koja zahtijeva zapravo 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 slobodne fetalne DNA (engl. *cell-free fetal DNA*, cffDNA) (13). Komercijalni testovi koji koriste ovu metodu prvi su puta 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 testova (14). U nekim državama, primjerice Nizozemskoj, NIPT je postao standardna metoda probira kod svih trudnica (15).

Cilj ovog preglednog rada je iz različitih izvora, kliničkih podataka, preglednih članaka, te meta-analize izložiti koherentan pregled metoda molekularne dijagnostike u prenatalnoj medicini, invazivnih i novijih neinvazivnih, od njihove povijesne uporabe do danas. 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.

## **1. INVAZIVNI POSTUPCI U PRENATALNOJ MEDICINI**

Ako klasični kombinirani ili dolje opisani 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. Indikacije za primjenu ovih metoda jesu dob trudnice viša od 37 godina, kromosopatije i genetske bolesti u obitelji, strukturne i numeričke aberacije kromosoma roditelja, abnormalnosti otkrivene ultrazvukom, rezultat visokog rizika na testovima probira, konsangvinitet, infekcija i iradijacija majke u ranoj trudnoći, itd. Nakon svih metoda invazivne prenatalne dijagnostike kod RhD negativnih trudnica obavezna je profilaktička primjena anti-D IgG-a. Relativne kontraindikacije za sve metode jesu terapija heparinom i kod majke aktivne infektivne bolesti koje se prenose krvlju npr. HIV, hepatitis (16).

Ultrazvučno navođene tehnike uzorkovanja materijala koje su u današnje vrijeme u kliničkoj uporabi jesu: amniocenteza, biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villous sampling*, CVS), biopsija posteljice, kordocenteza te biopsije fetalnih organa i kože. Nakon uzorkovanja, provodi se jedna od metoda navedenih u poglavlju „Prikaz molekularno-dijagnostičkih metoda u prenatalnoj medicini“.

### 1.1. Amniocenteza

Amniocenteza je najprimjenjivana metoda invazivne prenatalne dijagnostike. Najčešće se radi između 15. i 18. tjedna trudnoće, a rezultati pretrage dobivaju se za 2-3 tjedna zbog dugog vremena kultivacije amniocita. Etički gledano, ako se dokaže anomalija fetusa i trudnica se odluči za prekid trudnoće, termin zahvata vrlo je blizu granice između terminacije i poroda. Postoji i mogućnost rane amniocenteze između 12. i 14. tjedna, kojom se i rezultati dobivaju brže, već za 7-10 dana zbog većeg broja i vijabilnosti fetalnih stanica, ali je pri tom postupku povećan rizik od spontanih pobačaja (1-3% naspram 0,5-1%) (17). Zahvat se danas redovito izvodi pod kontrolom ultrazvuka, slobodnom rukom ili vođenom iglom. Koriste se spinalne igle kalibra 20 ili 22. Ovisno o testu koji se namjerava provesti prikuplja se 20 ml amnijske tekućine za kariotipizaciju i 2-5 ml za testiranje enzimatskih deficijencija (18). Moguća je primjena i pri blizanačkim trudnoćama kada se rade dvije punkcije. Prilikom prve u amnijsku vreću jednog od blizanaca injicira se 1-3 ml indigo karmina kako se ne bi dogodilo da se dva puta uzorkuje materijal istog blizanca (17). Kao i kod svih drugih invazivnih metoda, nakon zahvata, RhD-negativnim trudnicama nužno je profilaktički dati anti-D IgG. Moguće komplikacije su pobačaj, fetomaternalna hemoragija, curenje amnijske tekućine, infekcija (18).

## 1.2. Biopsija korionskih resica

Biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villous sampling*, CVS), metoda je koja se koristi između 10. i 12. tjedna trudnoće. Zahvat je moguće obaviti na dva načina: transcervikalno i transabdominalno. Ako se izvodi transcervikalno, mora se prethodno utvrditi da nema abnormalnosti u mikrobiološkoj flori i citološkom razmazu rodnice. Neposredno prije uzorkovanja, rodnica se sterilizira te se kateter pod navođenjem ultrazvuka provede transcervikalno, a zatim do sredine korionskog tkiva. Aspirira se 10-20 ml tkiva u štrcaljku s transportnim medijem koji sadrži MEM, antibiotik i heparin. Ako se zahvat izvodi transabdominalnim putem, trbušna se stijenka dezinficira te se također pod kontrolom ultrazvuka spinalna igla tehnikom slobodne ruke uvodi u korionsko tkivo koje se aspirira i stavlja u prije spomenuti medij (17). Biopsija posteljice (placentocenteza ili kasni CVS) uzorkovanje je posteljičnog tkiva nakon 12. tjedna trudnoće. Izvodi se mnogo rjeđe zbog problema pri kariotipizaciji posteljičnog tkiva u drugom i trećem tromjesečju (17).

Rizik od spontanog pobačaja nakon CVS-a je 0,5-1%, nešto viši pri metodi koja koristi transcervikalni pristup pa se on primjenjuje uglavnom samo kod slučajeva stražnjeg i niskog sijela posteljice. Transabdominalni pristup preferira se pri blizanačkim trudnoćama (17). Ostale moguće komplikacije jesu: krvarenje, ruptura membrana, infekcija. Kod CVS-a obavljenih prije 10. tjedna trudnoće, primijećen je povećan rizik od abnormalnosti udova, mikrognatije i mikroglosije. Rizik malformacije udova je 1:1000 naspram 1,8:10 000 u općoj populaciji (17).

U 1-2% slučajeva analizom materijala uvidi se placentarni mozaicizam (19). Sam fetus zaista je mozaičan samo u 10% ovakvih slučajeva, međutim, mozaicizam placente indikativan je za IUGR i razvoj preeklampsije kod majke pa svaki ovakav rezultat zahtijeva kontrolnu amniocentezu u 15. tjednu trudnoće (16,20).

## 1.3. Kordocenteza

Kordocenteza ili perkutana aspiracija krvi pupkovine (PUBS) metoda je koja se danas rijetko koristi. Moguće ju je provesti od 12. tjedna, a najčešće se vrši nakon 20. tjedna trudnoće jer je tada učestalost komplikacija puno manja (spontani pobačaj u 1-2,5% slučajeva). Indikacije za kordocentezu kao metodu dokazivanja genetskih poremećaja jesu inkonkluzivni nalazi CVS-a i amniocenteze. Puno se češće ova metoda koristi za dokazivanje hematoloških

bolesti, poremećaja koagulacije, kongenitalnih infekcija, imunodeficientnih sindroma, određivanje acido-baznog statusa fetusa, primjenu terapije (transfuzija, farmakoterapija), selektivni fetocid kalijevim kloridom (17).

Zahvat se izvodi u lokalnoj anesteziji trudnice nakon sterilizacije polja. Pod kontrolom ultrazvuka uvodi se spinalna igla metodom slobodne ruke. Mjesto pristupa na pupkovinu idealno je 1-2 cm od placentarne insercije. Uštrcavanjem 0,2 ml fiziološke te ultrazvučnim praćenjem pojave turbulencije utvrđuje se radi li se o veni ili arteriji. Aspirira se 2-3 ml krvi. Najčešće komplikacije zahvata su fetalna bradikardija ili asistolija, prsnuće vodenjaka, infekcija, krvarenje iz pupkovine, tromboza ili hematoma pupkovine (17,21).

#### 1.4. Biopsija fetalnih organa i kože

Biopsija fetalnih organa i kože zastarjela je metoda koja se ranije najčešće koristila za patohistološko dokazivanje nasljednih kožnih bolesti npr. ektodermalne displazije (22), epidermolitičke hiperkeratoze (23), harlekinske ihtioze(24), Sjogren-Larsson sindroma (25). Značenje je izgubila s otkrićem genetske podloge ovih bolesti te identifikacijom mutacija koje ih uzrokuju koje se lako mogu dokazati molekularnim tehnikama na uzorcima pribavljenima CVS-om i amniocentezom (26).

#### 1.5. Dijagnostička korisnost analize genoma u prenatalnom razdoblju

Napredak genetike i tehnologije analize genoma omogućio je molekularnu dijagnostiku mnogih bolesti (27,28). Ovo je posebno važno u prenatalnom periodu kada je dijagnostika zasnovana isključivo na analizi fenotipa ograničena na prikaz ultrazvukom i magnetskom rezonancijom (29). Otprilike 1 na 150 živorođene djece ima kromosomsku abnormalnost koja se prezentira fenotipski (30).

Dijagnoza u fetalnom razdoblju može biti od iznimne važnosti ukoliko je liječenje moguće započeti antenatalno (npr. kongenitalna adrenalna hiperplazija(31)) ili odmah po porođaju. Također, ukoliko je u nekoj obitelji poznat povećan rizik za razvoj metaboličkih bolesti koju je moguće držati pod kontrolom restriktivnim tipom prehrane, kao što je na primjer nedostatak enzima ornitin-transkarbamilaze, poremećaj je moguće isključiti prenatalno te novorođenče

poštedjeti bespotrebne primjene parenteralne prehrane dok se čekaju rezultati genetske analize (29).

Prenatalno testiranje ključno je pri odluci o terminaciji trudnoće s obzirom da brojne bolesti koje znatno narušavaju kvalitetu života novorođenčeta nemaju fenotipskih obilježja detektabilnih ultrazvukom (32).

## **2. NEINVAZIVNI POSTUPCI U PRENATALNOJ MEDICINI**

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 genetska analiza slobodne fetalne DNA iz krvi trudnice (14), a uvriježen naziv za takvu vrstu analize je – neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT).

### **2.1. 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 podrijetla (33). 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 puta detektirali cirkulirajuće nukleinske kiseline u krvnom serumu pacijenata oboljelih od raka (34). Utvrđeno je da su to zapravo kratki fragmenti DNA veličine do 200 parova baza koji predstavljaju DNA bilo koje stanice koja prolazi kroz proces apoptoze ili nekroze te se razgradni materijal „umiruće“ stanice otpušta u intersticij i preko tkivnih krvnih žila dopijeva u cirkulaciju (35).

Analiza slobodne DNA iz krvi ponajviše je kliničku primjenu našla u onkologiji, gdje se metodom neinvazivne tzv. tekuće biopsije (engl. *liquid biopsy*) u krvi potvrđuje mutirana slobodna DNA malignih stanica, no nakon što je dokazano da se u izoliranom krvnom serumu trudnica mogu pronaći fragmenti slobodne fetalne DNA (36), Lo i suradnici su već 1997. godine pomoću analize fetalne DNA iz krvi majke utvrdili muški spol fetusa analizom gena Y kromosoma (37) te je zadnjih godina još brži rast primjene analize cfDNA iz krvi upravo primijećen u prenatalnoj medicini (38).

## 2.2. Uzorkovanje i izolacija cfDNA za NIPT

NIPT se temelji na detekciji promjena u relativno malom udjelu analizirane DNA. Upravo zbog toga, nužno je održati što veću fetalnu frakciju u prikupljenoj venskoj krvi majke ponajprije sprječavajući lizu leukocita u uzorku, što se radi na više načina (39). Periferna venska krv prikuplja se u K<sub>2</sub>EDTA Gel epruvete za molekularnu dijagnostiku (8 ml) ili u Streck epruvetu (10 ml). Obje se zatim centrifugiraju na 1600xg kroz 10 min unutar 6 sati od uzorkovanja nakon čega se 1 ml plazme izdvaja automatskim pipetom. Plazmu je zatim moguće profiltrirati kroz filter veličine pora 0,45 µm ili dodatno centrifugirati još 10 minuta na 16 000xg. cfDNA izdvaja se iz 3 ml uzorka plazme kitovima za cirkulirajuće nukleinske kiseline (40).

## 2.3. Svojstva majčine i fetalne frakcije slobodne cirkulirajuće DNA

Slobodni cirkulirajući fragmenti DNA (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 nuklearne DNA (36,38). Fetalna cfDNA podrijetlom je iz trofoblasta posteljice (36), a majčina cfDNA potječe od stanica svih organa od kojih je ipak najzastupljeniji hematopoetski sustav (41,42) zbog lokacije stanica, njihova brzog obrtaja i direktnog otpuštanja razgradnih produkata u plazmu.

U NIPT metodi važno je razlikovati i procijeniti udio majčine, odnosno fetalne frakcije cfDNA. Fetalna frakcija (FF) predstavlja udio cfDNA fetalnog podrijetla u ukupnoj cfDNA u majčinoj plazmi (zbroj 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 7,8-



13% (43). Iznimno je važno odrediti razinu fetalne frakciju u uzorku jer o njoj ovisi statistička pouzdanost rezultata i kontrola kvalitete pretrage (44). Minimalna FF potrebna za provedbu NIPT-a ovisi o molekularnoj metodi kojom se test provodi, a najčešće iznosi 2-4%. S porastom FF, 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*“)(38).

FF ovisi o mnogo bioloških faktora, 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 cfDNA (45). Također, udio majčine cfDNA povećan je za vrijeme bilo kakvog upalnog procesa u majčinom tijelu, posebno u slučaju autoimunih bolesti (46) i nedostatka vitamina B12 (47). Primijećeno je i da žene na terapiji LMWH imaju manju FF pa se preporučuje uzorkovanje neposredno prije iduće doze heparina (48). Naravno, 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 smanjena (49).

Fetalna frakcija rutinski se određuje u svim laboratorijima prilikom provođenja NIPT-a, a temelji se na brojnim različitostima između fetalne i majčine cfDNA. Fragmenti podrijetla placente kraći su, različito metilirani i imaju drugačiji nukleosomalni utisak (engl. *footprint*), razlikuju se od majčinih po SNP-ovima, a cfDNA muškog fetusa sadrži Y kromosom (50,51). Rezultati su nažalost često neusporedivi jer ovise o primijenjenoj metodi za kvantifikaciju (52).

Pet je glavnih metoda mjerenja FF koje se danas koriste u komercijalnim DNA laboratorijima (52). Određivanje FF koristeći brojenje DNA fragmenata specifičnih za Y kromosom (npr. DYS-1, DYS-14) moguće je samo u slučajevima kada majka nosi muški fetus (53). Metoda bisulfitnog sekvenciranja razlikuje fetalnu od majčine DNA na temelju obrazaca metilacije. Pri njenom korištenju moguće su tehničke greške u slučaju hipometilacije DNA placente ili varijabilno metilirane DNA majčina bubrega, jetre i endotela (51). Najtočnijim se smatra određivanje koristeći omjere SNP-ova na kromosomima koji nikad nisu monosomični niti trisomični u vijabilnoj trudnoći (54,55). Jedna od mogućnosti je i masivno paralelno sekvenciranje praćeno kapilarnom elektroforezom koja fragmente razdvaja po veličini (56). Druga varijanta razdvajanja fragmenata po veličini je i „*sequence read approach*“ (SeqFF) (57).

Podešavanje granične prihvatljive vrijednosti fetalne frakcije kompromis je između statističke pouzdanosti rezultata i „no call“ ishoda pretrage. Ostaje otvoreno pitanje treba li se kliničarima uz rezultate testa priložiti i vrijednost FF čime bi im se omogućila kvalitetnija interpretacija nalaza (38).

U blizanačkim trudnoćama ukupna FF je povišena, međutim FF po fetusu 32% je manja (58). 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 nemogućnost očitavanja testa zbog premale FF (59). 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 oba blizanca, a upola manja vrijednost trisomične u odnosu na FF sugerira da je trisomija kromosoma prisutna samo kod jednog od blizanaca (60).

#### 2.4. Dijagnostička korisnost i primjena analize slobodne fetalne DNA

Prednosti i korisnost metode analize cfDNA kao alata neinvazivnog prenatalnog testiranja prikazane su u *Tablici 1*.

Uspjeh neinvazivnog testiranja, odnosno analize fetalne cfDNA, temelji se prvenstveno na neinvazivnosti postupka jer se za analizu cfDNA uzima periferna venska krv majke (40) čime se ni na koji način ne ugrožavaju niti ona niti plod. Osim toga, bazira se i na svojoj ranoj mogućnosti primjene već od 9. tjedna trudnoće nadalje što je ipak ranije nego prilikom biokemijskog probira i invazivnih tehnika. Također, pozitivna prediktivna vrijednost NIPT testa (PPV) 10 je puta veća nego ona tradicionalnog biokemijskog probira (61,62). Razvijeni su i online kalkulatori koji nakon što se odabere dijagnosticirana patološka promjena i dob majke izračunavaju osjetljivost, specifičnost, PPV i NPV testa (63,64). Ta prednost prepoznata je mahom od strane visokorizične populacije trudnica (npr. dob majke >35 godina, oplodnja „in vitro“, višestruki pobačaji, itd.), 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 sindrom Down 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*) učestalost detekcije CNV-ova ne ovisi o dobi majke, ali je zbog općenito niske prevalencije u populaciji te pojave

placentarnog mozaicizma u 1-2% trudnoća, PPV za ovu analizu jako niska. Također, za detekciju mikrolelecija, analiza cfDNA SNP metodom dostiže PPV od svega 50% (65,66).

Jedna od prvih primjena analize cfDNA bilo je neinvazivno određivanje spola fetusa (67) za čije je određivanje postojala potreba kada je majka nositeljica X-vezanih bolesti od kojih mogu oboljeti njeni muški potomci npr. Duchenneove mišićne distrofije, hemofilije, sindroma fragilnog X kromosoma, Alportova sindroma, itd. (68). CffDNA analiza pokazala se korisnim pravovremenim alatom za dijagnozu te intrauterino liječenje kongenitalne adrenalne hiperplazije (31), a moguće je otkriti i Rh-D status fetusa (69) te time minimizirati bespotrebnu profilaktičku imunizaciju Rh negativnih majki anti-D imunoglobulinima (70).

Otkriće masivnog paralelnog sekvenciranja i razvoj bioinformatike omogućili su otkrivanje aneuploidija (71) što je danas i najčešća značajka NIPT analiza cfDNA. Rutinski se analiziraju trisomije 21 (Down), 18 (Edwards) i 13 (Patau sindrom) te promjene u broju spolnih kromosoma. Najviša je točnost detekcije sindroma Down (PPV detekcije 99,5%) zbog više FF povezane s ovim sindromom dok je ona u slučaju sindroma Edwards i Patau smanjena pa je i točnost detekcije istih manja ( PPV detekcije 99% za Edwards i 79-92% za Patau sindrom) (59,72,73). Sve je češća i dijagnostika mikrolelecija i mikroduplikacija iako je nakon potvrde *microarray* analizom dokazana PPV detekcije CNV-ova NIPT metodom od svega 14,89%(74). Komercijalno je dostupna detekcija mikrolelecijskih i mikroduplikacijskih sindroma DiGeorge, 1p36, Cri-du-Chat, Prader- Willi/ Angelman (75,76), sindrom neosjetljivosti na androgene, Bannayan-Riley-Ruvalcaba sindrom, Melnick-Fraser sindrom, 10q22.3–q23.31 mikroleleciju, Cornelia de Lange sindrom, Cowden sindrom, Dandy-Walker sindrom, distalnu artrogripozu tip 2B, Dyggve-Melchior-Clausen sindrom, Feingold sindrom, Langer-Giedion sindrom, mikroleleciju 11q14.2–q14.3, X-vezani panhipopituitarizam, Potocki-Lupski sindrom (17p11.2 duplikacija), Saethre-Chotzen sindrom, Smith-Magenis sindrom (77).

U posljednje vrijeme velik je napredak postignut u neinvazivnom testiranju monogenih bolesti poput miotonične distrofije (78), cistične fibroze (79), beta talasemije major (80), kongenitalne adrenalne hiperplazije (81). U početku je bila moguća samo klinička dijagnostika autosomno dominantno naslijeđenih bolesti od oca ili nastalih *de novo* budući da je razlikovanje identičnih alela majke i fetusa u plazmi kompleksno (82). Za neinvazivnu dijagnostiku autosomno recesivnih i X-vezanih bolesti nužan je bio razvoj sekvenciranja nove generacije i digitalnog PCR-a 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*) (83).

Osim toga, moguća je klinička uporaba ovakvog testiranja u forenzici gdje je dokazana osjetljivost metode analize cfDNA u određivanju očinstva od 99% (84).

Jedna od mogućnosti u budućnosti jest i sekvenciranje čitavog genoma (engl. *whole genome sequencing*) fetusa iz fragmenata cfDNA zahvaljujući tome što su svi dijelovi genoma zastupljeni u majčinoj plazmi u stalnim relativnim omjerima. Prvi put ovakva analiza izvedena je 2010. (85). 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 malignomima (86,87).

**Tablica 1.** Prednosti analize fetalne cfDNA u NIPT postupku

<b>Prednosti analize fetalne cfDNA neinvazivnim postupkom</b>	<b>Reference</b>
Neinvazivnost metode, neškodljivost za majku i dijete	(88)
Mogućnost provođenja testiranja u svim stadijima trudnoće nakon 9. tjedna	(88)
Visoka osjetljivost i pozitivna prediktivna vrijednost testa u detekciji aneuploidija u populaciji visokoga rizika	(59,89)
Neinvazivno određivanje spola i RhD statusa djeteta	(67,90)
Mogućnost otkrivanja mutacija naslijeđenih od oca i <i>de novo</i> mutacija	(89)
Mogućnost isključivanja očinstva s točnošću preko 99%	(91)
Mogućnost dijagnostike okultnog malignoma majke	(86,92,93)

## 2.5. Komercijalni NIPT testovi

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

NIFTY test firme BGI analizira uzorke cfDNA s-MPS metodom. Omogućuje detekciju trisomija 9, 13, 16, 18, 21, 22, aneuploidija spolnih kromosoma te 60 mikrodelecijskih i

mikroduplicacijskih sindroma (77). Na istom principu rade i testovi MaterniT21 (Sequenom)(94) i Verifi (Illumina) (95).

Harmony test tvrtke Ariosa temelji se na metodama t-MPS i microarray. Također nudi dijagnostiku osnovnih trisomija (13,18,21), aneuploidija spolnih kromosoma i mikrodelecijjskih sindroma (96).

Na niže opisanoj SNP metodi analize uzoraka (poglavlje 3.2.3.) zasniva se Naterin test Panorama. Njime je moguće dijagnosticirati trisomiju kromosoma 13, 18 i 21, abnormalnosti spolnih kromosoma te pet mikrodelecijjskih sindroma (22q11.2 delecijjski sindrom, Prader-Willijev, Angelmanov, 1p36 delecijjski sindrom i Cri-du-chat). Jedino SNP metodom moguća je i detekcija triploidije te razlikovanje majčinog i fetalnog genoma (97).

Natera također nudi i Vistara test za 25 monogenских bolesti. Neke od njih su ahondroplazija (FGFR3), sindrom Alagille (JAG1), Apertov sindrom (FGFR2), CHARGE sindrom (CHD7), Rettov sindrom (MECP2) (98).

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 sklopu nacionalnog programa probira, no uglavnom kao sekundarni test probira kao alternativa invazivnom testiranju trudnica klasificiranih kao visokog rizika temeljem kombiniranog probira (99,100). U većini država zapravo ne postoji zakonom regulirani sustavni probirni program pa se tu NIPT primjenjuje samo kao kontingentni pregled. To znači da su značajke, razvoj i učinkovitosti pojedinih NIPT testova pod kontrolom samog komercijalnog proizvođača i često im nedostaje validativna studija. Mogući problemi koji proizlaze iz navedenog su opservacije da se NIPT testiranja provode potpuno neselektivno, bez procjene potrebe za istim, te pre i post genetičkog savjetovanja.

### 3. PRIKAZ MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKIH METODA U PRENATALNOJ MEDICINI

#### 3.1. Metode analize uzoraka pribavljenih invazivnim postupcima

Materijal pribavljen invazivnim postupcima može se podvrgnuti svim molekularnim dijagnostičkim tehnikama kao i tkiva koja se koriste pri postnatalnoj genetičkoj dijagnostici. Najčešće se tu radi o klasičnoj i molekularnoj citogenetici u svrhu otkrivanja aneuploidija i strukturalnih promjena kromosoma, a u novije vrijeme zamjenjuje ih kromosomska *microarray* analiza koja ima širi dijapazon primjene jer obuhvaća i *array* komparativnu genomičku hibridizaciju (aCGH) i *Single Nucleotide Polymorphisms Microarray* analizu (SOMA). Također, moguća je analiza uzoraka MLPA metodom te svim vrstama sekvenciranja genoma.

##### 3.1.1. Klasična citogenetika

Citogenetika je grana genetike koja proučava morfologiju i ponašanje kromosoma za vrijeme diobe. Klasična citogenetika podrazumijeva kariotipizaciju koja je kao najstarija metoda genetske dijagnostike ušla je u kliničku primjenu 70-ih godina prošloga stoljeća otkrićem tehnike pruganja (engl. *banding*) kromosoma (101). Danas se rutinski primjenjuje tehnika pruganja Giemsa bojom i tripsinom (G-banding) (102). Ovom tehnikom tamnije se boje područja bogata adeninom i timinom. Dostupne su još i metode pruganja kvinakrinom (Q-banding), R-pruge tj. reverzno bojenje od onoga pri G-pruganju i C-pruganje također Giemsa bojom, ali nakon hidrolize preparata natrijevim hidroksidom (103). Ovime se formira 500-900 pruga po genomu što znači da je rezolucija ove dijagnostičke metode 5-7,5 Mb (104).

Na tkivima prikupljenim CVS-om kariotipizacija se zbog visokog mitotskog indeksa može primjenjivati direktno ili nakon 24-satnog kultiviranja. Na materijalu prikupljenom amniocentezom, analiza se provodi isključivo nakon dugotrajne kulture stanica.

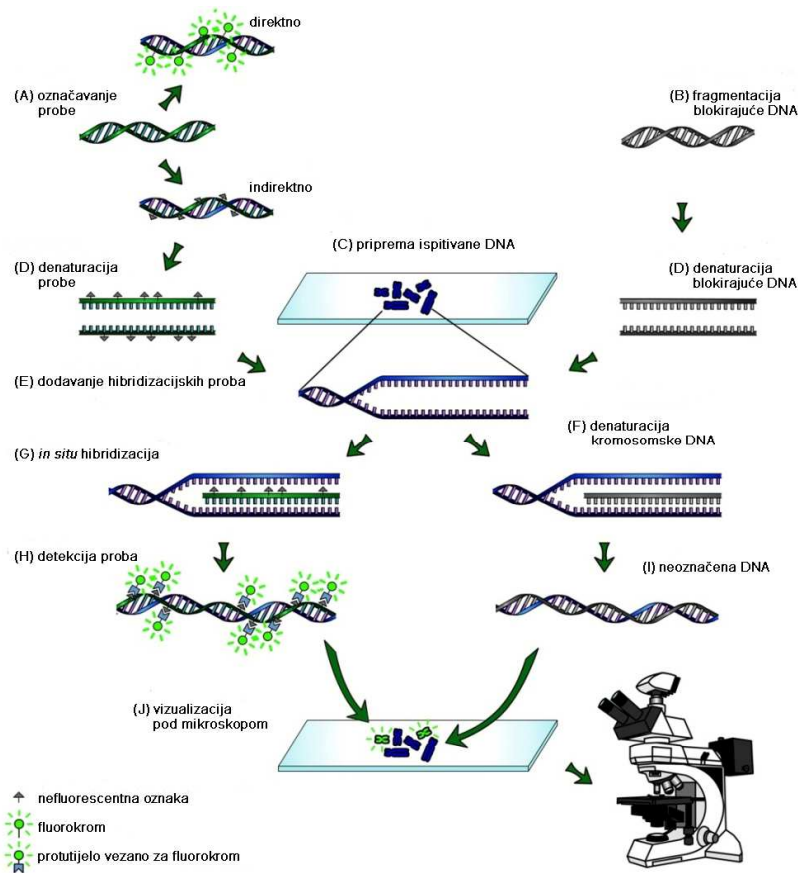
Materijali prikupljeni invazivnim metodama kultiviraju se u laboratoriju u strogo sterilnim uvjetima u posebnim medijima (AmnioMAX-II complete ili Amniomed Plus) na 37°C. Povremeno se uz pomoć invertnog mikroskopa kontrolira rast staničnih kolonija. Pri eksponencijalnoj fazi rasta, kulturama se dodaju metotreksat i timidin koji dovode do

sinkronizacije staničnog ciklusa, a zatim u prometafazi kolhicin koji zaustavlja stanični rast. Zatim se hipotoničnim otopinama kalijeva klorida povećava volumen stanice i omogućuje da se kromosomi rašire i postanu vidljivi. Sve se konačno fiksira kombinacijom metanola i octene kiseline. Dobiveni materijal prebacuje se na predmetna stakalca, boji (najčešće tripsinom i Giemsa bojom) te promatra pod svjetlosnim mikroskopom. Dobivena slika uspoređuje se s ISCN idiogramom (*International System for Chromosome Nomenclature*) - shematskim prikazom humanih kromosoma. Ovaj postupak još uvijek nije automatiziran i uvelike ovisi o znanju i iskustvu citogenetičara koji ga provodi (103).

Kariotipizacija u prvom redu služi za dijagnostiku najčešćih trisomija (Down, Patau, Edwards sindrom) te promjena u broju spolnih kromosoma (X0, XXY, XYY). Ipak može otkriti i ostale aneuploidije i poliploidije te velike strukturne aberacije (veće od 5-7,5Mb): delecije, duplikacije, insercije, balansirane i nebalansirane translokacije.

### 3.1.2. Molekularna citogenetika

Molekularna citogenetika odnosi se ponajprije na fluorescentnu „*in situ*“ hibridizaciju (FISH) (104). Radi se o metodi pri kojoj se jednolančana umjetno proizvedena DNA proba, koja je zapravo kopija dijela DNA koji sadrži gen od interesa, obilježava fluorescentnom bojom i hibridizira s denaturiranom DNA uzorka. Rezultat se promatra pod fluorescentnim mikroskopom (105). Postoje lokus-specifične, telomerne, centromerne probe kao i mogućnost bojenja čitavog kromosoma (engl. *whole chromosome painting*, WCP) ili samo njegovog dijela (engl. *partial chromosome painting*, PCP) (104). Danas se često primjenjuju i metode spektralnog kariotipiziranja (SKY) i multiplex-FISH-a (M-FISH) koje omogućuju simultani prikaz svakog para kromosoma u različitoj boji (106) koristeći smjesu proba (po jedna boja za svaki kromosom). Ovom tehnikom moguće je detektirati kompleksne translokacije među kromosomima (107). FISH metodom moguće je analizirati metafazne i interfazne kromosome. Koristi se za brzo dokazivanje trisomija, triploidija i poremećaja u broju spolnih kromosoma na još nekultiviranim uzorcima stanica (104). Također, moguće je dokazivanje delecija, duplikacija i translokacija fragmenata veličine 100-200 Kb. Rezultati su gotovi u roku od 2 do 3 dana (108). Ograničenje ove metode leži u činjenici da je odabir proba za korištenje najčešće određen unaprijed uočenim fenotipskim anomalijama fetusa ili inkonkluzivnim rezultatima klasične kariotipizacije. Moguće je istovremeno korištenje više proba, međutim, broj je ograničen brojem komercijalno dostupnih različitih fluorofora (109).



**Slika 1.** Shematski prikaz FISH metode. Preuzeto i prilagođeno prema: Patussi et al., Figure 1 (110)

### 3.1.3. Kromosomska analiza na mikročipu (CMA)

Kromosomska analiza na mikročipu (engl. *Chromosomal Microarray Analysis, CMA*) obuhvaća komparativnu genomsku hibridizaciju na mikročipu (engl. *Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*) i analizu polimorfizma jednog nukleotida na mikročipu (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms Microarray, SOMA*). Obje metode prvenstveno se koriste za otkrivanje submikroskopskih promjena DNA (mikrodelecija i mikroduplikacija) (111).

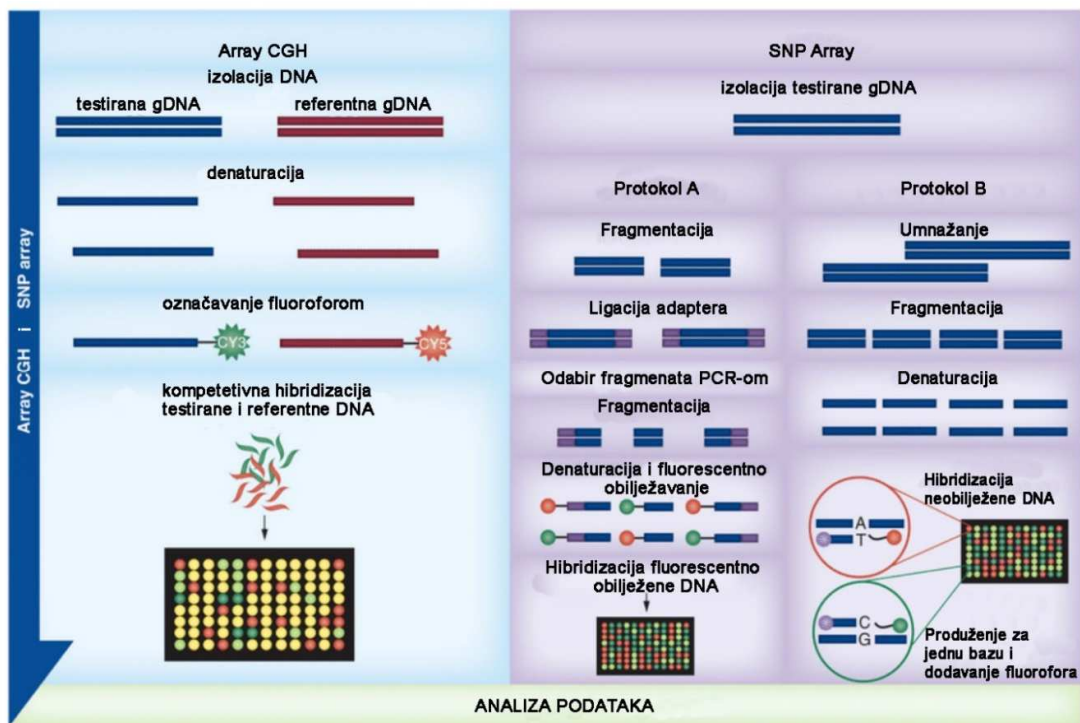
Metodom komparativne genomske hibridizacije (aCGH) uspoređuje se DNA pacijenta s kontrolnim uzorkom normalne DNA kako bi se prepoznale regije koje su više ili manje zastupljene u uzorku pacijenta nego u referentnom (112). Oba uzorka DNA prvo se fragmentiraju te zatim boje različitim fluorescentnim bojama (najčešće zelenom i crvenom) kako bi se kasnije mogli razlikovati. Pomiješaju se u jednakom omjeru te apliciraju na *array*



mikročip s nekoliko stotina tisuća proba koje predstavljaju odabrane sekvence ljudskoga genoma. DNA fragmenti kompetitivno se vežu za komplementarne probe. Digitalnim softwareom mjeri se intenzitet fluorescencije svake pojedine probe te se izračunava omjer intenziteta fluorescencije ispitivanog i kontrolnog uzorka. Omjer koji iznosi 1 sugerira normalan broj kopija pacijentove DNA na tom lokusu. Omjer veći od 1 ukazuje na veću količinu pacijentova DNA materijala tj. na eventualnu duplikaciju ili trisomiju. Obrnuto, omjer manji od 1 ukazuje na gubitak genetskog materijala odnosno deleciju ili monosomiju u pacijenta. Rezolucija ove metode ovisi o broju i distribuciji proba u genomu (111,113).

*Single Nucleotide Polymorphisms Microarray Analysis (SOMA)* provodi se na mikročipu s oligonukleotidnim probama koje predstavljaju mjesta na DNA za koja se zna da među pojedincima variraju u paru baza (114). U ovoj metodi, samo se pacijentova DNA fragmentira, označava fluorescentnom bojom i hibridizira s probama. Mjeri se apsolutni intenzitet fluorescencije te uspoređuje s intenzitetima normalnih neovisno hibridiziranih kontrolnih DNA fragmenata. Granica rezolucije ove metode je 50-100 Kb. Njome se mogu dijagnosticirati varijacije u broju kopija (engl. *copy number variations*, CNVs) koje ukazuju na eventualnu uniparentalnu disomiju, mozaicizam ili konsangvinitet. Za razliku od aCGH, SOMA-om se može detektirati i triploidija (115,116).

U otkrivanju aneuploidija i većih kromosomskih aberacija CMA je jednakovrijedna klasičnoj kariotipizaciji. Njezina prednost leži u mogućnosti dijagnostike klinički značajnih submikroskopskih promjena koje otkriva u oko 1% fetusa normalnog kariotipa upućenih na daljnje pretrage na zahtjev roditelja, zbog starije dobi majke ili pozitivnog serumskog probira i u 6% fetusa koji su upućeni na CMA zbog ultrazvučno ustanovljenih strukturnih anomalija (111,117). Ipak, CMA se uvijek mora provoditi u kombinaciji s klasičnom kariotipizacijom kako ne bi promaknule balansirane translokacije (118).



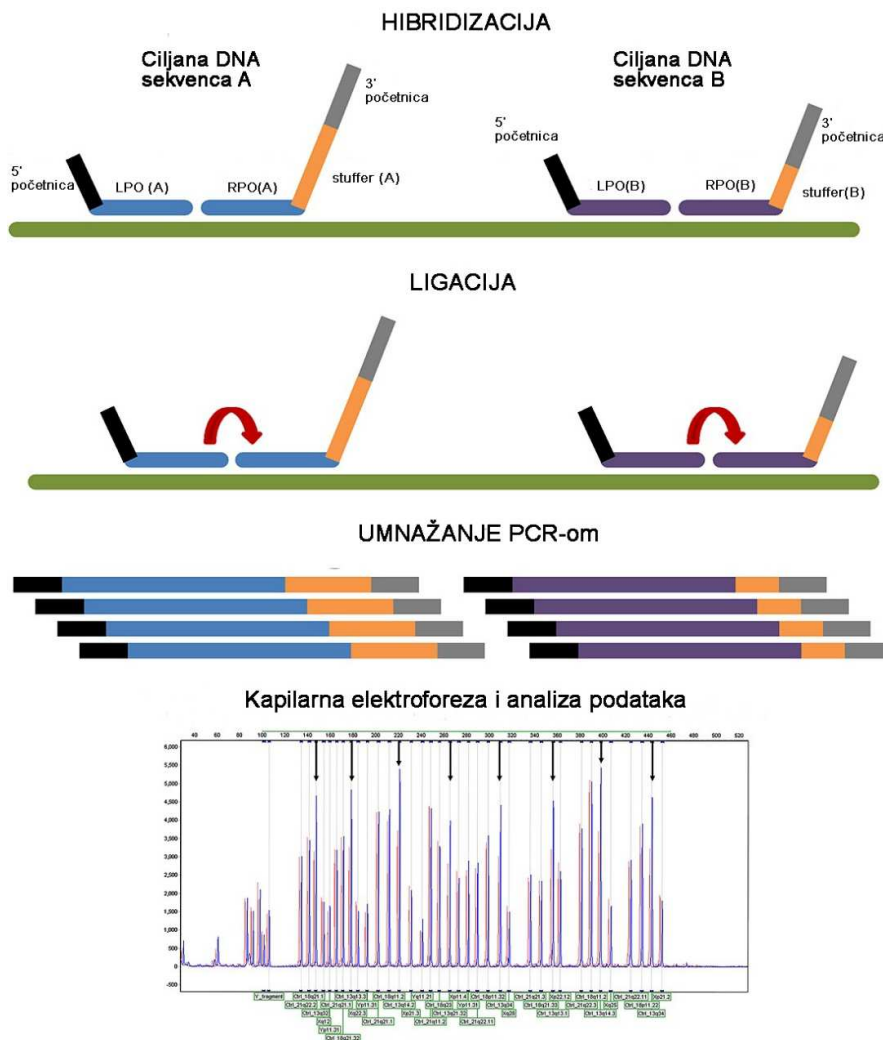
**Slika 2.** Shematski prikaz usporedbe metoda aCGH i SOMA. U aCGH testna i referentna DNA hibridiziraju se zajedno, dok se u SOMA-i hibridizira samo testna DNA. Preuzeto i prilagođeno prema: Alsolami et al., Figure 2. (119)

### 3.1.4. MLPA

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) tj. metoda pojačavanja sonde ovisno o multiplesnoj ligaciji molekularna je tehnika koja omogućuje detekciju malih delecija i insercija ispod granica rezolucije FISH-a i CMA (120). Metoda se temelji na detekciji promjena u broju kopija. Sam postupak izvodi se tako da se prvo DNA sekvenca od interesa denaturira i hibridizira s MLPA probama. Radi se zapravo o dvije „polu-probe“ - 3' (RPO- right probe oligonucleotide) i 5' (LPO- left probe oligonucleotide) MLPA probi. Objе sadrže početnicu za PCR i sekvencu koja se hibridizira s DNA od interesa, a 3' proba ima još i tzv. „*stuffer*“ koji služi za razlikovanje na temelju dužine. Navedene se probe hibridiziraju s ciljanom DNA sekvencom u punoj njenoj dužini, svaka sa svoje strane. U idućem koraku 3' proba se fosforilira i povezuje s 5' probom u veću konačnu oligonukleotidnu probu. Potom se dobivena kompletna proba umnožava uz pomoć PCR-a s fluorescentno obilježenim početnicama. U jednoj reakciji moguće je analizirati više od 40 sekvenci. Pri očitavanju

rezultata ampliconi se razlikuju prema dužini „*stuffera*“ pojedinih probi i razdvajaju kapilarnom elektroforezom (121,122).

U prenatalnoj dijagnostici MLPA se koristi za brzu detekciju promjena u broju 13, 18, 21, X i Y kromosoma na nekultiviranim uzorcima pribavljenim amniocentezom i CVS-om. Ograničenja primjene ove metode leže u tome što ne može detektirati mozaicizam niskog stupnja, inverzije niti translokacije (123).



**Slika 3.** Shematski prikaz MLPA metode. Preuzeto i prilagođeno prema: Willis i Van den Veyve (124)

### 3.1.5. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Sekvenciranje DNA jest određivanje slijeda nukleotida u DNA molekuli. Ovakav način analize gena sve je češći u prenatalnoj dijagnostici.

Najjednostavnija i najjeftinija metoda jest analiza 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 za koju se fetus testira.

Ukoliko abnormalni nalaz na fetusu nije visoko specifičan, moguće je koristiti genetske panele za pojedine sindrome npr. za displaziju skeleta ili za fetalnu akineziju. Ovakvim panelima istodobno se iz jednog uzorka sekvencira veći broj gena za koje se smatra da mogu uzrokovati utvrđeni poremećaj. Na ovaj način moguće je brže doći do dijagnoze (29).

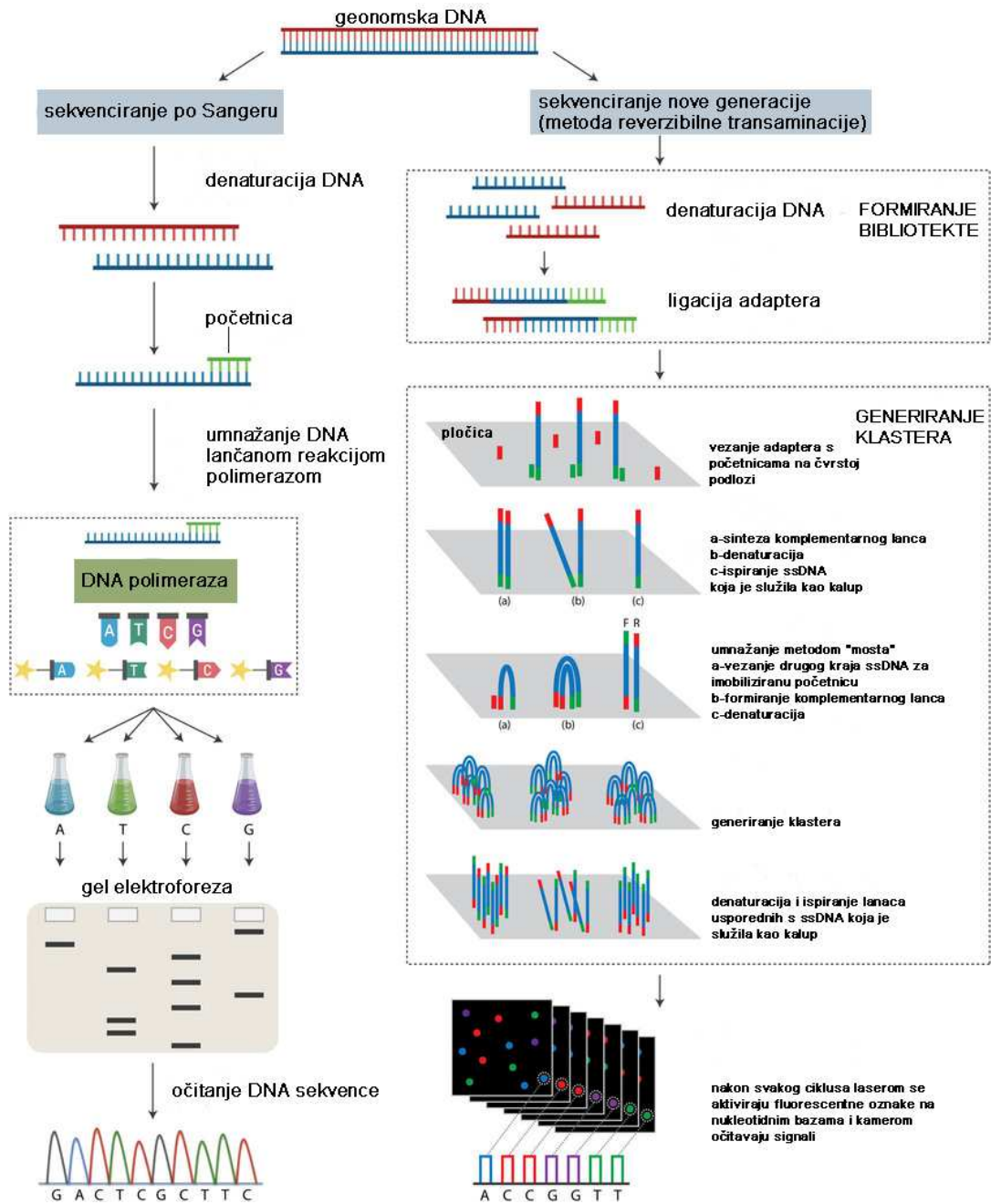
Sam vrh tehnologije prenatalne genetske dijagnostike čine cjeloegzomsko sekvenciranje, odnosno sekvenciranje cijelog egzoma čovjeka (engl. *whole exome sequencing*, WES) kao i sekvenciranje cjelokupnog genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS). WES obuhvaća sekvenciranje kodirajućih regija koje čine 1,5% genoma. Američko društvo za medicinsku genetiku i genomiku (ACMG - *The American College of Medical Genetics and Genomics*) preporučuje primjenu WES-a kada obiteljska anamneza i testovi probira ukazuju na patološku promjenu, a drugim metodama prenatalne dijagnostike nije se uspio dijagnosticirati poremećaj (125). Poseban problem pri interpretaciji nalaza predstavljaju varijante nepoznatog značenja (engl. *variants of unknown significance*, VUS) (126) za koje nije sigurno jesu li patogene mutacije. Kako bi se doskočilo ovom problemu, metoda se često koristi kao „trio“ tj. istovremeno sekvenciranje majčina, očeva i egzoma fetusa (127). Na ovaj način olakšava se analizira podataka jer je moguće utvrditi podrijetlo pronađenih potencijalno patogenih varijanti- jesu li one naslijeđene ili se radi o *de novo* mutacijama. Etičku dilemu predstavljaju i sekundarni nalazi poremećaja na koje fenotip fetusa nije upućivao (128). Nažalost, još ne postoje baze fenotipskih podataka za fetuse kojima bismo se mogli pomoći u interpretaciji podataka (129).

Sve analize danas se provode metodom masivnog paralelnog sekvenciranja tj. sekvenciranja nove generacije. U prvom koraku DNA se fragmentira, zatim se dodaju početnice koje se vežu na krajeve svakog fragmenta. Jednolančani fragmenti DNA zatim se vežu na čvrstu površinu i umnažaju PCR-om kojim se proizvode milijuni grupiranih DNA fragmenata (predložaka). Ti predlošci potom se mogu paralelno sekvencirati pomoću lasera

koji prate ugrađivanje fluorescentno obilježenih nukleotida. Sekvence dobivene iz ove velike zbirke preklapajućih fragmenata zatim se sastavljaju kako bi se dobila kontinuirana genomska sekvenca (130). Svi patološki nalazi dobiveni ovom metodom uvijek se moraju potvrditi Sangerovom metodom.

Također, WES-om se ne mogu otkriti varijacije broja kopija (CNV) pa svakoj analizi mora prethoditi mikročip (engl. *microarray*). Također, metoda ne otkriva aneuploidije, poliploidije, translokacije, mikrosatelite (128). Rezultati su gotovi za 3 tjedna (131).

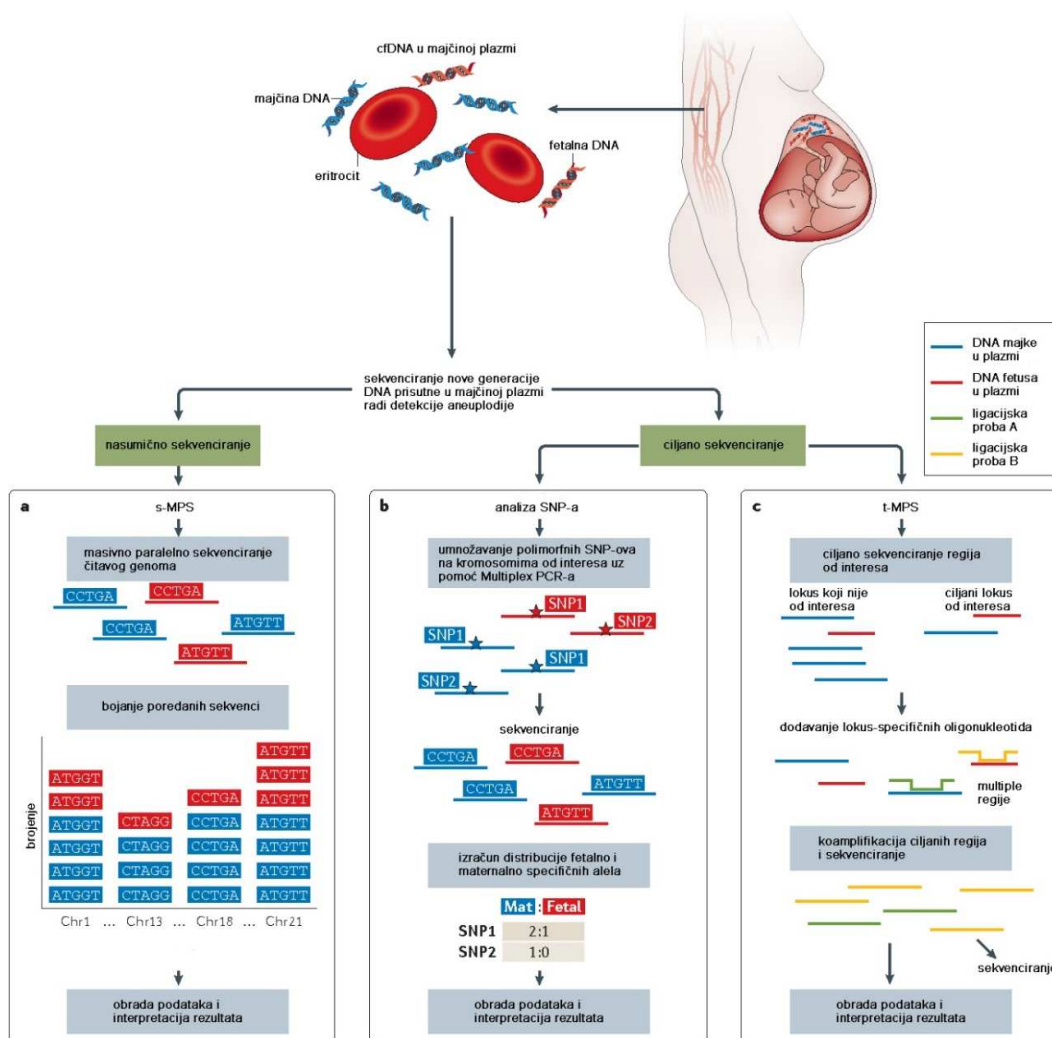
Nažalost, WGS još uvijek nije u kliničkoj primjeni jer se radi o puno skupljoj metodi koja zahtijeva više vremena i ograničena je mogućnost interpretacije varijanti pronađenih među intronima (128).



**Slika 4.** Shematski prikaz usporedbe sekvenciranja po Sangeru i sekvenciranja nove generacije (metoda reverzibilne transaminacije). Preuzeto i prilagođeno prema: Young i Gillung (132)

### 3.2. Metode analize cfDNA sekvenciranjem u NIPT postupcima

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 % (133). 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 ciljnom sekvenciranju kojim se sekvenciraju samo regije od interesa (*Slika 5.*). Metode su prikazane u posebnim potpoglavljima.



*Slika 5.* Usporedba metoda analize cffDNA u neinvazivnom prenatalnom testiranju. Preuzeto i prilagođeno prema: Vermeesch et al. Figure 2. (134)

### 3.2.1. *Masivno paralelno sekvenciranje genoma metodom sačmarice (eng. Shotgun Massively Parallel Sequencing, s-MPS)*

Masivno paralelno sekvenciranje čitavoga genoma metodom sačmarice (engl. *Shotgun Massively Parallel Sequencing, s-MPS*) zasniva se na simultanom sekvenciranju i brojanju milijuna majčinih i fetalnih DNA fragmenata veličine otprilike 25 parova baza koji se zatim uz pomoć referentnog humanog genoma točno pridružuju lokusu i kromosomu s kojeg potječu (50) (*Slika 5*). Višak ili manjak fragmenata DNA pridruženih lokusima smještenima na istom kromosomu u odnosu na referentnu euploidnu DNA ukazuje na aneuploidiju ploda (135). Također, ova metoda koristi se i za otkrivanje mikrodelecija (135). Jedna od mogućih budućih uporaba ove metode jest analiza virusne 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 hiperimunim gamaglobulinima te sprječavanje transmisije virusa kroz placentu (136). Mane ove metode jesu mogućnost obrade manjeg broja uzoraka (pacijentica) u jednoj reakciji te duže vrijeme izrade i veća cijena (135).

### 3.2.2. *Ciljano sekvenciranje genoma ( eng. Target Massively Parallel Sequencing- t-MPS)*

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) (*Slika 5*). Relativni višak fragmenata podrijetlom s jednog kromosoma u odnosu na druge ukazuje na aneuploidiju ploda. Iako je ova metoda značajno jeftinija, brža te ju 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 (54,88).

Ipak, obje navedene metode omogućuju veliku dubinu sekvenciranja te su kao takve optimalne za obradu uzoraka niske količine frakcije fetalne slobodne DNA (engl. *cell-free fetal DNA, cffDNA*) te u slučajevima testiranja manjih promjena u varijaciji broja kopija (88).



### 3.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism – SNP*)

Analiza polimorfizma jednog nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism, SNP*) analizira 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 majčinu od fetalne DNA uzimajući u obzir relativni kvantitativni doprinos majčinog i očevog genoma u plazmi. Zasniva se na simultanoj amplifikaciji 20 000 SNP sekvenci (*Slika 5*). Vjerojatnost aneuploidije i poliploidije fetusa računa se nakon pridruživanja SNP sekvenci 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 (135,137–139), a također nije pogodna za analizu trudnoća u kojima trudnica nije biološka majka ploda (donirana oocita, embrij, surogat majka) (66,140).

## 4. OGRANIČENJA METODA INVAZIVNOG I NEINVAZIVNOG TESTIRANJA

U ovom odjeljku prikazana su i diskutirana ograničenja metoda prenatalne dijagnostike, tijekom i nakon provedenog invazivnog, te neinvazivnog uzorkovanja. Zasebno su prikazani izazovi invazivnih, te neinvazivnih metoda, s naglaskom na potonje zbog svoje popularnosti i rastuće korisnosti.

### 4.1. Izazovi u metodama invazivnog testiranja

Invazivni postupci prenatalnog testiranja zbog načina prikupljanja uzorka 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 (141)), Rh-senzitizacije trudnice, infekcije (142,143). Nadalje, glavno ograničenje pribavljanja uzoraka biopsijom korionskih resica jest činjenica da je u otprilike 2% slučajeva u tkivu posteljice

prisutan mozaicizam tj. vidljive su citogenetske abnormalnosti, najčešće trisomije, kojih nema u tkivu fetusa (144).

Također, i metode analize uzoraka pribavljenih na ovaj način imaju svoja ograničenja. Npr. rezolucija klasične kariotipizacije je 5-10 Mb ,a rezultati znatno ovise o znanju i iskustvu citogenetičara koji pretragu provodi (145) dočim se nalazi ove metode najranije mogu dobiti za 4-10 dana zbog potrebe kultivacije stanica (146). Nadalje, metode FISH i MLPA zahtijevaju točnu indikaciju i sumnju na konkretan genetski poremećaj kako bi se mogla odabrati primjerena sonda za ispitivanje (146).

Glavni nedostatak CMA jest da ne detektira balansirane translokacije i inverzije. Iako prisutnost istih 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 postupanju (111) .

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 niti translokacija i trinukleotidnih ponavljanja. Vrijeme čekanja rezultata je 2-3 tjedna (128).

#### 4.2. Izazovi u metodama prenatalnog neinvazivnog testiranja (NIPT)

Neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT) pokazalo se kao vrlo učinkovita metoda probira, barem što se tiče detekcije Down, Patau i Edwards sindroma, 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 se mogu iznjedriti prije ponude ovakvih testova u nacionalnim zdravstvenim sustavima (147). Glavne kritike NIPT testova prikazane su u *Tablici 2*.

Prva kritika NIPT-a jest činjenica da se ovdje radi o metodi probira, a ne dijagnostičkom testu. Stoga svaki patološki nalaz (izuzev nalaza monogenetskih bolesti dokazanih metodom analize relativnog udjela haplotipa) zahtijeva potvrdu invazivnom prenatalnom dijagnostikom, ponajprije amniocentezom (15). Ako se NIPT provodi radi isključivanja očinskih mutacija,

potrebno je provesti i invazivno testiranje za konačnu dijagnozu ukoliko se otkrije očinska mutacija kako bi se potvrdilo je li mutacija majke također naslijeđena ili nije, što dodatno poskupljuje cijenu prenatalnog testiranja.

Nadalje, zbog svoje velike popularnosti i korištenja komercijalnih NIPT testova u populaciji niskog rizika, dolazi do pojavnosti lažno pozitivnih rezultata zbog niske PPV u takvoj populaciji, slično kao i kod poremećaja s niskom incidencijom. Primjerice, kod 20-godišnjih trudnica vjerojatnost da nose fetus s Patau sindromom je 1 na 11 042 te je PPV svega 6% tj. 94 od 100 pozitivnih rezultata u ovom slučaju bit će lažno pozitivna (64,66). Drugi razlog jest prisutnost cfDNA odumrlog blizanca u majčinom serumu. Genetski materijal odumrlog blizanca zadržava se još najmanje 8 tjedana u cirkulaciji majke (148,149). Razlikovanje ove pojave od stvarne aneuploidije moguće je jedino NIPT metodom koja se temelji na analizi SNP-ova (148).

Prepreku NIPT analizi predstavlja i činjenica da je cffDNA podrijetla posteljice u kojoj je u 1-2% slučajeva prisutan mozaicizam (65) između 10. i 12. gestacijskog tjedna kada se najčešće uzorkuje majčina krv za NIPT analizu (149). Ova pojava nerijetko dovodi i do lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Tijekom trudnoće, aneuploidija se u stanicama od kojih će se naposljetku razviti fetus najčešće sama ispravi (150). U tom procesu može nastati kombinacija mozaične trisomije placente i euploidnog zdravog embrija (151). 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 (60,152).

Što se tiče multiplih, blizanačkih trudnoća, NIPT metoda nije idealan odabir zbog smanjenja izolirane količine fetalne frakcije DNA po fetusu (58) čime raste šansa za pogrešan nalaz. Stoga su komercijalno dostupni testovi još uvijek ograničeni na određivanje isključivo trisomija 13, 18 i 21 kod dvojajčanih blizanaca (97,137). Nadalje, NIPT metodom nemoguće je utvrditi o kojem blizancu se radi pa je svaki patološki nalaz nužno provjeriti invazivnim testom (66). Također, ova metoda nije preporučljiva ukoliko je došlo do odumiranja jednog od blizanaca jer se njegova cfDNA otpušta u plazmu iz ostataka posteljičnog tkiva i do tri mjeseca nakon odumiranja (38,153,154).

Nijedna od metoda koja se bazira na analizi cfDNA nije pogodna za majke koje imaju transplantiran organ zbog prisutnosti fragmenata još jedne humane DNA u krvi (140).

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, no zbog njegove široke dijagnostičke korisnosti, ali i ograničenja, mora se provesti genetičko savjetovanje. Prije samog testiranja, razgovorom s kandidatima mora se razjasniti postoje li genetički rizici koje NIPT ne može otkriti (npr. kromosomska translokacija koja uključuje kromosome koji nisu otkriveni NIPT-om ili gonosomski mozaicizam kod majke koji može dovesti do lažnih NIPT rezultata ili monogenske bolesti u obitelji) (155). Isto tako, kandidatu se moraju jasno predočiti i ograničenja metode, a to su već prije spomenuta mogućnost lažno pozitivnih, odnosno negativnih rezultata, pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV), itd.

*Tablica 2.* Kritike NIPT testiranja analizom cfDNA

<b>Kritike NIPT testiranja analizom cfDNA</b>	<b>Reference</b>
Napredna metoda probira, a ne dijagnostički test	(88)
Komplicirano i skupo dokazivanje mutacija naslijeđenih od majke	(83)
Rezultati ovise o FF i najčešće se može primijeniti tek od 9. tjedna gestacije	(156)
Niska PPV u populaciji niskoga rizika i niska PPV poremećaja s niskom incidencijom	(61,62,157)
Analizirani fragmenti DNA podrijetla su placente, moguća pojava placentarnog mozaicizma	(66,149)
Lošija osjetljivost testa u blizanačkim trudnoćama i nemogućnost razlikovanja blizanaca	(66,158)
Nemogućnost detekcije anatomskih malformacija, oštećenja neuralne cijevi i defekata ventralne stijenke	(88,159,160)
Nemogućnost korištenja testa u trudnica sa transplantiranim organom	(140).
Nužno genetsko savjetovanje	(161,162)

## 5. 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 anomalija. S otkrićem cfDNA u tjelesnim tekućinama, došlo je do razvoja neinvazivnog testiranja genetičkih anomalija, najviše u onkologiji, no i u prenatalnoj medicini gdje je izgledno da će takva testiranja zamijeniti klasične metode probira u nacionalnim zdravstvenim sustavima. Također, čini se da će rasti klinički značaj metoda sekvenciranja cfDNA s ciljem otkrivanja širokog spektra genetičkih poremećaja, od aneuploidija do točkastih mutacija sukladno prihvatljivosti njihova učinka i kliničke korisnosti. S druge strane, razvojem metodologije analize cfDNA sekvenciranjem, odnosno povećanjem brojnosti detektibilnih genetičkih promjena, otvara se prostor za sve veću tržišnu entropiju pa je u budućnosti nužno izraditi jasne kliničke smjernice prilikom uvođenja ove obećavajuće metodologije u javnozdravstveni sustav.

## **6. ZAHVALE**

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc.Ani Katušić Bojanac na ponuđenoj temi, stručnom vodstvu, pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

## 7. LITERATURA

1. Wald N. Editorial. *J Med Screen*. 2001;8(1):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 [Internet]. Vol. 176, *American Journal of Roentgenology*. American Roentgen Ray Society; 2001 [pristupljeno 2021 Jun 23]. p. 1357–62. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11373191/>
3. Nacionalna i stručna preporuka za prenatalni probir i dijagnostiku kromosopatija. Vol. 19, *Gynaecologia et perinatologia : journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics*. Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju i Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu Hrvatskog liječničkog zbora; 2010 Jun.
4. McCann-Crosby B, Placencia FX, Adeyemi-Fowode O, Dietrich J, Franciskovich R, Gunn S, et al. Challenges in Prenatal Treatment with Dexamethasone [Internet]. Vol. 16, *Pediatric endocrinology reviews : PER*. NLM (Medline); 2018 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 186–93. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30371037/>
5. Vass CM, Georgsson S, Ulph F, Payne K. Preferences for aspects of antenatal and newborn screening: A systematic review [Internet]. Vol. 19, *BMC Pregnancy and Childbirth*. BioMed Central Ltd.; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 24]. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30991967/>
6. Turnpenny P, Ellard S. Prenatalno testiranje i genetika reprodukcije. In: Emeryeve osnove medicinske genetike. 14. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. p. 325–38.
7. Cuckle H, Maymon R. Development of prenatal screening-A historical overview [Internet]. Vol. 40, *Seminars in Perinatology*. W.B. Saunders; 2016 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 12–22. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26764253/>
8. Practice Bulletin No. 162: Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 May 1 [pristupljeno 2021 Jun 24];127(5):e108–22. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26938573/>
9. Durić K. Biokemijski testovi probira fetalnih anomalija. In: Đelmiš J, Orešković S, editors. *Fetalna medicina i opstetricija*. 1. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. p. 95–8.
10. Hixson L, Goel S, Schuber P, Faltas V, Lee J, Narayakkadan A, et al. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations [Internet]. Vol. 20, *Journal of Laboratory Automation*. SAGE Publications Inc.; 2015 [pristupljeno 2021 Mar 31]. p. 562–73. Dostupno

na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587000/>

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* [Internet]. 2005 Nov 10 [pristupljeno 2021 Mar 31];353(19):2001–11. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16282175/>
12. ACOG practice bulletin no. 77: Screening for fetal chromosomal abnormalities [Internet]. Vol. 109, *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2007 [pristupljeno 2021 Jun 25]. p. 217–28. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17197615/>
13. Gordon S, Langaker MD. Prenatal Genetic Screening [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [pristupljeno 2021 Mar 30]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491634>
14. Samura O. Update on noninvasive prenatal testing: A review based on current worldwide research. 2020;
15. Pös O, Budiš J, Szemes T. Recent trends in prenatal genetic screening and testing [version 1; peer review: 2 approved] [Internet]. Vol. 8, *F1000Research*. F1000 Research Ltd; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 27]. Dostupno na: </pmc/articles/PMC6545823/>
16. Jones TM, Montero FJ. Chorionic Villus Sampling [Internet]. StatPearls. 2021. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33085448>
17. Podobnik M, Podobnik-Brlečić Petra. Invazivna prenatalna dijagnostika. In: Orešković S, Đelmiš J, editors. *Fetalna medicina i opstetricija*. 1st ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. p. 99–108.
18. Amniocentesis - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. [pristupljeno 2021 Mar 31]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559247/>
19. Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Pompili E, Izzi C, Martinoni L, et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: Results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Nov 1 [pristupljeno 2021 Apr 1];35(11):1117–27. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26213308/>
20. 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* [Internet]. 2014 [pristupljeno 2021 Apr 1];20(4):571–81. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667481/>
21. Shulman LP, Simpson JL, Elias S. Invasive Prenatal Genetic Techniques. *Glob Libr Women's*



Med. 2009;

22. Arnold M -L, Rauskolb R, Anton-Lamprecht I, Schinzel A, Schmid W. Prenatal diagnosis of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Prenat Diagn* [Internet]. 1984 [pristupljeno 2021 Apr 2];4(2):85–98. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6739441/>
23. Golbus MS, Sagebiel RW, Filly RA, Gindhart TD, Hall JG. Prenatal Diagnosis of Congenital Bullous Ichthyosiform Erythroderma (Epidermolytic Hyperkeratosis) by Fetal Skin Biopsy. *N Engl J Med* [Internet]. 1980 Jan 10 [pristupljeno 2021 Apr 2];302(2):93–5. Dostupno na: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198001103020205>
24. Blanchet-Bardon C, Dumez Y, Labbé F, Lutzner MA, Puissant A, Henrion R, et al. Prenatal diagnosis of Harlequin fetus [Internet]. Vol. 321, *The Lancet*. Lancet; 1983 [pristupljeno 2021 Apr 2]. p. 132. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6129450/>
25. Kousseff BG, Matsuoka LY, Stenn KS, Hobbins JC, Mahoney MJ, Hashimoto K. Prenatal diagnosis of Sjögren-Larsson syndrome. *J Pediatr* [Internet]. 1982 [pristupljeno 2021 Apr 2];101(6):998–1001. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7143181/>
26. Fetal Tissue Biopsy | Pavilion for Women [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 24]. Dostupno na: <https://women.texaschildrens.org/program/texas-childrens-fetal-center/fetal-diagnostics/fetal-tissue-biopsy>
27. 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 [Internet]. Vol. 21, *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 798–812. Dostupno na: </pmc/articles/PMC6691975/>
28. 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 [Internet]. Vol. 177, *Cell*. Cell Press; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 32–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30901545/>
29. Wojcik MH, Reimers R, Poorvu T, Agrawal PB. Genetic diagnosis in the fetus [Internet]. Vol. 40, *Journal of Perinatology*. Springer Nature; 2020 [pristupljeno 2021 Apr 4]. p. 997–1006. Dostupno na: </pmc/articles/PMC7319864/>
30. Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Principles of clinical cytogenetics and genome analysis. In: Thompson & Thompson *Genetics in medicine*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
31. Sayres LC, Cho MK. Cell-free fetal nucleic acid testing: A review of the technology and its applications [Internet]. Vol. 66, *Obstetrical and Gynecological Survey*. *Obstet Gynecol Surv*;

- 2011 [pristupljeno 2021 Apr 25]. p. 431–42. Dostupno na:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21944155/>
32. Grossman TB, Chasen ST. Abortion for Fetal Genetic Abnormalities: Type of Abnormality and Gestational Age at Diagnosis. *Am J Perinatol Rep* [Internet]. 2020;10:87–92. Dostupno na: <https://doi.org/>
  33. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* [Internet]. 1969 [pristupljeno 2021 Mar 23];1(7606):1119–22. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4181601/>
  34. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil* [Internet]. 1948 Feb;142(3–4):241–3. Dostupno na:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018>
  35. Hui L, Maron JL, Gahan PB. Other Body Fluids as Non-invasive Sources of Cell-Free DNA/RNA. In 2015. p. 295–323. Dostupno na: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9168-7\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9168-7_11)
  36. 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* [Internet]. 2007 May [pristupljeno 2021 Mar 20];27(5):415–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17286310/>
  37. Dennis Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* [Internet]. 1997 Aug 16 [pristupljeno 2021 Mar 20];350(9076):485–7. Dostupno na:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/>
  38. Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn* [Internet]. 2020 Jan 10 [pristupljeno 2021 Mar 18];40(2):155–63. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pd.5620>
  39. 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 Oct 4 [pristupljeno 2021 Jun 26];6(10). Dostupno na:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21998643/>
  40. 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* [Internet]. 2021 Apr 29 [pristupljeno 2021 Jun 26];6(3):743–9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33215208/>

41. Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* [Internet]. 2002 Mar;48(3):421–7. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861434>
42. 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* [Internet]. 2016 Jan 14 [pristupljeno 2021 Mar 25];164(1–2):57–68. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771485/>
43. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, 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* [Internet]. 2013 Jan [pristupljeno 2021 Mar 25];41(1):26–32. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23108725/>
44. 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* [Internet]. 2013 Jul [pristupljeno 2021 Mar 25];33(7):667–74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23592541/>
45. 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 [Internet]. Vol. 32, *Prenatal Diagnosis*. *Prenat Diagn*; 2012 [pristupljeno 2021 Mar 25]. p. 912–4. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22717986/>
46. 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 [Internet]. Vol. 44, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. John Wiley and Sons Ltd; 2014 [pristupljeno 2021 Mar 25]. p. 242–3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24862357/>
47. 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* [Internet]. 2016 Aug 1 [pristupljeno 2021 Mar 25];36(8):790–3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27328203/>
48. 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 [Internet]. Vol. 35, *Prenatal Diagnosis*. John Wiley and Sons Ltd; 2015 [pristupljeno 2021 Mar 25]. p. 1155–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26248743/>

49. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem* [Internet]. 2014 Jan [pristupljeno 2021 Mar 25];60(1):243–50. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24046201/>
50. 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* [Internet]. 2008 Oct 21 [pristupljeno 2021 Mar 20];105(42):16266–71. Dostupno na: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808319105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808319105)
51. 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* [Internet]. 2015 Apr 15 [pristupljeno 2021 Mar 25];16(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25886572/>
52. Wataganara T, Bui TH, Choy KW, Leung TY. Debates on fetal fraction measurement and DNA-based noninvasive prenatal screening: time for standardisation? [Internet]. Vol. 123, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016 [pristupljeno 2021 Jun 27]. p. 31–5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27627594/>
53. 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* [Internet]. 2004 Mar [pristupljeno 2021 Jun 27];81(3):638–44. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15037414/>
54. 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* [Internet]. 2012 [pristupljeno 2021 Mar 20];206(4):319.e1-319.e9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22464072/>
55. 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 Neonatal Med* [Internet]. 2013 Jan [pristupljeno 2021 Jun 27];26(2):143–5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913322/>
56. Yu SCY, Chan KCA, Zheng YWL, 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* [Internet]. 2014 Jun 10 [pristupljeno 2021 Jun 27];111(23):8583–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24843150/>

57. 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* [Internet]. 2015 Aug 1 [pristupljeno 2021 Jun 27];35(8):810–5. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25967380/>
58. 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* [Internet]. 2020 Jan 1 [pristupljeno 2021 Mar 25];40(2):179–84. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31711265/>
59. 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 [Internet]. Vol. 50, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. John Wiley and Sons Ltd; 2017 [pristupljeno 2021 Mar 25]. p. 302–14. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397325/>
60. 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* [Internet]. 2018 Mar 1 [pristupljeno 2021 Mar 25];38(4):258–66. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29388226/>
61. 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* [Internet]. 2014 Feb 27 [pristupljeno 2021 Apr 28];370(9):799–808. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24571752/>
62. 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* [Internet]. 2015 Apr 23 [pristupljeno 2021 Apr 28];372(17):1589–97. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830321/>
63. 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* [Internet]. 2015 Jul 1 [pristupljeno 2021 Apr 28];213(1):30.e1-30.e4. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957020/>
64. NIPT Predictive Value Calculator [Internet]. [pristupljeno 2021 Apr 28]. Dostupno na: <https://www.perinatalquality.org/Vendors/NSGC/NIPT/>
65. 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* [Internet]. 2017 Apr 1 [pristupljeno 2021 Apr 28];37(4):416–9. Dostupno na:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28198030/>

66. Guseh SH. Noninvasive prenatal testing: from aneuploidy to single genes [Internet]. Vol. 139, Human Genetics. Springer; 2020 [pristupljeno 2021 Mar 20]. p. 1141–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31555907/>
67. Rijnders RJP, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAMJ, Christiaens GCML. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2001 [pristupljeno 2021 Apr 29];98(3):374–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11530115/>
68. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. Détermination du sexe fœtal au cours du premier trimestre de grossesse par analyse du sérum maternel par PCR en temps réel. *Gynecol Obstet Fertil* [Internet]. 2002 Dec 1 [pristupljeno 2021 Apr 25];30(12):953–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12661284/>
69. Lo YMD, 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* [Internet]. 1998 Dec 10 [pristupljeno 2021 Apr 25];339(24):1734–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9845707/>
70. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LGC, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* [Internet]. 2006 Mar [pristupljeno 2021 Apr 25];13(1-2 SPEC. ISS.):53–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16564727/>
71. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Dec 23 [pristupljeno 2021 Apr 26];105(51):20458–63. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073917/>
72. 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* [Internet]. 2012 Mar [pristupljeno 2021 Apr 26];14(3):296–305. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281937/>
73. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 May [pristupljeno 2021 Apr 26];119(5):890–901. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22362253/>

74. 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* [Internet]. 2020 Aug 1 [pristupljeno 2021 Apr 27];8(8). Dostupno na: [/pmc/articles/PMC7434727/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39444447/)
75. Wapner RJ, Babiarez 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* [Internet]. 2015 Mar 1 [pristupljeno 2021 Apr 27];212(3):332.e1-332.e9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25479548/>
76. 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* [Internet]. 2015 [pristupljeno 2021 Apr 27];2015:1–3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26346617/>
77. NIFTY by GenePlanet [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: [https://nipt-geneplanet.com/hr?gclid=CjwKCAjwoNuGBhA8EiwAFxomA-IHfuRrFDGe2eCOI3GisDGAGk62Xtc5RGz7miJF4HjViOHYqiQGCRoCKXcQAvD\\_BwE](https://nipt-geneplanet.com/hr?gclid=CjwKCAjwoNuGBhA8EiwAFxomA-IHfuRrFDGe2eCOI3GisDGAGk62Xtc5RGz7miJF4HjViOHYqiQGCRoCKXcQAvD_BwE)
78. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal Diagnosis of Myotonic Dystrophy Using Fetal DNA Obtained from Maternal Plasma. *Clin Chem* [Internet]. 2000 Feb 1 [pristupljeno 2021 Apr 26];46(2):301–2. Dostupno na: <https://academic.oup.com/clinchem/article/46/2/301/5640539>
79. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez De Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* [Internet]. 2002 Oct 1 [pristupljeno 2021 Apr 26];22(10):946–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12378583/>
80. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Dennis Lo YM. Prenatal exclusion of  $\beta$  thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* [Internet]. 2002 Sep 28 [pristupljeno 2021 Apr 26];360(9338):998–1000. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12383672/>
81. 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* [Internet]. 2014 [pristupljeno 2021 Apr 26];99(6). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606108/>
82. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2009 [pristupljeno 2021 Apr

- 26];15(1):139–51. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18945714/>
83. 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* [Internet]. 2018 Jan 1 [pristupljeno 2021 Apr 27];38(1):44–51. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.5197>
84. A R, J B, Z D, M H, S S, ML B, et al. Informatics-based, highly accurate, noninvasive prenatal paternity testing. *Genet Med* [Internet]. 2013 Jun [pristupljeno 2021 Jul 9];15(6):473–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23258349/>
85. Lo YMD, Chan KCA, 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* [Internet]. 2010 Dec 8 [pristupljeno 2021 Apr 27];2(61). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148127/>
86. 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 - J Am Med Assoc* [Internet]. 2015 Jul 14 [pristupljeno 2021 Apr 28];314(2):162–9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168314/>
87. Carlson LM, Hardisty E, Coombs CC, Vora NL. Maternal malignancy evaluation after discordant cell-free DNA results [Internet]. Vol. 131, *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [pristupljeno 2021 Apr 28]. p. 464–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29420407/>
88. Wagner J. Neinvazivno prenatalno testiranje. *Pediatr Croat*. 2016;60(1):46–52.
89. Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Aug 2 [pristupljeno 2021 Apr 29];379(5):464–73. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067923/>
90. 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* [Internet]. 2002 [pristupljeno 2021 Apr 29];42(8):1079–85. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12385421/>
91. Ryan A, Baner J, Demko Z, Hill M, Sigurjonsson S, Baird ML, et al. Informatics-based, highly accurate, noninvasive prenatal paternity testing. *Genet Med* [Internet]. 2013 Jun [pristupljeno 2021 Apr 29];15(6):473–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23258349/>
92. 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* [Internet]. 2015 Apr 23 [pristupljeno 2021 Apr 29];372(17):1639–45. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830323/>
93. Brison N, Van Den Bogaert K, Dehaspe L, Van Den Oever JME, Janssens K, Blaumeiser B, et al. Accuracy and clinical value of maternal incidental findings during noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Genet Med* [Internet]. 2017 Mar 1 [pristupljeno 2021 Apr 29];19(3):306–13. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27584908/>
  94. MaterniT 21 Plus | Labcorp [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: <https://www.labcorp.com/testingwhileexpecting/maternit21-plus>
  95. Verifi and Verifi Plus Prenatal Tests | Samples processed at CLIA-certified, CAP-accredited lab [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: [https://www.illumina.com/clinical/illumina\\_clinical\\_laboratory/verifi-prenatal-tests.html](https://www.illumina.com/clinical/illumina_clinical_laboratory/verifi-prenatal-tests.html)
  96. Harmony | Prenatalni test [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: <http://www.harmony-test.hr/>
  97. Panorama Overview | Natera [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: <https://www.natera.com/womens-health/panorama-nipt-prenatal-screening/>
  98. Vistara Overview | Vistara Single-Gene Disorders Testing | Natera [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 26]. Dostupno na: <https://www.natera.com/womens-health/vistara-nipt-single-gene-test/>
  99. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) - The SAFE Test - St George's University Hospitals NHS Foundation Trust [Internet]. [pristupljeno 2021 Jul 9]. Dostupno na: <https://www.stgeorges.nhs.uk/service/maternity-services/your-pregnancy/fetal-medicine-unit/the-safe-test/>
  100. 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* [Internet]. 2020 Jun 1 [pristupljeno 2021 Jul 9];99(6):722–30. Dostupno na: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aogs.13841>
  101. Caspersson T, Zech L, Modest EJ. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: Superiority of Quinacrine mustard to quinacrine. *Science* (80- ) [Internet]. 1970 [pristupljeno 2021 Apr 4];170(3959):762. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5479635/>
  102. Spinner NB. Chromosome Banding. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2013. p. 546–8.

103. Tonković-Đurišević Ivana. Kariotip čovjeka i prenatalna dijagnostika kromosomopatija [Internet]. Dostupno na: <https://lms.mef.hr/e-ucenje/2020-2021/pluginfile.p>
104. Martina R. Molekularna citogenetika [Internet]. Dostupno na: [https://lms.mef.hr/e-ucenje/2020-2021/pluginfile.php/74118/mod\\_resource/content/1/Martina Rincic Medicinska genetika Molekularna citogenetika 2020.pdf](https://lms.mef.hr/e-ucenje/2020-2021/pluginfile.php/74118/mod_resource/content/1/Martina_Rincic_Medicinska_genetika_Molekularna_citogenetika_2020.pdf)
105. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) | Learn Science at Scitable [Internet]. [pristupljeno 2021 Apr 8]. Dostupno na: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/>
106. Knutsen T. Multicolor FISH (SKY and M-FISH) and CGH. In: *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017 [pristupljeno 2021 Apr 8]. p. 833–901. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119061199.ch17>
107. Tsai ACH, Pickler L, Tartaglia N, Hagerman R. Chromosomal Disorders and Fragile x Syndrome. In: *Developmental-Behavioral Pediatrics*. Elsevier Inc.; 2009. p. 224–34.
108. Gomes A, Korf BR. Genetic Testing Techniques. In: *Pediatric Cancer Genetics*. Elsevier Inc.; 2018. p. 47–64.
109. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis [Internet]. Vol. 109, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2018 [pristupljeno 2021 Apr 4]. p. 201–12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29447663/>
110. Patussi S, Vasconcelos S, Balvedi Poersch L, Rafaela A, Christina A. Genomic in situ Hybridization in Triticeae: A Methodological Approach. In: *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. InTech; 2013.
111. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis [Internet]. Vol. 109, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2018 [pristupljeno 2021 Mar 31]. p. 201–12. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29447663/>
112. Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* [Internet]. 2001 [pristupljeno 2021 Apr 7];29(3):263–4. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687795/>
113. Shearer BM, Thorland EC, Gonzales PR, Ketterling RP. Evaluation of a commercially available focused aCGH platform for the detection of constitutional chromosome anomalies. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2007 Oct 15 [pristupljeno 2021 Apr 7];143(20):2357–70.

Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853469/>

114. Beaudet AL, Belmont JW. Array-based DNA diagnostics: Let the revolution begin [Internet]. Vol. 59, Annual Review of Medicine. Annu Rev Med; 2008 [pristupljeno 2021 Apr 7]. p. 113–29. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17961075/>
115. 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 [Internet]. 2004 Feb [pristupljeno 2021 Apr 7];14(2):287–95. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14762065/>
116. 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 [Internet]. 2004 May 1 [pristupljeno 2021 Apr 7];64(9):3060–71. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15126342/>
117. 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 [Internet]. 2012 Dec 6 [pristupljeno 2021 Apr 7];367(23):2175–84. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23215555/>
118. 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 [Internet]. 2017 Jan 1 [pristupljeno 2021 Apr 7];49(1):36–45. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27841880/>
119. Alsolami R, Knight SJ, Schuh A. Clinical application of targeted and genome-wide technologies: Can we predict treatment responses in chronic lymphocytic leukemia? Vol. 10, Personalized Medicine. 2013. p. 361–76.
120. Bilancia CG, Ganapathi M, Levy B. Prenatal Diagnosis of Chromosome Abnormalities. In: Fetal Medicine [Internet]. Elsevier; 2020 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 233-246.e3. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702069567000245>
121. Troxler H, Kleinert P, Schmutz M, Speer O. Advances in hemoglobinopathy detection and identification. In: Advances in Clinical Chemistry. Academic Press Inc.; 2012. p. 1–28.
122. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002 Jun 15;30(12):e57.
123. Schouten J, van Vught P, Galjaard RJ. Multiplex ligation-dependent probe amplification

- (MLPA) for prenatal diagnosis of common aneuploidies. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 161–70. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506197/>
124. Willis AS, Van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis [Internet]. Vol. 32, *Prenatal Diagnosis*. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [pristupljeno 2021 Jun 24]. p. 315–20. Dostupno na: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.3860>
  125. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* [Internet]. 2012 Aug [pristupljeno 2021 Apr 20];14(8):759–61. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22863877/>
  126. Westerfield L, Darilek S, van den Veyver I. Counseling Challenges with Variants of Uncertain Significance and Incidental Findings in Prenatal Genetic Screening and Diagnosis. *J Clin Med* [Internet]. 2014 Sep 12 [pristupljeno 2021 Apr 20];3(3):1018–32. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26237491/>
  127. Carss KJ, Hillman SC, Parthiban V, McMullan DJ, Maher ER, Kilby MD, et al. Exome sequencing improves genetic diagnosis of structural fetal abnormalities revealed by ultrasound. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Jun 15 [pristupljeno 2021 Apr 20];23(12):3269–77. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24476948/>
  128. Jelin AC, Vora N. Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics [Internet]. Vol. 45, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018 [pristupljeno 2021 Apr 4]. p. 69–81. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428287/>
  129. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 [pristupljeno 2021 Apr 20];44(D1):D862–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26582918/>
  130. Cooper G. Next generation sequencing. In: *Cell: A Molecular Approach* [Internet]. 8th ed. Oxford University Press; 2019 [pristupljeno 2021 Apr 20]. Dostupno na: <https://znanje.hr/product/cell-a-molecular-approach-8e/400996>
  131. Drury S, Edwards S, Boustred C, Jenkins L, Chitty L. Prenatal diagnosis of sonographic abnormalities using rapid whole exome sequencing. *Prenat Diagn*. 2016;36:51.
  132. Young AD, Gillung JP. Phylogenomics — principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. Vol. 45, *Systematic Entomology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 225–47.

133. 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* [Internet]. 2011 Nov [pristupljeno 2021 Mar 23];13(11):913–20. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22005709/>
134. Vermeesch JR, Voet T, Devriendt K. Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2016 [pristupljeno 2021 Jun 26]. p. 643–56. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27629932/>
135. Andari VCM, Bussamra LCS, Tedesco GDT, Peixoto ABP, Pares DBSP, Braga A, et al. Noninvasive prenatal testing: Benefits and limitations of the available tests. *Ces Gynkol* [Internet]. 2020 [pristupljeno 2021 Mar 19];85(1):41–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414284/>
136. 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* [Internet]. 2018 Dec 1 [pristupljeno 2021 Mar 23];8(1). Dostupno na: </pmc/articles/PMC5847603/>
137. Wagner J. Primjena slobodne fetalne DNA iz krvi majke za probir aneuploidija: prednosti i ograničenja. *Pediatr Croat*. 2015;59(1):118–24.
138. Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: What has happened since the rubber met the road? [Internet]. Vol. 60, *Clinical Chemistry*. *Clin Chem*; 2014 [pristupljeno 2021 Mar 20]. p. 78–87. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24255077/>
139. 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* [Internet]. 2013 Jul [pristupljeno 2021 Mar 20];33(7):643–9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23712453/>
140. 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. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [Internet]. Mosby Inc.; 2014 [pristupljeno 2021 Mar 18]. p. 527.e1-527.e17. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25111587/>
141. 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 [Internet]. Vol. 54, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. John Wiley and Sons Ltd; 2019 [pristupljeno 2021 Jun 25]. p. 442–51. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31124209/>
142. Amniocentesis - Mayo Clinic [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 25]. Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/amniocentesis/about/pac-20392914>
  143. Chorionic villus sampling - Mayo Clinic [Internet]. [pristupljeno 2021 Jun 25]. Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/chorionic-villus-sampling/about/pac-20393533>
  144. Kalousek DK, Vekemans M. Confined placental mosaicism [Internet]. Vol. 33, *Journal of Medical Genetics*. BMJ Publishing Group; 1996 [pristupljeno 2021 Jun 25]. p. 529–33. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8818935/>
  145. 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* [Internet]. 1959 Apr 4 [pristupljeno 2021 Jun 25];273(7075):711–3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13642858/>
  146. 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* [Internet]. 2007 [pristupljeno 2021 Apr 4];15:1105–14. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/>
  147. 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* [Internet]. 2016 Jul 1 [pristupljeno 2021 Jul 9];36(7):636–42. Dostupno na: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4832>
  148. 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* [Internet]. 2015 Jan 1 [pristupljeno 2021 Apr 28];212(1):79.e1-79.e9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25447960/>
  149. 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* [Internet]. 2013 Jun [pristupljeno 2021 Apr 28];33(6):569–74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23592485/>
  150. 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* [Internet]. 2014 [pristupljeno 2021 Apr 28];20(4):571–81. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667481/>

151. 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* [Internet]. 2015 Oct 1 [pristupljeno 2021 Apr 28];35(10):994–8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26211640/>
152. 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* [Internet]. 2017 Aug 30 [pristupljeno 2021 Apr 28];9(405). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28855395/>
153. 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* [Internet]. 2014 Jun 25 [pristupljeno 2021 Apr 25];3(3):679–92. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26237471/>
154. Bevilacqua E, Chen K, Wang Y, Doshi J, White K, de Marchin J, et al. Cell-free DNA analysis after reduction in multifetal pregnancy [Internet]. Vol. 55, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. John Wiley and Sons Ltd; 2020 [pristupljeno 2021 Apr 25]. p. 132–3. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180604/>
155. Harasim T, Rost I, Klein H-G. Current status of non-invasive prenatal testing (NIPT): genetic counseling, dominant methods and overall performance. *LaboratoriumsMedizin* [Internet]. 2016 Oct 1 [pristupljeno 2021 Jul 9];40(5):299–306. Dostupno na: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/labmed-2016-0038/html>
156. Dar P, Shani H, Evans MI. Cell-free DNA: Comparison of Technologies [Internet]. Vol. 36, *Clinics in Laboratory Medicine*. W.B. Saunders; 2016 [pristupljeno 2021 Apr 30]. p. 199–211. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27235906/>
157. 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* [Internet]. 2015 Oct 1 [pristupljeno 2021 Apr 29];35(10):999–1004. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26088833/>
158. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaidis 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* [Internet]. 2015 Jan 1 [pristupljeno 2021 Apr 29];45(1):61–6. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25297464/>
159. Han CS, Platt LD. Noninvasive prenatal testing: Need for informed enthusiasm [Internet]. Vol. 211, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2014 [pristupljeno 2021

Apr 29]. p. 577–80. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25459560/>

160. Norton ME, Biggio JR, Kuller JA, Blackwell SC. The role of ultrasound in women who undergo cell-free DNA screening. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Mar 1 [pristupljeno 2021 Apr 29];216(3):B2–7. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28108156/>
161. 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* [Internet]. 2019 Apr 1 [pristupljeno 2021 Apr 29];21(4):923–9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30214066/>
162. 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* [Internet]. 2018 [pristupljeno 2021 Apr 29];132(2):445–52. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29995739/>



## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 1996. godine u Šibeniku gdje sam završila osnovnu školu i Gimnaziju Antuna Vrančića - opći smjer. 2015. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica sam Dekanove nagrade za najbolju studenticu 5. godine studija medicine u akademskoj godini 2019./2020. Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom.