Kombinirani test probira na kromosomopatije ploda u KBC-u Split

Jakus, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:927692

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Jakus

KOMBINIRANI TEST PROBIRA NA KROMOSOMOPATIJE PLODA U KBC SPLIT

Diplomski rad

Akademska godina 2017./2018.

Mentor: Prof. prim. dr. sc. Damir Roje

Split, lipanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Jakus

KOMBINIRANI TEST PROBIRA NA KROMOSOMOPATIJE PLODA U KBC SPLIT

Diplomski rad

Akademska godina 2017./2018.

Mentor: Prof. prim. dr. sc. Damir Roje

Split, lipanj 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. KROMOSOMOPATIJE 2

1.1.1. Poremećaj broja kromosoma 2

1.1.2. Poremećaj strukture kromosoma 4

1.2. POSTUPNIK ANTENATALNOG TRAGANJA ZA KROMOSOMOPATIJAMA PLODA 5

1.2.1. Metode probira u medicini 5

1.2.1.1. Antenatalni probir na kromosomopatije ploda 6

1.2.2. Metode dokazivanja 7

1.2.2.1. Tehnika otkrivanja fetalnih stanica u majčinoj krvi 9

1.3. PROBIR TRUDNICA ZA INVAZIVNU ANTENATALNU DIJAGNOSTIKU KROMOSOMOPATIJA PLODA 10

1.3.1. Životna dob i dob trudnoće 10

1.3.2. Obiteljska i osobna anamneza 11

1.3.3. Biokemijski testovi probira na kromosomopatije ploda 11

1.3.3.1. Prvo tromjesečje 12

1.3.3.2. Drugo tromjesečje 14

1.3.3.2.1. Dvostruki, trostruki i četverostruki test probira 14

1.3.3.2.2. Mogućnost detekcije ostalih poremećaja 15

1.3.4. Ultrazvuk u probiru kromosomopatija 15

1.3.4.1. Prvo tromjesečje 15

1.3.4.1.1. Nuhalna prozirnost 16

1.3.4.1.2. Nosna kost 17

1.3.4.1.3. Venozni duktus 17

1.3.4.1.4. Ostale anomalije ploda uz aneuplodije 18

1.3.4.2. Drugo tromjesečje 18

1.3.5. Kombinacija ultrazvučnih i biokemijskih biljega kromosomopatija ploda u testovima probira 19

1.3.5.1. Kombinirani test probira 19

1.3.5.2. Integrirani i sekvencijski test probira 20

1.3.6 Probir analizom slobodne fetalne DNA iz periferne krvi trudnice 22

1.4. POSTUPAK U TRUDNICA S POVIŠENIM RIZIKOM OD KROMOSOMOPATIJA PLODA PREMA TESTOVIMA PROBIRA I UREDNIM KARIOGRAMOM 23

1.4.1. Kombinirani test 24

1.4.2. Biokemijski probirni testovi drugog tromjesečja 25

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE 26

2.1. Ciljevi istraživanja 27

2.2 Hipoteze 27

3. MATERIJALI I METODE 29

3.1. Ustroj istraživanja 30

3.2. Ispitanice 30

3.3. Metode prikupljanja podataka 30

3.4. Mjerenja i druga opažanja 30

3.5. Statistička analiza 30

4. REZULTATI 32

5. RASPRAVA 49

6. ZAKLJUČCI 56

7. POPIS CITIRANE LITERATURE 58

8. SAŽETAK 67

9. SUMMARY 70

10. ŽIVOTOPIS 73

Zahvaljujem se svom mentoru prof. prim. dr. sc. Damiru Roji na uloženom trudu, savjetima i strpljenju prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala obitelji, prijateljima i Vatri na bezuvjetnom razumijevanju i podršci tijekom studiranja.

1.UVOD

1.1. KROMOSOMOPATIJE

Kariotip je set kromosoma koji pripada jednoj stanici (1). Normalan broj kromosoma za biološku vrstu naziva se euploidija. Somatske stanice čovjeka u svojim jezgrama u fiziološkim okolnostima sadrže diploidan broj kromosoma (46 kromosoma). Autosomni kromosomi čine 22 para i jednaki su u muškaraca i žena. Jedan su par spolni kromosomi; XX u žene i XY u muškarca. Spolne stanice (gamete) imaju haploidan broj kromosoma. Muška gameta je spermij, a ženska jajna stanica (2). Spajanjem gameta u trenutku oplodnje nastaje novi organizam s diploidnim brojem kromosoma, pri čemu po jedan kromosom svakog para dobiva od pojedinog roditelja. Pravilnu identifikaciju svakog kromosoma omogućuju citogenetske metode, koje su okosnica u dijagnostici kromosomopatija (3).

Kromosomopatijama nazivamo promjene broja i/ili strukture autosomnih ili spolnih kromosoma. Velikim udjelom doprinose kongenitalnim abnormalnostima, mentalnoj retardaciji i drugim bolestima, a povezuju se i s nastankom zloćudnih tumora tijekom života (4). Kromosomopatije se mogu naći u 10% svih spermija i 25% jajnih stanica. Čest su nalaz u spontanim pobačajima (uzrokuju oko 50% fetalnih smrti do 20. tjedna trudnoće) i u mrtvorođenčadi (uzrokuju 6 do 13% fetalnih smrti od 20. tjedna trudnoće). Nalazimo ih u prosjeku u 1 od 140 živorođene djece. Učestalost bi bila 10 puta veća da se veliki dio ne gubi spontanim pobačajem (5).

1.1.1. Poremećaj broja kromosoma

Poremećaji broja kromosoma uključuju manjak ili višak jednog ili više kromosoma, što se naziva aneuploidija. Dodatak jednog ili više haploidnih kompleta kromosoma predstavlja polipoidiju (2).

Aneuploidije su najčešće kromosomopatije. Nastaju zbog nerazdvajanja homolognog kromosomskog para u mejozi tijekom gametogeneze, obično jajne stanice. Pri tom jedna gameta dobiva oba homologna kromosoma (disomija), a druga niti jedan (nulisomija) (2). Oplodnjom anomalne nulisomne gamete nastaje zigota s monosomijom za taj kromosom. Ako je riječ o autosomu, plod s monosomijom u pravilu nije sposoban za razvoj, pa redovito bude pobačen spontanim pobačajem. Ukoliko je riječ o spolnom kromosomu, oplodnjom nastaje zigota s kariotipom 45, X0, a fenotip takva djeteta odgovara kliničkoj slici Turnerova sindroma

(4). Trisomija je posljedica oplodnje disomne gamete nastale zbog nerazdvajanja homolognih kromosoma. Kromosomski komplet zigote s trisomijom sadrži jedan dodatni kromosom. Osim u mejozi tijekom gametogeneze, nerazdvajanje kromosoma može se dogoditi i u ranim mitotičkim diobama zigote. Takve pogrješke uzrokuju nastajanje dviju različitih staničnih populacija - euploidne i aneuploidne (mozaicizam) (2). Downov sindrom je najčešća trisomija s učestalosti od oko 1:650 živorođenih. Uzrokovan je viškom 21. kromosoma. Ostale autosomne trisomije u kojih je moguć razvoj živog ploda do porođaja su Patauov sindrom (trisomija 13) i Edwardsov sindrom (trisomija 18). Druge autosomne trisomije redovito rezultiraju ranim spontanim pobačajem. U pobačenih su plodova dosad nađene sve vrste trisomija. Trisomije spolnih kromosoma (X ili Y) uzrokuju blaže poremećaje, obično probleme s ponašanjem i fertilitetom (6). Stanični i molekularni mehanizmi koji uzrokuju mejotsko nerazdvajanje kromosoma nisu u potpunosti jasni. Žensko se novorođenče rađa s konačnim brojem primarnih oocita čije je sazrijevanje zaustavljeno u profazi prve mejotske diobe (tzv. mejotski arest). Nastavak diobe stanice slijedi tek u vrijeme ovulacije, do koje dolazi s vremenskim odmakom od 15 do 50 godina (2). Primarne oocite su neaktivne dugi niz godina, pa je najčešće tumačenje razloga kromosomskog nerazdvajanja vezano uz njihovo starenje. U tom su razdoblju izložene brojnim okolišnim utjecajima koji mogu poremetiti oogenezu. Ovo objašnjenje temelji se na dokumentiranoj povezanosti životne dobi majke s povećanim brojem potomaka s Downovim sindromom. Žene poslije 35. godine života imaju 15 puta veću šansu roditi dijete s Downovim sindromom u odnosu na prosjek populacije (7). Povećana učestalost trisomije 21 povezana je i s drugim rizičnim čimbenicima, kao što su autoimune bolesti majke, izloženost zračenju, određeni kromosomski heteromorfizmi majke, virusne infekcije, prehrambeni čimbenici i drugi (8).

Kromosomski komplet poliploidnog organizma sadrži nekoliko kopija haploidnog seta kromosoma. Ukupan broj kromosoma takve jedinke je 69 u triploidiji ili 92 u tetraploidiji. Poliplodija je normalna značajka nekih ljudskih stanica, primjerice jetre, miokarda i megakariocita (9). Poliploidna zigota nastaje kao posljedica nepravilne mejoze jajne stanice ili spermija, a najčešće zbog nerazdvajanja polarnog tjelešca jajne stanice ili u slučaju oplodnje diploidnim spermijem. Može nastati i ako dođe do oplodnje jajne stanice s dva spermija, tzv. dispermija (2). U ljudi su često pronađene u uzorcima spontanih pobačaja. Preživljenja dulja od polovice trudnoće vrlo su rijetka. Do danas je opisano samo nekoliko poliploidnih živorođenih s multiplim malformacijama, koji su umrli nedugo nakon rođenja (6).

1.1.2. Poremećaj strukture kromosoma

Strukturni kromosomski poremećaji odnose se na premještanja ili lomove jednog ili više dijelova kromosoma. Stopa spontanih kromosomskih lomova može se znatno povećati nakon izlaganja ionizirajućem zračenju ili kemijskim mutagenima, a povećana je i u nekim rijetkim nasljednim bolestima (1). Strukturni kromosomski poremećaji mogu biti balansirani ili nebalansirani. Ako je genski materijal sačuvan, a geni nisu strukturno oštećeni, radi se o mirnom nositelju balansiranog poremećaja koji će biti fenotipski normalan. Ako je došlo do loma u strukturnom genu, fenotipski učinak može biti vidljiv ovisno o funkciji pogođene regije. Nositelji balansiranih promjena imaju povećan rizik od stvaranja nebalansiranih gameta s viškom ili manjkom genetskog materijala, nakon čije oplodnje nastaje plod s patološkim kariotipom (3).

Strukturni kromosomski poremećaji koji uključuju jedan kromosom su: delecije, duplikacije, inverzije, izokromosomi i prstenasti kromosomi. Kod delecije dolazi do loma i gubitka kromosomskog materijala. Posljedica delecije je monosomija za izgubljeni dio kromosoma. Ako dođe do delecije velikog dijela kromosoma, vjerojatnost preživljenja ploda je iznimno mala. Smatra se da gubitak više od 2% ukupnog haploidnog genoma uzrokuje spontani pobačaj (2, 3). Primjer bolesti uzrokovane delecijom je *Cri du chat* sindrom. Nastaje zbog terminalne delecije kratkog kraka 5. kromosoma. Manifestira se brojnim malformacijama i teškom mentalnom retardacijom (4). Duplikacijom nazivamo udvostručenje dijela nekog kromosoma, što rezultira viškom genskog materijala. Inverzija nastaje nakon dvostrukog loma jednog kromosoma s naknadnim spajanjem odlomljenog dijela obrnutom orijentacijom (3). Kod izokromosoma nedostaje cijeli kromosomski krak, s potpunom duplikacijom drugog kraka. Najčešći izokromosom je X kromosom, odgovoran za 15% slučajeva Turnerova sindroma (1). Prstenasti kromosom je rezultat delecije na oba kraka kromosoma, nakon čega nastaju ljepljivi krajevi koji se spajaju zajedno tvoreći prsten (2).

Strukturni kromosomski poremećaji koji uključuju dva ili više kromosoma su premještanja dijela jednog kromosoma na drugi (translokacije) i izmjene dijelova kromosoma između dva kromosoma (recipročne translokacije) (6). Kod Robertsonove translokacije dolazi do centromernog spajanja dvaju akrocentričnih kromosoma (13, 14, 15, 21, 22) s gubitkom njihova kratkog kraka i satelitne regije. Ukupan broj kromosoma u takve jedinke je 45. Izgubljene kromosomske regije ne sadrže strukturno važne gene pa njihov gubitak nema

nikakav učinak na fenotip nosioca, ali postoji sklonost stvaranju nebalansiranih gameta. Ukoliko je majka nositeljica balansirane Robertsonove translokacije 14q21q, 10-15% njezinog potomstva imat će dvije kopije kromosoma 21 i dodatni translocirani kromosom s vezanim kromosomom 21 (ukupno tri kopije kromosoma 21), pa će imati fenotipska obilježja Downovog sindroma. Ako je otac nositelj iste translokacije, rizik od Downovog sindroma je oko 5%. Smatra se da abnormalni spermiji imaju manju šansu oploditi jajnu stanicu zbog smanjene pokretljivosti. Osim prethodno spomenutih kromosomskih nerazdvajanja i mozaicizma, translokacija je još jedan od mogućih načina nastanka Downovog sindroma (3).

1.2. POSTUPNIK ANTENATALNOG TRAGANJA ZA KROMOSOMOPATIJAMA PLODA

Metode antenatalnog otkrivanja kromosomopatija dijelimo na metode probira i metode dokazivanja kromosomopatija. Probirne metode su neinvazivne i provode se u *a priori* niskorizičnih trudnica. Cilj je utvrđivanje visine rizika od fetalnih kromosomopatija i opravdanosti primjene metoda dokazivanja. Metode dokazivanja kromosomopatija su redom invazivni postupci koje prati neizbježan rizik od mogućih komplikacija. Opravdane su samo u skupini visokorizičnih trudnica. Prednost im je to što rezultatom nedvosmisleno postavljaju dijagnozu (10, 11).

1.2.1. Metode probira u medicini

Pojam probira u medicini podrazumijeva sustavnu primjenu testa u definiranoj asimptomatskoj populaciji s ciljem otkrivanja osoba s povećanim rizikom za određeni poremećaj. Rezultat probira nije dijagnoza, nego samo izračunati rizik obolijevanja od neke bolesti (12). Probir je opravdan ako postoji daljnja dijagnostička obrada (metoda dokazivanja) na koju se upućuju osobe s pozitivnim rezultatom probira, a koja zbog cijene, mogućih komplikacija, složenosti ili nekog drugog razloga nije primjerena cijeloj populaciji. Nakon potvrde metodama dokazivanja, mora postojati odgovarajuće liječenje ili preventivna akcija da bi probir uopće imao smisla. Bolest za koju se provodi probir treba biti velike učestalosti u populaciji, a ukoliko je rijetka značaj joj mora biti velik. Cilj probira je prevencija ili liječenje bolesti u ranoj fazi, kada je ono jednostavnije i uspješnije. Zato se probir mora provoditi u

vremenski točno definiranoj fazi razvoja bolesti, pa je potrebno poznavati njezin prirodni tijek (13). Značajke „idealnog“ probira su: jednostavnost, niska cijena, neškodljivost, visoka osjetljivost i specifičnost, ponovljivost i pouzdanost. Prilikom odabira vrste probirnog testa potrebno je procijeniti njegovu valjanost na osnovi udjela detekcije stvarno bolesnih među svim ispitanim (osjetljivost) i udjela lažno-pozitivnih rezultata (1 - specifičnost). Poznavanje pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti omogućuje tumačenje značenja dobivenog rezultata za pojedinog pacijenta. Pozitivna prediktivna vrijednost je vjerojatnost da je osoba stvarno bolesna u slučaju pozitivnog rezultata. Negativna prediktivna vrijednost je vjerojatnost da je osoba stvarno zdrava ako joj je rezultat testa negativan. Važan pojam je granična vrijednost probira (engl. *cut - off*), koja predstavlja dogovorno odabran rizik u distinkciji visokorizičnih od niskorizičnih za određenu bolest. Odabrana granična vrijednost određuje odnos osjetljivosti i specifičnosti. Granična vrijednost postavljena na višoj razini rizika umanjuje osjetljivost i povećava specifičnost, a vrijedi i obrnuto (14) .

1.2.1.1. Antenatalni probir na kromosomopatije ploda

Antenatalni probirni testovi na kromosomopatije ploda provode se na velikim populacijama *a priori* niskorizičnih trudnica. Niskorizičnu populaciju čini velika većina trudnica, unutar koje se nalazi oko 75% svih kromosomopatija. Cilj probira je iz spomenute populacije izdvojiti skupinu s povećanim rizikom od kromosomopatija ploda, za koje postoji opravdanje daljnjeg dijagnostičkog postupka (15).

Antenatalni probirni testovi uzimaju u obzir podatke o životnoj dobi trudnice, obiteljskoj anamnezi, anamnezi prethodnih trudnoća, eventualnim komorbiditetima trudnice te biokemijskim i ultrazvučnim biljezima kromosomopatija. Ti se podatci, pojedinačno ili u raznim kombinacijama (ovisno o vrsti probirnog testa), upotrebljavaju za izračun rizika od fetalnih kromosomopatija pomoću razvijenih matematičkih modela (16).

Fiziološke vrijednosti biokemijskih biljega kromosomopatija značajno se mijenjaju ovisno o dobi trudnoće, što se može standardizirati prikazivanjem izmjerenih koncentracija u obliku MoM (engl. *Multiple Of the Median*) vrijednosti (višekratnik medijana razina u neugroženim trudnoćama). Riječ je o matematičkoj preinaci koja se izračunava dijeljenjem vrijednosti biljega izmjerenog u pojedine trudnice s medijanom vrijednosti biljega euploidnih kontrolnih trudnoća iste dobi trudnoće. Dva puta veća koncentracija biokemijskih biljega u

odnosu na očekivanu vrijednost predstavlja 2.0 MoM-a, a dvostruko manja odgovara vrijednosti 0.5 MoM-a. MoM vrijednosti se upotrebljavaju za izračun omjera vjerojatnosti, koji se dobije dijeljenjem udjela plodova s aneuploidijom s udjelom zdravih plodova iste MoM vrijednosti (17).

U svakoj kalkulaciji rizika, točan izračun dobi trudnoće od ključnog je značaja. Polazište za izračun rizika u svim matematičkim programima jest *a priori* rizik određen životnom dobi i dobi trudnoće, koji se u daljnjem postupku množi s omjerima vjerojatnosti za svaki biokemijski i/ili ultrazvučni biljeg, ovisno o vrsti probirnog testa. Rezultat predstavlja konačan rizik za pojedinu trudnicu. Računalni programi obično odvojeno računaju rizike za najčešće aneuplodije (18).

Opravdanost provedbe metoda dokazivanja, što podrazumijeva invazivne postupke, određena je dogovorenom vrijednosti graničnog rizika koja u većini slučajeva iznosi 1:250, čime je izjednačena s *a priori* rizikom trudnice od 36 godina (6). Uspješnost probirnog testa određuje se na temelju stupnja detekcije (osjetljivosti), uz definirani udio lažno pozitivnih nalaza od 5%. Važno je napomenuti da, zbog relativno niske pozitivne prediktivne vrijednosti probirnih testova, većina visokorizičnih trudnica realno ne nosi dijete s kromosomopatijom (19).

Pojava pozitivnog rezultata probira na kromosomopatije ploda vjerojatnija je u starijih trudnica zbog većeg *a priori* rizika po životnoj dobi. Posljedica toga je veća stopa detekcije i više lažno pozitivnih rezultata s porastom životne dobi (20).

1.2.2. Metode dokazivanja

Metode dokazivanja obuhvaćaju različite invazivne postupke s ciljem dobivanja biološkog materijala fetalnog podrijetla za daljnju citogenetičku obradu. Uzorkovani materijal može biti: plodova voda, korionske resice, tkivo posteljice ili krv iz pupkovine. Upotrebljavane metode su: amniocenteza, biopsija korionskih resica, placentocenteza i kordocenteza (10).

Rana amniocenteza (RACZ) najstarija je i najčešće izvođena invazivna metoda antenatalne dijagnostike kromosomopatija. Aspiracijom se uzorkuje plodova voda iz koje se kultiviraju fetalne stanice za kromosomsku analizu. Izvodi se najčešće između 15. i 19. tjedna trudnoće. Konačan rezultat moguće je dobiti za 2-3 tjedna. Do brze preliminarne dijagnoze

danas se može doći metodom flourescentne in situ hibridizacije (FISH), čiji je nalaz gotov za 1-2 dana. Budući da ova metoda daje podatke samo o pojedinom ciljanom kromosomu(ima), za konačnu dijagnozu ipak je potrebna kultura stanica. RACZ se izvodi uz ultrazvučno navođenje, slobodnom rukom ili vođenom iglom. Najvažnija komplikacija zahvata je spontani pobačaj s učestalosti od 0,5 do 1%, a opisano je i vaginalno krvarenje, otjecanje plodove vode, infekcije i ozljede ploda. Kod rane-rane amniocenteza (prije 15. tjedna trudnoće) je zbog većeg broja i vijabilnosti stanica rezultat moguće dobiti za 7-10 dana, ali je veći rizik od spontanih pobačaja nakon zahvata razlog zašto ista nije zamijenila RACZ (6).

Biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villus sampling*; CVS) izvodi se od 10. do 12. tjedna trudnoće transcervikalnim ili transabdominalnim putem uz ultrazvučno navođenje. Iz dobivenog korionskog tkiva metodom izravne kariotipizacije moguće je za 3 dana dobiti kariogram. U slučaju patološkog nalaza postoji mogućnost prekida trudnoće u prvom tromjesečju, što je tehnički i psihološki manje agresivan postupak u usporedbi s drugim tromjesečjem. Kod postojanja teškog oligohidramnija CVS je jedina izvediva metoda antenatalne dijagnostike prvog ili ranog drugog tromjesečja. Učestalost spontanih pobačaja i ostalih komplikacija ista je kao kod RACZ. Izvođenje zahvata u 8. i 9. tjednu trudnoće povezano je s većom učestalosti malformacija udova ploda. CVS-om se nalazi više abnormalnosti u odnosu na RACZ jer se izvodi ranije, prije nego bi eventualno nastupio spontani pobačaj zbog moguće kromosomopatije (21).

Biopsija posteljice (placentocenteza, kasni CVS) je zahvat koji se izvodi u drugom i trećem tromjesečju. Nalaz je moguće dobiti već nakon 3 dana. Učestalost spontanih pobačaja nakon zahvata manja je u odnosu na prethodno spomenute metode (0,3 do 0,4%) (6).

Problem korionskog i posteljičnog tkiva je veća učestalost mozaicizma (do 2%) u usporedbi s plodovom vodom (do 1,5%). Mozaicizam može nastati u ranom razvoju embrija, ali ukoliko mutacija nastane u trofoblastu nakon diferencijacije od embrioblasta, promjena se nalazi samo u posteljici uz uredan kariogram stanica ploda. U tim je situacijama nužan poseban oprez prilikom interpretacije rezultata (3). Preporuka je da se nakon dobivenog kariotipa s mozaicizmom iz tkiva trofoblasnog podrijetla učini RACZ ili kordocenteza, koje tek u 50% trudnica potvrde nalaz. Mozaicizam ograničen samo na posteljicu može utjecati na negativan ishod trudnoće zbog moguće disfunkcije posteljice, intrauterinog zastoja rasta i preeklampsije (22).

Kordocenteza (perkutana aspiracija krvi pupkovine) primjenjuje se za dobivanje krvi ploda obično nakon 18. tjedna zbog veće učestalosti komplikacija ako se napravi ranije. Izvodi se uz ultrazvučno navođenje kroz trbušnu stjenku trudnice. Nalaz se dobije za 2-3 dana. Učestalost komplikacija je 0,7 odnosno 2,8%, a u visokorizičnim trudnoćama doseže do 25%. Prednost kordocenteze je izravan pristup fetalnom tkivu i brzo dobivanje rezultata. Najteža komplikacija zahvata je smrt ploda, a nerijetko se pojavljuje fetalna bradikardija te krvarenje iz mjesta punkcije. Kordocenteza se zbog kariotipizacije izvodi u slučajevima kada se citogenetičkom analizom plodove vode ili korionskih resica dobije mozaicizam ili kada se nije mogao dobiti nalaz zbog neuspjelih kultura (6).

Rjeđe se izvode punkcijski i biopsijski zahvati kao što je celocenteza (3).

Prema smjernicama Hrvatskog društva za perinatalnu medicinu iz 2010. godine, indikacije za invazivnu antenatalnu dijagnostiku kromosomopatija ploda su: majčina dob (≥36 godina) u trenutku zanošenja, povišeni rizik prema probirnom testu prvog ili drugog tromjesečja (>1:250), postojanje ultrazvučnih biljega kromosomopatija ploda te pozitivna osobna ili obiteljska anamneza (15). Konačnu odluku o provedbi invazivne dijagnostike donosi trudnica s partnerom, nakon što je od strane ginekologa i/ili kliničkog genetičara potpuno informirana o smislu, koristima i mogućim komplikacijama predloženog zahvata. Ukoliko ne bi bila spremna u slučaju patološkog kariograma ploda podnijeti zahtjev za prekid trudnoće iz medicinskih razloga, trudnicu ne treba slati ni na probirne testove. Osnovni je cilj svakog profesionalca u svakom trenutku poštovati želju trudnice i tome podrediti cijeli dijagnostički postupak. Obzirom na kompleksnost problema, uputno je u tim uključiti i psihologa (10).

1.2.2.1. Tehnika otkrivanja fetalnih stanica u majčinoj krvi

Posljednjih desetljeća intenzivno je istraživana mogućnost neinvazivne antenatalne dijagnostike kromosomopatija analizom slobodnih fetalnih stanica iz majčine krvi. Tijekom trudnoće fetalne stanice prelaze u majčin krvotok, ali njihova niska koncentracija (1 stanica/mL majčine krvi) ograničava upotrebu u dijagnostičke svrhe. Dokazano je da je zbog narušene placentarne barijere broj fetalnih stanica u majčinoj krvi značajno veći u trudnoćama s kromosomopatijama, pogotovo s trisomijom 21 (23). Iz majčine krvi moguće je izolirati fetalne leukocite, stanice trofoblasta i eritroblaste. Stanice od najvećeg interesa su eritroblasti jer se stvaraju samo u plodu, a zbog kratkog poluživota ne postoji mogućnost da potječu iz prethodnih

trudnoća. Nedostatak upotrebe leukocita jest činjenica da imaju sposobnost opstojnosti godinama, pa mogu potjecati iz prethodnih trudnoća (24). Mogućnost analize stanica trofoblasta primamljiva je zbog njihove terminalne diferenciranosti, međutim u 1% slučajeva nađe se mozaicizam posteljice uz normalan fetalni kariotip (25).

Najrabljenije metode odvajanja fetalnih stanica iz majčine krvi su magnetsko i flourescentno aktivirano razvrstavanje (MACS i FACS). Ograničenja u širokoj primjeni su cijena, složenost, velika stopa neuspješne obrade uzoraka i realna mogućnost kontaminacije uzorka stanicama majke (25).

1.3. PROBIR TRUDNICA ZA INVAZIVNU ANTENATALNU DIJAGNOSTIKU KROMOSOMOPATIJA PLODA

1.3.1. Životna dob i dob trudnoće

Rizik od kromosomopatija ploda raste sa životnom dobi majke, što je dokazano u brojnim istraživanjima, na mnogim populacijama i u različitim vremenskim razdobljima. Uznapredovala životna dob majke povećava rizik od rađanja djeteta sa svim autosomnim aneuploidijama. Rizik nije povećan za aneuploidije spolnih kromosoma i triploidije (19). U trudnica mlađih od 20 godina rizik od rađanja djeteta s trisomijom 21 manji je od 1:1667. U 35. godini života rizik iznosi 1:385, u 40. godini 1:106, a u 45. godini 1:20 (6, 26).

Prije uvođenja biokemijskih i ultrazvučnih biljega u rutinsko antenatalno traganje za kromosomopatijama, jedina dostupna metoda probira temeljila se na životnoj dobi i opterećenoj anamnezi trudnice. Svim je trudnicama starim 36 godina i više nuđena jedna od invazivnih metoda antenatalne dijagnostike. Takvom vrstom probira moguće je dijagnosticirati samo 30% slučajeva Downovog sindroma. Preostalih 70% djece s Downovim sindromom rađaju majke mlađe životne dobi (10).

Rizik od rađanja djeteta s kromosomopatijom umanjuje se napredovanjem trudnoće zbog relativno velikog udjela fetalnih smrti; do 30% prije 12. tjedna trudnoće i dodatnih 20% nakon 16. tjedna (27).

1.3.2. Obiteljska i osobna anamneza

Kromosomopatije u većini slučajeva nisu nasljedne bolesti, već nastaju kao posljedica novonastale promjene kromosoma u gametama. Pozitivna osobna i obiteljska anamneza kromosomopatija u većini slučajeva nemaju značajan utjecaj na vjerojatnost rađanja djeteta s kromosomopatijom (28).

Literatura opisuje nekoliko mogućih razloga ponavljanja Downovog sindroma u potomstva istih roditelja: a) gonadalni mozaicizam fenotipski zdravih roditelja, b) rizični čimbenici za mejotičku grešku u roditelja, c) starija životna dob trudnice, d) balansirane translokacije u obitelji, i e) ponavljanje kao posljedica slučajnosti. Ako roditelji imaju dijete s Downovim sindromom, smatra se da je rizik za sljedeću trudnoću dvostruko veći od rizika prema životnoj dobi. Rizik nije povećan za ostale članove obitelji, osim u nositelja iste balansirane translokacije (28, 29).

Važnost pozitivne obiteljske i osobne anamneze obično je precijenjena. Stoga se u takvim slučajevima roditelje mora uputiti na genetičko savjetovanje (30).

1.3.3. Biokemijski testovi probira na kromosomopatije ploda

Posteljica i plod nastaju iz iste osnove, što znači ujednačen patološki kariogram ukoliko postoji kromosomopatija. U slučaju posteljice, promijenjena struktura kromosoma rezultira izmjenom funkcije oslobađanja hormona i drugih biokemijskih čimbenika u krvotok majke. Stoga su potencijalni biljezi aneuploidija u majčinom krvotoku svi proteini, lipidi i ugljikohidrati ploda koji se stvaraju i/ili metaboliziraju u posteljici (31).

Biokemijski probir kromosomopatija temelji se na otkrivanju odstupanja u koncentraciji biljega u serumu trudnice u odnosu na očekivane vrijednosti zdrave populacije. Ograničena osjetljivost i specifičnost biokemijskog probira je rezultat bioloških i analitičkih varijacija pojedinih biljega aneuploidija ploda u majčinom krvotoku. U biološke čimbenike varijacija ubrajaju se životna dob, tjelesna težina, rasna i etnička pripadnost, pušenje i kronične metaboličke bolesti (npr. dijabetes melitus). Postupci uzorkovanja, pohrane i transporta te svojstva imunokemijskih metoda sadrže potencijalnu analitičku varijaciju. U matematičkom

programu za izračun rizika moguće je korekcijama umanjiti utjecaj nekih bioloških čimbenika na razinu biokemijskih biljega, ali ne i potpuno eliminirati navedeni *bias* (32).

U normalnoj blizanačkoj trudnoći razine biokemijskih biljega su otprilike dvostruko veće u odnosu na jednoplodne trudnoće. Nemoguće je razlikovati u kojoj mjeri pojedini plod pridonosi izmjerenoj koncentraciji biokemijskih biljega u majčinoj krvi te izračunati zasebne biokemijske rizike. Rezultat probira je rizik specifičan za trudnoću, a ne za pojedini plod. Stopa detekcije za višeplodne trudnoće je, uz više lažno pozitivnih nalaza, manja u odnosu na jednoplodne (19).

1.3.3.1. Prvo tromjesečje

Probirni testovi prvog tromjesečja danas predstavljaju zlatni standard antenatalnog traganja za kromosomopatijama zbog velike osjetljivosti i ranog dobivanja rezultata. Razvijeni su i uvedeni u kliničku praksu kasnije od metoda drugog tromjesečja. Od istraživanih biokemijskih biljega, slobodna β podjedinica humanog korionskog gonadotopina (β-hCG) i uz trudnoću vezani plazmatski protein A (engl. *pregnancy associated protein A;* PAPP-A) pokazali su se najvrjednijima (33, 34).

hCG je glikoprotein normalno prisutan u krvi i urinu isključivo tijekom trudnoće. Izlučuje ga sinciciotrofoblast. Po kemijskoj građi sastoji se od α i β podjedinice. Osnovna funkcija hCG-a u ranoj trudnoći je podržavanje žutog tijela u proizvodnji progesterona dok tu funkciju ne preuzme posteljica. Posreduje u brojnim posteljičnim, majčinim i fetalnim funkcijama. U serumu trudnica koncentracija slobodnog β-hCG-a doseže vršnu vrijednost do 12. tjedna trudnoće. Slijedi naglo sniženje na oko 10% maksimalne koncentracije, kakva ostaje do porođaja (33). Iako hCG nije kodiran na kromosomu 21, čini se da je s njim povezana ekspresija gena za α i β podjedinice. Stanice trofoblasta s trisomijom 21 sadržavaju više mRNA specifičnih za α i β lance hCG-a u odnosu na euploidne trudnoće, zbog čega je koncentracija slobodnog β-hCG-a povećana u trudnoćama s Downovim sindromom. Promijenjen razvoj posteljice u trudnoćama s Edwardsovim i Patauovim sindromom rezultira nižim vrijednostima β-hCG-a. Aneuploidije spolnih kromosoma prati nepromijenjena koncentracija β-hCG-a. Slobodni β-hCG upotrebljava se kao biljeg kromosomopatija u prvom i drugom tromjesečju, dok je ukupni hCG koristan samo u drugom tromjesečju. Na osnovi slobodnog β-hCG i životne

dobi trudnice, stopa detekcije Downovog sindroma iznosi 42%, uz 5% lažno pozitivnih nalaza (32).

PAPP-A je glikoprotein kojeg proizvode sinciciotrofoblast i decidua tijekom trudnoće. Kao proteaza transportnog globulina inzulinu sličnog čimbenika rasta (*engl. IGF binding globulin*), isti povećava bioraspoloživost IGF-a. Time mijenja invazivnost trofoblasta i dinamiku fetalnog rasta te modulira transport glukoze i aminokiselina u posteljicu. U normalnoj trudnoći koncentracija PAPP-A u serumu raste s dobi trudnoće. Koncentracija PAPP-A snižena je u svim aneuploidijama zbog promijenjene funkcije posteljice. Mjerenjem ovog proteina, uz uvažavanje dobi trudnice, moguće je detektirati 52% slučajeva Downovog sindroma, uz 5% lažno pozitivnih rezultata (34).

Probir na Downov sindrom upotrebom majčine životne dobi, slobodnog β-hCG-a i PAPP-A tijekom prvog tromjesečja ima stopu detekcije od 65%, s 5% lažno pozitivnih nalaza. Biokemijski probir prvog tromjesečja rijetko se klinički primjenjuje u samostalnoj formi, već je obično sastavni dio kombiniranog testa. Pouzdanost PAPP-A kao biokemijskog biljega doseže maksimum u 9., 10. i 11. tjednu trudnoće zbog veće razlike u koncentraciji PAPP-A između trisomičnih i euploidnih trudnoća u navedenom razdoblju u odnosu na kasnije. Iako se razlika slobodnog β-hCG između trisomičnih i euploidnih trudnoća povećava s dobi trudnoće, istraživanja su pokazala da je važnost te razlike manja od razlike PAPP-A. Izvođenjem testa od 10. do 14. tjedna trudnoće postiže se najmanja greška kombiniranja oba biljega (33).

Osim β-hCG-a i PAPP-A, pronađeni su i drugi biljezi kromosomopatija primjenjivi u prvom tromjesečju. Najpoznati je disintegrin i metaloproteinaza 12 (ADAM 12), biomarker sintetiziran u posteljici čija je koncentracija snižena u najčešćim aneuploidijama. Istraživani su još: placentarni čimbenik rasta (PIGF), alfa fetoprotein (AFP), ukupni hCG, placentarni hormon rasta (PGH) i mnogi drugi. Dosadašnja istraživanja pokazala su da uključivanje spomenutih biljega u probir prvog tromjesečja ne povećava stopu detekcije kromosomopatija (35).

1.3.3.2. Drugo tromjesečje

1.3.3.2.1. Dvostruki, trostruki i četverostruki test probira

Biokemijski biljezi u svrhu probira na kromosomopatije ploda tijekom drugog tromjesečja u Hrvatskoj se određuju od 1994. godine, najprije kao dio dvostrukog, a od 1996. i trostrukog testa (36). Probir se temelji na određivanju koncentracije dvaju, triju ili četiriju biokemijskih biljega. Dobivene vrijednosti potom se upotrebljavaju za izračunavanje rizika od kromosomopatija ploda, uzimajući u obzir *a priori* rizik majke po životnoj dobi. Dvostruki test mjeri koncentraciju α-fetoproteina (AFP) i ukupnog hCG-a ili njegove slobodne β podjedinice. Trostrukom testu dodan je nekonjugirani estriol (uE3), a četverostrukom i inhibin A. Koncentracije navedenih hormon prije konačnog izračuna preračunavaju se u MoM vrijednosti, jednako postupku obrade biljega prvog tromjesečja (37).

AFP je glavni protein plazme u fetalnom razdoblju. Ima ulogu osmotičke regulacije, imuosupresije i transportnog proteina. Stvara ga fetalna jetra, a u manjim količinama probavni sustav i žumanjčana vreća. Iz fetalnih tkiva dospijeva u fetalni krvotok, likvor, žuč i amnijsku tekućinu. U majčin krvotok prelazi transplacentarno i transmembranski. U trudnoći s Downovim sindromom, zbog promijenjene funkcije fetalnih bubrega, AFP se manje izlučuje u amnijsku tekućinu te u krvotok majke dolazi u manjim koncentracijama (32).

uE3 je količinski dominantan estrogen u trudnoći. Za njegovu sintezu potrebna je interakcija enzima fetalne nadbubrežne žlijezde, jetre i posteljice. U trudnoći s Downovim sindromom koncentracija estriola u krvotoku majke je snižena (31).

Inhibin A je glikoprotein kojeg u trudnoći najprije stvara žuto tijelo, a zatim posteljica. Točna uloga tijekom trudnoće nije poznata. Pretpostavlja se da povećana koncentracija hCG-a stimulira njegovu proizvodnju. Inhibin A potom povratnom spregom potiskuje daljnje otpuštanje hCG-a, nakon čega se smanjeno otpušta i inhibin A. Moguće je da ovaj mehanizam djeluje oslabljeno u trudnoćama s Downovim sindromom, pa postoje povišene razine inhibina A u krvotoku majke (31).

Optimalno razdoblje za izvođenje testova je od 15. do 17. tjedna trudnoće, iako se isti mogu provesti sve do 22. tjedna. Trudnice kojima izračunati rizik premašuje graničnu vrijednost upućuju se na invazivnu dijagnostiku, najčešće RACZ (38). Uz 5% lažno pozitivnih nalaza,

stopa detekcije Downovog sindroma iznosi oko 60% za dvostruki, oko 70% za trostruki te oko 80% za četverostruki test (37).

1.3.3.2.2. Mogućnost detekcije ostalih poremećaja

Biokemijskim testovima probira drugog tromjesečja moguće je, osim kromosomopatija, detektirati i neke druge poremećaje. Određivanje AFP-a omogućuje izračunavanje rizika od defekata neuralne cijevi i prednje trbušne stjenke. Nepotpuno zatvaranje neuralne cijevi ploda ima za posljedicu veću izmjenu AFP-a između likvora i plodove vode. AFP je vrlo osjetljiv pokazatelj oštećenja neuralne cijevi i prednje trbušne stjenke, zbog čega je poželjan dio svakog biokemijskog probira drugog tromjesečja (32).

Genetički poremećaji vezani uz nepravilnu sintezu uE3, kao što su deficijencija steroidne sulfataze i Smith-Lemli-Opitz sindrom, mogu biti prepoznati u okviru biokemijskog probira drugog tromjesečja (39, 40).

1.3.4. Ultrazvuk u probiru kromosomopatija

1.3.4.1. Prvo tromjesečje

Rutinski ultrazvučni pregled tijekom prvog tromjesečja izvodi se s ciljem točnog određivanja dobi trudnoće mjerenjem udaljenost tjeme-trtica, potvrde vitalnosti trudnoće, utvrđivanja višeplodove trudnoće te detekcije određenih anatomskih fetalnih abnormalnosti i/ili biljega kromosomopatija (engl. *mini anomaly scan*) (41). Optimalno vrijeme pregleda je između 11. i 14. tjedana trudnoće. Donju granicu određuje tehničko ograničenje prikaza morfoloških odlika ploda, a gornju mogućnost povlačenja ranije postojane povećane nuhalne prozirnosti (42). Već tada je moguće otkriti velike anomalije (lat. *malformationes maiores*) kao gastroshizu, omphalocelu, meningo i meningomijelocele, veće anomalije ekstremiteta, anencefalus i slično. Ultrazvučni biljezi kromosomopatija prvog tromjesečja su zadebljana nuhalna prozirnost, nerazvijena nosna kost, abnormalan protok kroz venozni duktus, hiperehogeno crijevo, povećan fronto-maksilarni kut i mnogi drugi. Nuhalna je prozirnost od daleko najvećeg značaja, dok se ostali koriste kao pomoćni biljezi ili su samo od akademskog značaja (43).

1.3.4.1.1. Nuhalna prozirnost

Nuhalna prozirnost (engl. *nuchal translucency*; NP) je normalan sloj tekućine ispod kože nuhalne regije koji se različitim opsegom širi prema glavi i vratu ploda. Mjeri se ultrazvukom, najčešće transabdominalnom sondom, u sagitalnom presjeku s plodom u fleksijski neutralnom položaju (42). Ranih 1990.-ih godina dokazana je povezanost zadebljane NP u prvom tromjesečju s povećanim rizikom od rađanja djeteta s Downovim sindromom (19). Zadebljana NP korisna je u detekciji svih autosomnih trisomija, a uz uredan nalaz kariograma češće se susreće uz srčane greške i neke genopatije (43, 44). NP najčešće nestaje tijekom drugog tromjesečja. U slučaju zadebljane NP u prvom tromjesečju, nestanak ne umanjuje rizik od kromosomopatija ploda. Rjeđe perzistira ili progredira u nuhalni edem odnosno cistični higrom s/bez generaliziranog hidropsa. Čimbenici poput rase, pariteta, pušenja, dijabetesa, primjene metoda asistirane reprodukcije, krvarenja tijekom trudnoće ili spola ploda ne utječu na vrijednost NP (19). Iako mehanizam nastanka nije sasvim jasan, predloženo je nekoliko mogućih uzroka koji se vjerojatno preklapaju: a) kardiovaskularne abnormalnosti, b) abnormalnosti vezivnog tkiva, c) abnormalnosti limfatičnog sustava, d) porast intratorakalnog tlaka, e) fetalna hipoproteinemija, f) fetalna anemija i g) infekcija (43). NP je najmoćniji samostalni biljeg u probiru kromosomopatija, zbog čega je redovito uključen u probirne testove prvog tromjesečja. Uzimajući u obzir samo debljinu NP i dob trudnice, stopa detekcije Downovog sindroma iznosi 75%, uz 5% lažno pozitivnih nalaza. Normalna vrijednost NP raste s dobi trudnoće, pa je poznavanje tog čimbenika od primarnog značaja (45). Minimalna udaljenost tjeme trtica ploda trebala bi u trenutku mjerenja biti 45 mm, a maksimalna 84 mm. Medijan i 95. centila debljine nuhalnog nabora kod udaljenosti tjeme trtica od 45 mm iznose 1,2 i 2,1 mm, a kod udaljenosti tjeme trtica 84 mm iznose 1,9 i 2,7 mm (46). Vjerojatnost postojanja kromosomskih i drugih abnormalnosti povezana je s debljinom NP, a ne s njezinim samim postojanjem. Rizik od fetalnih kromosomskih i drugih abnormalnosti iznosi 5% uz NP do 3,4 mm (95. centila), 30% za NP od 3,5 do 4,4 mm, a više od 50%, ukoliko je veći od 4,5 mm (43). Indikacija za RACZ postoji uz NP veću od 99. centile (oko 3,5 mm), kao i u slučaju rizika većeg od granične vrijednosti prema izračunu matematičkim programima (47). U 5 do 10% slučajeva dojam lažnog zadebljanja NP može biti posljedica omotane pupčane vrpce oko vrata ploda (45). Debljina NP neovisna je o serumskim biokemijskim biljezima, zbog čega se mogu kombinirati u jedinstvene izračune s većom osjetljivosti, bez dodatnih *biasa*. Nuhalna

prozirnost ima važnu ulogu u detekciji kromosomopatija u višeplodnim trudnoćama zbog mogućnosti mjerenja u svakog pojedinog ploda (19).

1.3.4.1.2. Nosna kost

Antropometrijske studije opisuju kratak korijen nosa u 50% pacijenata s Downovim sindromom. Od 11. do 14. tjedna trudnoće nosna kost nije vidljiva ultrazvukom u 60-70% plodova s trisomijom 21 te 2% onih urednog kariograma (19). Nosnu kost nije moguće vizualizirati u 55% plodova s trisomijom 18, 34% plodova s trisomijom 13 i 11% plodova s Turnerovim sindromom, ali ne i kod triploidije. Primarni praktični zadatak ultrazvučnog pregleda nosne kosti u prvom tromjesečju jest određivanje njezine prisutnosti ili odsutnosti, dok je mjerenje duljine od sekundarnog značaja. Prevalencija odsutnosti nosne kosti smanjuje se s porastom dobi trudnoće, kako u fetusa s kromosomopatijom, tako i u kromosomski urednih plodova. Mjerenje njezine duljine tijekom drugog tromjesečja nije se pokazalo učinkovitim (45). Budući da je prevalencija odsutnosti nosne kosti veća u crnaca i Azijata nego u bijelaca, prilikom procjene rizika potrebno je uzeti u obzir rasu trudnice. Prisutnost ili odsutnost nosne kosti neovisne su o biokemijskim biljezima kromosomopatija (48).

1.3.4.1.3. Venozni duktus

Pupčana vena prenosi oksigeniranu krv iz posteljice u plod. Preko dvije trećine krvi ulazi u fetalnu jetru, dok ostatak skreće u donju šuplju venu kroz venozni duktus (lat. *ductus venosus Arantii*) i nastavlja u desnu pretklijetku ploda. Protok kroz ductus venosus moguće je prikazati obojenim doplerom, kojim vizualiziramo karakteristične valove visoke brzine protoka tijekom sistole (S val) i dijastole (D val). Val tijekom kontrakcije pretklijetke, kada protok prema srcu još postoji, ali je brzina najmanja, zove se A val i slijedi nakon D vala (19). U 80% plodova s trisomijom 21, ali i 5% kromosomski normalnih plodova, pronalaze se abnormalnosti protoka kroz venozni duktus, najčešće A vala. Abnormalan protok kroz venozni duktus povezan je i s trisomijama 13, 18 te s Turnerovim sindromom (43). Točan razlog ovih promjena nije poznat. Pretpostavlja se da nastaje zbog srčanih anomalija plodova s kromosomopatijom koje rezultiraju povećanom rigidnošću miokarda. Zbog toga je tlak punjenja desne pretklijetke i klijetke povećan, što dovodi do porasta centralnog venskog tlaka i u konačnici do odsutnosti ili obrnutog protoka kroz venozni duktus (D i A val). Prevalencija biljega raste s dobi trudnoće.

Abnormalni je protok kroz ductus venosus, osim s kromosomopatijama, povezan i s izoliranim fetalnim srčanim greškama (45).

1.3.4.1.4. Ostale anomalije ploda uz aneuplodije

U dijela plodova s trisomijom 21 može se pronaći kratka gornja čeljust, povećan fronto-maksilarni kut, malene uške, kratka bedrena i nadlaktična kost te trikuspidalna regurgitacija. Trisomiju 18 često prati povećan fronto-maksilarni kut, intrauterini zastoj rasta, bradikardija, trikuspidalna regurgitacija, egzoftalmus te jedna pupčana arterija. Trisomija 13 povezana je s povećanim fronto-maksilarnim kutom, fetalnom tahikardijom, trikuspidalnom regurgitacijom, intrauterinim zastojem rasta, megacistom, holoprozencefalijom, egzoftalmusom i trikuspidalnom regurgitacijom (49). Turnerov sindrom često prati fetalna tahikardija, intrauterini zastoj rasta te trikuspidalna regurgitacija (50).

1.3.4.2. Drugo tromjesečje

Ultrazvučni pregled morfologije ploda tijekom drugog tromjesečja (engl. *anomaly scan*) rutinski se izvodi u svih trudnica s ciljem detaljnog uvida u fetalnu anatomiju. Pregled je najbolje učiniti u razdoblju između 18. i 21. tjedna trudnoće. Evaluaciju određenih anatomskih struktura prije 18. tjedna nije moguće jednako kvalitetno izvesti. Pregled bi trebalo provesti prije navršenog 22. tjedna, nakon čega u Republici Hrvatskoj postoji zakonska zabrana prekida trudnoće neovisno o mogućim anomalijama (51). Svrha pregleda je potvrditi ili isključiti postojanje velikih strukturnih abnormalnosti ploda i biljega kromosomopatija manjeg značaja, poznatijih kao „meki“ biljezi (engl. *soft marker*) (52). Veće strukturne anomalije povezane s kromosomopatijama su srčane greške, atrezija dvanaesnika, cistični higrom, omphalocela te anomalije središnjeg živčanog sustava. Pronalaze se u otprilike 20% plodova s Downovim sindromom te u većine onih s Edwardsovim i Patauovim sindromom. „Meki“ biljezi su: proširenje bubrežne nakapnice, hiperehogeno crijevo, cista korioidnog pleksusa, hiperehogeni fokusi u fetalnom srcu, kratka nadlaktična i bedrena kost. Češće se susreću u plodova s kromosomopatijama, ali mogu biti prisutni i u zdravih plodova. Imaju manju osjetljivost i specifičnost za fetalne kromosomopatije u usporedbi s velikim anomalijama. Prisutnost više biljega u istog ploda povećava vjerojatnost postojanja kromosomopatije (53). O invazivnoj dijagnostici opravdano je razmišljati u slučaju postojanja velikih anomalija ili više „mekih“

biljega (15). Ultrazvučni pregled tijekom drugog tromjesečja je od svih nabrojenih najmanje efikasna probirna metoda otkrivanja kromosomopatija (engl. *genetic sonogram*). Stopu detekcije Downovog sindroma od 50-70% moguće je postići uz ultrazvučni uređaj visoke klase, dobro educiranog ultrasoničara i bez ograničenja vremena za pojedini pregled (53).

1.3.5. Kombinacija ultrazvučnih i biokemijskih biljega kromosomopatija ploda u testovima probira

1.3.5.1. Kombinirani test probira

Probirni testovi prvog tromjesečja zadnjih su petnaestak godina postali zlatni standard antenatalnog traganja za kromosomopatijama. Kombinirani test najraširenija je metoda antenatalnog probira na kromosomopatije. Provodi se u okviru našeg zdravstvenog sustava, jednako kao i u većini zemalja Europske unije. Testiranje se vrši između 10. i 14. tjedna trudnoće kombiniranjem dvaju biokemijskih i jednog ultrazvučnog biljega te životne dobi majke. Biokemijski biljezi su PAPP-A i β-hCG prikazani u obliku MoM vrijednosti, dok je izabrani ultrazvučni biljeg NP. Nosna kost i ostali ultrazvučni biljezi prvog tromjesečja upotrebljavaju se samo kao opcionalni čimbenici. Prema rezultatima medicine utemeljene na dokazima, potrebna su daljnja istraživanja i evaluacije isplativosti dodatnih ultrazvučnih biljega prije rutinskog uvrštavanja u kombinirani probir (35, 45, 54).

Kombiniranjem navedenih biljega, mogućnost detekcije Downovog sindroma penje se do zavidnih 90%, uz 5% lažno pozitivnih nalaza (35). Istraživanja su pokazala da bi se uključivanjem nosne kosti osjetljivost mogla povećati na 95%. Kombiniranim testom moguće je prepoznati 94% trisomija 18 i 13 kromosoma, triploidija i Turnerovog sindroma, kao i 60% ostalih kromosomopatija (delecije, parcijalne trisomije, nebalasirane translokacije i aneuploidije spolnih kromosoma) (55). Stopa detekcije Downovog sindroma u višeplodnim trudnoća znatno je niža i iznosi do 80%, uz više lažno pozitivnih nalaza (56).

Uobičajeno se na invazivne dijagnostičke testove nakon kombiniranog probira upućuju trudnice s izračunatim rizikom većim od 1:250. Neki autori predlažu drugačiji, sekvencijski model postupanja po kojem se trudnice prema izračunatom riziku dijele na 3 skupine: visokog, srednjeg i niskog rizika. Ukoliko je rizik od kromosomopatije ploda u kombiniranom testu visok (veći od 1:100), savjetuje se invazivni dijagnostički invazivni postupak. U trudnica s umjerenim

rizikom (1:100 do 1:1000) predlaže se napraviti dodatne ultrazvučne pretrage (mjerenje nosne kosti, fronto maksilarnog ličnog kuta, protok kroz venozni duktus, prisutnost trikuspidane regrugitacije) te postupiti ovisno o nalazu (57).

Brojne su prednosti provođenja kombiniranog probira u prvom tromjesečju u odnosu na biokemijske probirne testove drugog tromjesečja. Probirom u prvom tromjesečju dijagnoza se postavlja ranije, što otvara mogućnost za sigurniji i manje traumatičan prekid trudnoće. Stopa detekcije kombiniranog probira veća je od testova drugog tromjesečja. Moguće je prepoznati rizik za većinu najčešćih kromosomopatija. Nedostatak je što se kombiniranim probirom otkriva i dio trudnoća s kromosomopatijama koje bi završile spontanim pobačajem do vremena izvođenja probira drugog tromjesečja (33).

Budući da kombinirani test ne uključuje ispitivanje AFP, preporuka je trudnice s normalnim rezultatima kombiniranog testa u prvom tromjesečju uputiti na probir defekata neuralne cijevi u drugom tromjesečju UZV pregledom i/ili određivanjem vrijednosti AFP (58).

Rezultate kombiniranog probira je obično moguće dobiti za dva do tri dana, što u nekih trudnica potiče anksioznost zbog čekanja. Od 1999. godine, na inicijativu *Fetal Medicine Foundation*, pokrenut je program OSCAR (engl. *One Step Clinic for Assesment of Risk*) s ciljem informiranja trudnica, provođenja kombiniranog testa i dobivanja rezultata u istom danu. Ovaj dobro organizirani način probira u mnogim je zemljama Europe prihvaćen kao standardizirani model. Realizacija probirnog testa od ultrazvučnog pregleda, dobivanja rezultata biokemijske analize, do zaključnog savjetovanja trudnice u istom danu, moguća je samo u centrima s vrhunski organiziranom, multidisciplinarnom antenatalnom skrbi. Takav pristup donosi najveću dobrobit za trudnice te postoji visoka prihvaćenost mogućnosti ranog probira od 98% u zemljama s višegodišnjim iskustvom u programu OSCAR (54).

1.3.5.2. Integrirani i sekvencijski test probira

Neovisna upotreba više vrsta probirnih testova u iste trudnice (npr. kombiniranog i četverostrukog testa) bez sjedinjivanja njihovih rezultata nije preporučljiva zbog neprihvatljivog povećanja stope lažno pozitivnih nalaza. Potonje se može izbjeći objedinjivanjem rezultata u sklopu integriranog ili sekvencijskog probira (58).

Integrirani test udružuje potencijale biljega fetalnih kromosomopatija prvog i drugog tromjesečja. Provodi se u dva koraka. U prvom tromjesečju trudnice se upućuju na kombinirani, a u drugom tromjesečju na četverostruki test (20). Rezultati početnog dijela testa u prvom tromjesečju ne otkrivaju se sve do njihovog kombiniranja s biljezima drugog tromjesečja, kada se računa jedinstveni rizik koji proizlazi iz oba testa. Ovisno o tome izvodi li se u prvom tromjesečju kombinirani test ili se određuju samo biokemijski biljezi bez mjerenja nuhalnog nabora, integrirani test dijeli se na potpuni integrirani test i serumski integrirani test. Uz 5% lažno pozitivnih nalaza, stopa detekcije Downovog sindroma za potpuni integrirani test iznosi oko 95%. Ako željenu stopu detekcije postavimo na 90%, integriranim testom postiže se znatno manja stopa lažno pozitivnih nalaza, što rezultira manjim brojem nepotrebnih invazivnih dijagnostičkih postupaka u urednim trudnoćama. Serumski integrirani test ima nešto manju stopu detekcije, ali je koristan na područjima gdje ne postoji dovoljno educirano osoblje za provođenje mjerenja nuhalnog nabora (59). Nedostatak integriranog testa je otkrivanje rezultata tek u drugom tromjesečju, pa nije moguće izvesti ranu CVS dijagnostiku. Rezultate probira dugo se čeka, što izaziva anksioznost u velikog broja trudnica. Budući se testiranje provodi u dva navrata s razmakom od mjesec dana, izvođenje zahtijeva više napora i komunikacije s trudnicom u cilju postizanja veće suradljivosti (60).

Sekvencijski probir također kombinira testove prvog i drugog tromjesečja. Razlika je u dobivanju preliminarne informacije o riziku od kromosomopatija ploda već u prvom tromjesečju, što može imati povoljan psihički utjecaj. Postoje dvije vrste sekvencijskog probira: postupni sekvencijski probir (engl. *stepwise sequential screening*) i uvjetovani sekvencijski probir (engl. *contingent sequential screening*). Kod postupnog sekvencijskog probira, trudnicama se u prvom tromjesečju prezentiraju rezultati kombiniranog testa. Visokorizičnim trudnicama savjetuje se obavljanje invazivne dijagnostike. Niskorizične se upućuju na četverostruki test u drugom tromjesečju, nakon čega slijedi izračunavanje konačnog rizika (20). Stopa detekcije i lažno pozitivnih nalaza usporedive su s integriranim probirom, uz eliminaciju njegovih glavnih nedostataka koji se odnose na dugo čekanje rezultata (60). Kod uvjetovanog sekvencijskog probira, trudnice se ovisno o rezultatima kombiniranog testa u prvom tromjesečju dijele na skupinu visokog, srednjeg ili niskog rizika. Visokorizičnima se savjetuje invazivna dijagnostika, a u niskorizičnih se prekida probirni postupak. Jedino se skupina srednjeg rizika upućuje na četverostruki test u drugom tromjesečju, nakon čega im se predoči jedinstveni rezultat oba probirna testa. Na taj se način, uz jednaku stopu detekcije i broj lažno

pozitivnih nalaza, u manjeg broja trudnica izvodi dodatno testiranje u drugom tromjesečju (59). Posljednjih se godina u nekim sredinama trudnicama s visokim rizikom prema sekvencijskom probiru savjetuje da prije invazivne dijagnostike naprave jedan od NIPT testova (engl. *non invasive prenatal test*) analizom slobodne fetalne frakcije DNA iz periferne krvi majke (58).

Integrirani i sekvencijski testovi imaju veću stopu detekcije, uz manji broj lažno pozitivnih nalaza u odnosu na prethodno spominjane metode probira. Prema preporuci *The American College of Obstetricians and Gynaecologists* (ACOG), u idealnim bi se okolnostima u svih trudnica trebao izvesti integrirani ili sekvencijski probir. Odabir vrste testa ovisio bi o dostupnosti CVS-a za ranu dijagnostiku kromosomopatija u prvom tromjesečju. Ukoliko CVS nije dostupan, smisleno je trudnice uputiti na integrirani probir. U sredinama s dostupnim CVS-om najbolje bi bilo trudnicama ponuditi uvjetovani sekvencijski probirni test (58). Unatoč prethodno navedenim prednostima, zbog važnih nedostataka integriranog i sekvencijskog probira (dvostruko vađenje krvi, potencijalna nesuradnja trudnica zbog složenosti probira, dobivanje konačnih rezultata tek u drugom tromjesečju) kombinirani test ostaje najčešće primjenjivana probirna metoda na fetalne kromosomopatije (43).

1.3.6 Probir analizom slobodne fetalne DNA iz periferne krvi trudnice

Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su usmjerena razvoju neinvazivnih testova visoke osjetljivosti i specifičnosti, koji bi značajno umanjili upotrebu invazivnih metoda dokazivanja kromosomopatija. Usprkos obećavajućim preliminarnim rezultatima nakon otkrića fetalnih stanica u krvotoku majke, fetalne se stanice nisu pokazale pouzdanim izvorom genetskog materijala. Lo i suradnici su 1997. godine prvi opisali prisutnost fetalne slobodne DNA otkrićem genskih sljedova specifičnih za Y kromosom u plazmi trudnica s muškim plodovima (61). Fetalna komponenta slobodne DNA potječe primarno od stanica trofoblasta koje propadaju apoptozom i čini ukupno 3-13% slobodne DNA u majčinoj krvi (62). Količina slobodnih fetalnih fragmenata DNA povećava se napredovanjem trudnoće, a potpuno nestaje iz majčine cirkulacije nekoliko sati nakon poroda (63). Osim za detekciju aneuploidija, slobodna fetalna DNA može se upotrebljavati za identificiranje Rh pozitivnih plodova, određivanje spola ploda te otkrivanje nekih genetskih poremećaja koji potječu od oca (64). Analiza je izvediva od 10. tjedna trudnoće do termina poroda. Iako je metodologija skupa, dugotrajna i kompleksna, napredak tehnologije doveo je do razvoja neinvazivnih antenatalnih probirnih testova na kromosomopatije ploda analizom slobodne DNA iz majčine krvi (NIPT).

Prvi takav test predstavljen je 2011. godine, od kada se iznimno brzo proširio po cijelom svijetu. Tri su varijante NIPT-ova dostupne na tržištu: a) masivno paralelno sekvenciranje (MPS) čitavog genoma koje ima potencijal za utvrđivanje aneuploidija svih kromosoma, b) ciljano sekvenciranje kromosoma kojim se radi manji broj očitanja (jeftinije je, brže se dođe do rezultata, ali se dobije manja količina informacija o genomu) i c) sekvenciranje SNP lokusa na kromosomima od interesa koje uzima u obzir relativni kvantitativni doprinos majčinog i očevog genoma u plazmi te ima potencijal za utvrđivanje triploidija. Rezultati testova dostupni su kroz desetak dana (11). Stopa detekcije Downovog sindroma veća je nego u svim drugim probirnim testovima i iznosi 99 %, uz manje od 0,5 % lažno pozitivnih rezultata. Rezultati prepoznavanja Edwardsovog i Patauovog sindroma tek su nešto slabiji (65). Ova je metoda najefikasnija u detekciji aneuploidija u visokozičnih trudnica. Važna prednost NIPT-ova pred dosadašnjim probirnim testovima je niska stopa lažno pozitivnih rezultata, pa je posljedično manji broj nepotrebnih RACZ i potencijalnih gubitaka trudnoće. Broj lažno pozitivnih rezultata nešto je veći u žena mlađe životne dobi. Budući da test ima poteškoće pri razlikovanju fetalne od majčine DNA, lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica placentarnog mozaicizma, gubitka jednog od blizanaca, mozaicizma majke i malignog oboljenja trudnice. Značajno je naglasiti da je analiza slobodne fetalne DNA kategorijski probirna metoda, pa stoga u slučaju patoloških nalaza uvijek mora biti popraćena invazivnom dijagnostikom. Manja ograničenja NIPT-ova su relativno velik udio neuspjelih analiza (2,6-5,4%), usmjerenost na tri najčešće trisomije i visoka cijena. Razlog za lažno negativne rezultate uglavnom je ograničeni placentarni mozaicizam. Ultrazvučna dijagnostika i dalje ostaje nužna komplementarna metoda u svrhu isključivanja strukturnih fetalnih anomalija (58). ACOG je kroz smjernice iz 2012. godine predvidio uključenje NIPT-ova u postojeće protokole, uz preporuku primjene isključivo u visokorizičnih trudnica prije invazivnog zahvata. Kao i kod svih ostalih metoda prenatalne dijagnostike kromosomopatija, provođenje NIPT postupaka mora slijediti kvalitetno informiranje trudnice uz poštovanje njezinih želja i odluka (66).

1.4. POSTUPAK U TRUDNICA S POVIŠENIM RIZIKOM OD KROMOSOMOPATIJA PLODA PREMA TESTOVIMA PROBIRA I UREDNIM KARIOGRAMOM

Mnoge komplikacije u trudnoći značajno mijenjaju funkciju fetoplacentarne jedinice, a time i koncentraciju biokemijskih biljega te izračunati rizik u biokemijskim testovima.

Poremećene koncentracije biokemijskih biljega u odsustvu kromosomopatija i defekata neuralne cijevi povezane su s lošijim ishodom trudnoće. Vjerojatnost za loš ishod raste s većim odstupanjem vrijednosti biljega od normale (67).

1.4.1. Kombinirani test

Zbog uloge hCG-a u održavanju trudnoće, sniženi slobodni β-hCG povezan je s rizikom od spontanog pobačaja. Neka istraživanja opisuju veću učestalost niske porođajne mase plodova u trudnica s niskim β- hCG-om u prvom tromjesečju (68).

Snižena koncentracija PAPP-A u krvi majke rezultira smanjenjem razine slobodnog IGF-a, važnog medijatora rasta i razvoja posteljice i ploda. Sniženi PAPP-A povezuje se s porodničkim komplikacijama koje su posljedica abnormalne invazije i/ili obnavljanja trofoblasta (hipertenzija, preeklampsija, zastoj rasta ploda, abrupcija posteljice, HELLP sindrom i slično). Opisana je i povezanost s pojavnosti pobačaja, preranog porođaja i mrtvorođenja (69).

Iako navedeni utjecaji umanjuju pouzdanost probiranja trisomija u trudnoći, rizični rezultat probira s potvrđenim urednim kariogramom treba skrenuti pozornost na trudnoću kojoj prijeti nepoželjan ishod i biti poticaj za pojačan i individualno osmišljen daljnji antenatalni nadzor. Osjetljivost i specifičnost spomenutih biljega za loš ishod trudnoće relativno su niske da bi se upotrebljavale kao probirni testovi za kasnije komplikacije u rutinskoj kliničkoj praksi. Većina trudnica s poremećenim biokemijskim biljezima i urednim kariogramom neće imati nikakvih komplikacija (67). Neki autori ističu kako mjerenje protoka uterinih arterija doplerom u ovih trudnica povećava točnost predviđanja loših ishoda trudnoće povezanih s uteroplacentarnom insuficijencijom (70).

U slučaju urednog kariograma, povećana NP može pobuditi sumnju na postojanje malformacija srca i velikih krvnih žila te raznih genetskih poremećaja (44). Ukoliko je NP deblja od 99. centile uz uredan kariogram, preporuka je ehokardiografskim pregledom srca ploda i detaljnim ultrazvučnim pregledom u drugom tromjesečju isključiti druge abnormalnosti (47).

1.4.2. Biokemijski probirni testovi drugog tromjesečja

U odsustvu defekata neuralne cijevi i trbušne stjenke, povišene razine AFP povezane su s lošim ishodom trudnoće zbog veće pojavnosti placente previje, urasle ili prorasle posteljice, hipertenzije u trudnoći, preeklampsije, kasnih pobačaja, preranog porođaja, intrauterinog zastoja rasta i abrupcije placente. Trudnice s niskom koncentracijom AFP-a imaju povećan rizik od spontanog pobačaja, preranog porođaja, mrtvorođenja i fetalne makrosomije (67).

Nekoliko istraživanja ukazalo je na moguću povezanost niskih koncentracija uE3 s intrauterinim zastojem rasta te gubitkom trudnoće. Komplikacije u trudnoći poput preeklampsije, intrauterinog zastoja rasta, preranog porođaja ili pobačaja, češće su u trudnica s povišenim inhibinom A (71).

Postupak u trudnica s povišenim rizikom od kromosomopatija ploda prema biokemijskim probirnim testovima drugog tromjesečja i urednim kariogramom istovjetan je onom kod kombiniranog testa (67).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Prikazati rezultate kombiniranog testa probira na kromosomopatije ploda u KBC Split.

2. Usporediti broj visokorizičnih trudnica za kromosomopatije ploda po dobnim skupinama.

3. Usporediti vrijednost rizika od kromosomopatija ploda po dobnim skupinama.

4. Usporediti broj *a priori* visokorizičnih trudnica za kromosomopatije ploda po životnoj dobi trudnice s brojem visokorizičnih trudnica po rezultatima kombiniranog testa probira.

5. Usporediti vrijednosti *a priori* rizika od kromosomopatija ploda po životnoj dobi trudnice s vrijednostima rizika izračunatim kombiniranim testom probira.

6. Prikazati udio visokorizičnih trudnica po tjednima trudnoće kada je izveden kombinirani test.

7. Prikazati dobivene vrijednosti svake sastavnice kombiniranog testa pojedinačno (laboratorijski čimbenici iz periferne krvi trudnice: β-hCG i PAPPA; ultrazvučni čimbenik: nuhalna prozirnost).

8. Prikazati udio kombiniranog testa kao indikacije u ukupnom broju RACZ.

9. Istražiti razloge provedbe RACZ u žena u kojih je, zbog dokazane kromosomopatije ploda i nakon osobnog zahtjeva, odobren i proveden prekid trudnoće iz eugeničkih razloga u KBC Split u istom razdoblju.

10. Istražiti je li među novorođenčadi s kromosomopatijama u KBC Split u istom razdoblju tijekom trudnoće bio proveden neki od testova prenatalnog probira s naglaskom na kombinirani test.

2.2 Hipoteze

1. Porastom životne dobi povećava se broj visokorizičnih trudnica za kromosomopatije ploda.

2. Broj trudnica *a priori* rizičnih za kromosomopatije ploda po životnoj dobi veći je od broja trudnica rizičnih po rezultatima kombiniranog testa probira.

3. Porastom životnom dobi povećava se prosječna vrijednost rizika od krosomopatija ploda.

4. Prosječna vrijednost *a priori* rizika od kromosomopatija ploda po životnoj dobi veća je od rizika izračunatog kombiniranim testom probira.

5. Kombiniranim testom probira je moguće otkriti dodatne trudnice koje su visokorizične za kromosomopatije ploda u skupini *a priori* niskorizičnih trudnica po životnoj dobi (mlađe od 36 godina).

6. Kombiniranim testom probira je moguće iz skupine trudnica *a priori* visokorizičnih za kromosomopatije ploda (dobi od 36 godina i više) dio trudnica svrstati u niskorizičnu skupinu.

7. Udio trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira veći je u skupini žena kojima je odobren i proveden pobačaj iz eugeničkih razloga nego u majki novorođenčadi s kromosomopatijama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Presječno retrospektivno istraživanje.

3.2. Ispitanice

Sve trudnice u kojih je proveden kombinirani test probira u KBC Split od 1. siječnja 2011. do 31. prosinca 2017. godine.

3.3. Metode prikupljanja podataka

Podatci su prikupljeni iz digitalne arhive Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku i arhive Klinike za ženske bolesti i porode KBC Split (Protokol ranih amniocenteza, Protokol novorođenčadi hospitalizirane u Zavodu za neonatologiju Klinike za ženske bolesti i porode KBC Split, Protokol odobrenih zahtjeva za prekid trudnoće iz medicinskih/eugeničkih razloga).

3.4. Mjerenja i druga opažanja

Promatrani podatci su: a) godina izvođenja kombiniranog testa, b) životna dob ispitanica, c) navršeni tjedan trudnoće, d) vrijednosti β-hCG iz periferne krvi majke, e) vrijednost PAPP-A iz periferne krvi majke, f) vrijednost ultrazvučnog biljega nuhalne prozirnosti, g) vrijednosti *a priori* rizika od kromosomopatija ploda po životnoj dobi trudnice, h) vrijednosti rizika od kromosomopatija ploda izračunatog kombiniranim testom, i) indikacija za izvođenje RACZ, j) prethodna provedenost kombiniranog testa u žena kojima je odobren prekid trudnoće iz eugeničkih ili medicinskih razloga, k) prethodna provedenost kombiniranog testa u žena koje su rodile dijete s kromosomopatijom. Izračunata vjerojatnost za rađanje djeteta s trisomijom autosoma 13, 18, ili 21 veća od 1:250 se smatra visokim, a manja od te vrijednosti niskim rizikom.

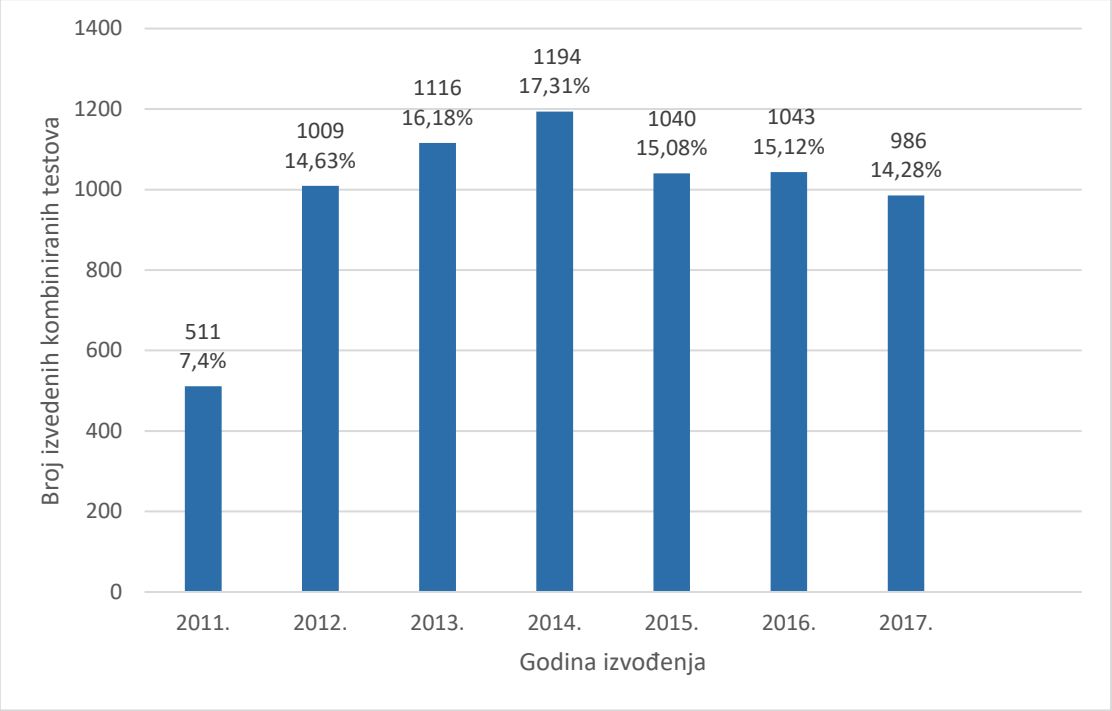
3.5. Statistička analiza

Testiranje normalnosti razdiobe podataka provedeno je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Kvantitativni podatci prikazani su u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije (M +/- SD). Analiza kategoričkih podataka izvršena je $\chi 2$ testom, a kvantitativnih ANOVA testom. Za usporedbu proporcija upotrebljen je z-test. Za ispitivanje povezanosti varijabli izračunat je

Pearsonov koeficijent korelacije. Osjetljivost, specifičnost, kao i dijagnostička točnost određene su ROC analizom (engl. *Receiver operating characteristics*), uz navedenu vrijednost područja ispod krivulje – AUC (engl. *Area under the curve*), pripadajuće 95% intervale pouzdanosti i razinu statističke značajnosti modela (P). Vrijednost $P< 0,05$ uzeta je kao razina statističke značajnosti. Statistička je analiza provedena softverskim paketom SPSS for Windows ® (verzija 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) i Microsoft Excel za Windows Version 11.0 (Microsoft Corporation).

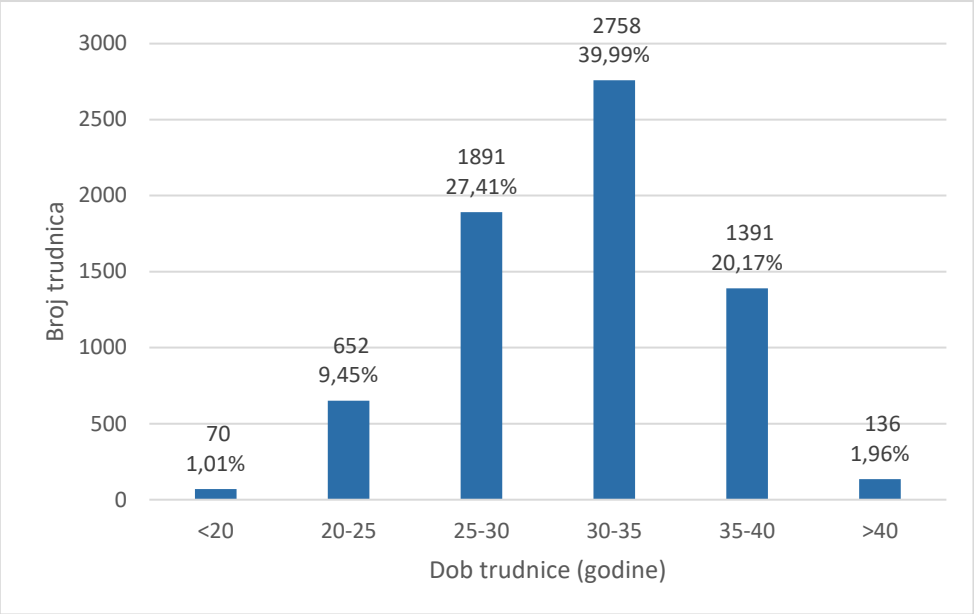
4. REZULTATI

U Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split je u promatranom razdoblju od 1. siječnja 2011. do 31. prosinca 2017. izvedeno 6898 kombiniranih testova probira na kromosomopatije ploda. Broj izvedenih kombiniranih testova u pojedinoj godini prikazan je na Slici 1.



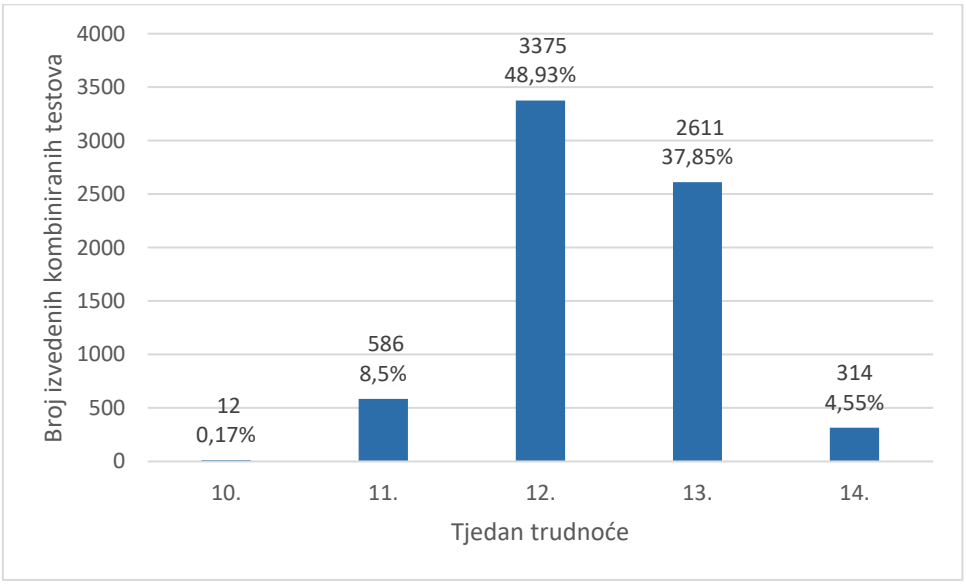
Slika 1. Raspodjela kombiniranih testova probira prema godini izvođenja. Prikazan je broj i udio (%) od ukupnog broja kombiniranih testova izvedenih u KBC Split u razdoblju od 2011. do 2017. godine.

Na Slici 2. prikazana je raspodjela trudnica po dobnim skupinama u trenutku izvođenja kombiniranog testa. Najveći broj trudnica (2758; 39,99%) u trenutku izvođenja probira pripadao je dobnoj skupini od 30 do 35 godina, dok je samo 136 (1,97%) trudnica imalo 40 ili više godina.



Slika 2. Raspodjela trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira prema dobnim skupinama (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Najveći broj trudnica (3375; 48,93%) pristupio je probiru u navršenom 12. tjednu trudnoće. U 13. tjednu trudnoće probir je izveden u 2611 (37,85%) trudnica (Slika 3.).



Slika 3. Raspodjela trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira prema navršenom tjednu trudnoće u vrijeme izvođenja probira (KBC Split; 2011.-2017. godine).

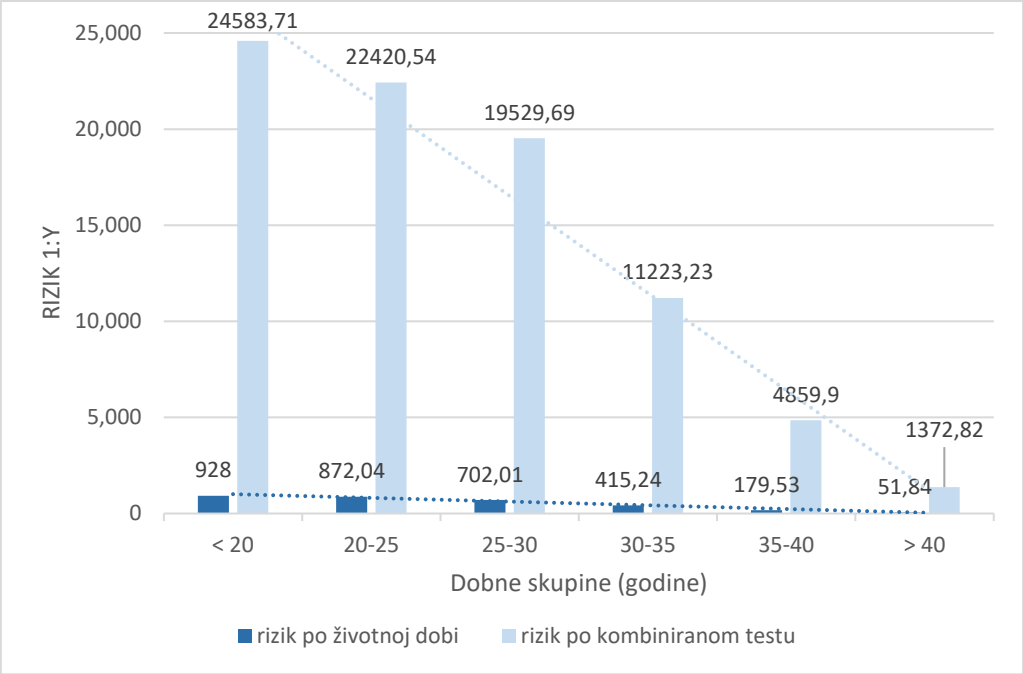
Trudnice stare 36 godina i više pripadaju *a priori* visokorizičnoj skupini za trisomiju 21 jer im je zbog same životne dobi vjerojatnost rađanja djeteta s tom bolesti veća od 1:250. Iz Tablice 1. vidljivo je da sve trudnice koje su *a priori* visokorizične za trisomiju 21 po životnoj dobi pripadaju dobnoj skupini od 35 do 40 godina ili više, dok u mlađim dobnim skupinama nema rizičnih po životnoj dobi. Povećanjem životne dobi, značajno se povećava udio trudnica *a priori* visokorizičnih za trisomiju 21 po životnoj dobi (χ^2 = 6498,992, P<0.001), kao i udio visokorizičnih trudnica po kombiniranom testom probira (χ^2 = 289,112, P<0.001). U skupini trudnica dobi od 40 godina i više, 26,47% imalo je rizičan rezultat za trisomiju 21 po kombiniranom testu, dok je u dobnoj skupini od 35 do 40 godina prema testu bilo 5,9% rizičnih. U mlađim dobnim skupinama rezultat povišenog rizika dobiven je u manje od 3% trudnica. Vidljivo je da je kombiniranim testom probira među *a priori* niskorizičnim trudnicama po životnoj dobi detektirano dodatnih 121 visokorizičnih trudnica po rezultatima kombiniranog testa. Isto tako, sve trudnice u dobnoj skupini starijoj od 35 godine koje su *a priori* visokorizične po dobi nisu rizične i po rezultatima kombiniranog testa. Razlika u broju trudnica *a priori* rizičnih po životnoj dobi i rizičnih po kombiniranom testu probira statistički je značajna za sve dobne skupine (χ^2 test, P<0,05), osim za skupinu mlađu od 20 godina (P=0,3156).

Tablica 1. Raspodjela trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira s obzirom na *a priori* rizik od trisomije 21 prema životnoj dobi i rizik izračunat kombiniranim testom probira po dobnim skupinama (KBC Split; 2011.-2017. godine). Vrijednost od 1:250 uzeta je kao granična vrijednost rizika.

Dobna skupina (godine)	Broj testiranih	Visokorizične po dobi, N (% testiranih)	Visokorizične po kombiniranom testu, N (% testiranih)	P
<20	70	0 (0%)	1 (1,43%)	0,3156*
20-25	652	0 (0%)	10 (1,53%)	0,0015*
25-30	1891	0 (0%)	28 (1,48%)	<0,001*
30-35	2758	0 (0%)	82 (2,97%)	<0,001*
35-40	1391	1321 (94,97%)	82 (5,9%)	<0,001*
>40	136	136 (100%)	36 (26,47%)	<0,001*

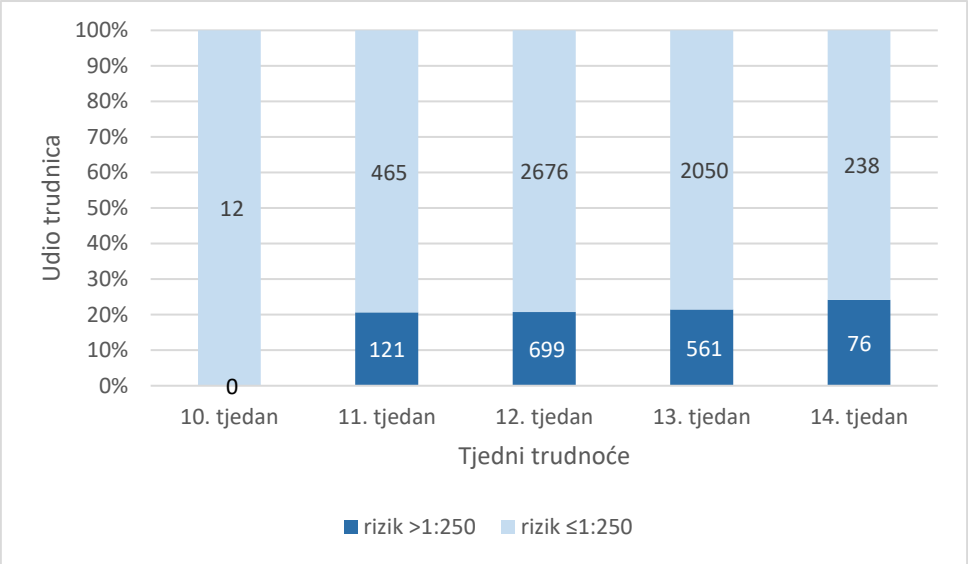
* $\chi 2$ test

Porastom životne dobi povećava se prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi, kao i rizika izračunatog kombiniranim testom. Prosječna vrijednost rizika od trisomije 21 izračunatog kombiniranim testom za trudnice mlađe od 35 godina manja je od 1:11223, dok ista za trudnice životne dobi od 35 do 40 godina iznosi 1:4859. U ispitanica starijih od 40 godina, prosječan rizik po kombiniranom testu iznosi 1:1372. Prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi manja je od 1:415 za trudnice mlađe od 35 godina, dok za trudnice životne dobi od 35 do 40 godina ista iznosi 1:179. Za trudnice starije od 40 godina, prosječan rizik po životnoj dobi iznosi 1:51. Razlika u prosječnoj vrijednosti *a priori* rizika po životnoj dobi, kao i po rezultatima kombiniranog testa probira među dobnih skupinama statistički je značajna (ANOVA, P<0,001). *A priori* rizik po životnoj dobi je u svim dobnim skupinama veći od rizika izračunatog kombiniranim testom (Slika 4.).

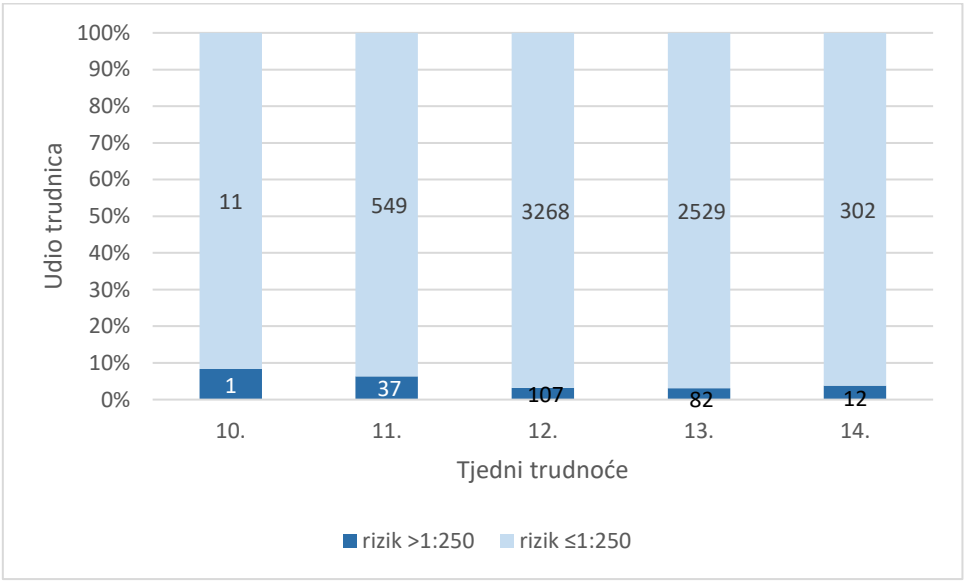


Slika 4. Prikaz prosječnih vrijednosti *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi i rizika izračunatog kombiniranim testom po dobnim skupinama (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Na Slici 5. je prikazana raspodjela trudnica obzirom na *a priori* rizik od trisomije 21 prema životnoj dobi po tjednima trudnoće u vrijeme izvođenja probira, a na Slici 6. obzirom na rizik od trisomije 21 po rezultatima kombiniranog testa. Udio *a priori* visokorizičnih trudnica po životnoj dobi iznosi oko 20% za sve tjedne trudnoće kada je testiranje provedeno, osim za 10. tjedan zbog malog broja ispitanica. Manje od 9% trudnica imalo je visokorizičan rezultat kombiniranog testa za svaki tjedan trudnoće provođenja testiranja.

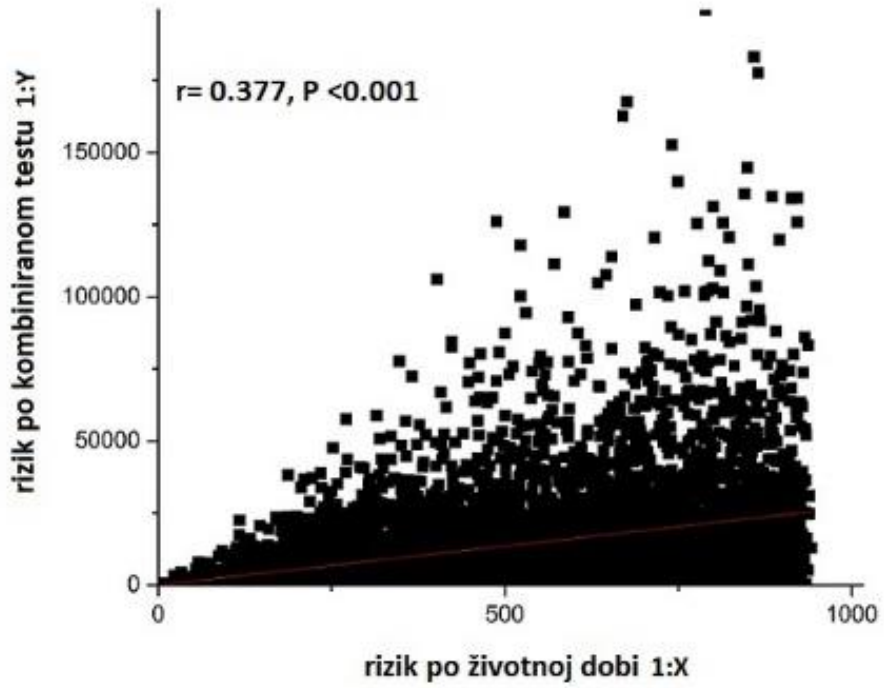


Slika 5. Raspodjela trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira obzirom na *a priori* rizik od trisomije 21 prema životnoj dobi po tjednima trudnoće u vrijeme izvođenja probira (KBC Split; 2011.-2017. godine). Vrijednost od 1:250 uzeta je kao granična vrijednost rizika.



Slika 6. Raspodjela trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira obzirom na rizik od trisomije 21 prema kombiniranom testu probira po tjednima trudnoće u vrijeme izvođenja probira (KBC Split; 2011.-2017. godine). Vrijednost od 1:250 uzeta je kao granična vrijednost rizika.

Analiza cijele ispitivane skupine pokazuje da postoji pozitivna korelacija između vrijednosti *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi i rizika izračunatog kombiniranim testom probira (r=0,377, P<0,001). Povećanjem *a priori* rizika po životnoj dobi, raste vrijednost rizika po kombiniranom testu i obrnuto (Slika 7.).



Slika 7. Korelacija između *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi trudnice i rizika izračunatog kombiniranim testom (KBC Split; 2011.-2017. godine). r- Pearsonov koeficijent korelacije, P – razina statističke značajnosti <0,05.

U Tablici 2. prikazana je frekvencija trudnica unutar pet skupina prema *a priori* riziku po životnoj dobi i rezultatima kombiniranog testa za trisomiju 21. Razlika frekvencija trudnica između *a priori* rizičnih po životnoj dobi i po rezultatima kombiniranog testa statistički je značajna za sve kategorije rizika (z test, P<0,001), osim za skupinu rizika >1:100 (P=0,3628). Tablica prikazuje i frekvencije trudnica rizičnih za trisomiju 18 i 13 po rezultatima kombiniranog testa unutar istih skupina rizika.

Tablica 2. Prikaz frekvencija prema kategorijama rizika od trisomija 21, 13, i 18 u trudnica u kojih je proveden kombinirani test probira (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Granična vrijednost rizika	T21* rizik po dobi N (%)	T21* rizik po kombiniranom testu N (%)	T13† i 18‡ rizik po kombiniranom testu N (%)	P (rizik T21 po dobi i testu)
>1:100	229 (3,32)	109 (1,58)	33 (0,48)	0,3628§
1:100-1:250	1228 (17,8)	130 (1,89)	11 (0,16)	<0,001§
1:250-1:500	2187 (31,7)	184 (2,66)	19 (0,28)	<0,001§
1:500-1:1000	3254 (47,17)	351 (5,09)	24 (0,34)	<0,001§
<1:1000	0 (0)	6124 (88,78)	6811 (98,74)	<0,001§
ukupno	6898 (100)	6898 (100)	6898 (100)	

* Trisomija 21; † Trisomija 13; ‡ Trisomija 18; § z –test

Tablica 3. prikazuje usporedbu broja trudnica *a priori* rizičnih za trisomiju 21 po životnoj dobi s brojem trudnica rizičnih po rezultatima kombiniranog testa, uz graničnu vrijednost rizika postavljenu na 1:250. Pronađeno je 1457 trudnica (21,1%) *a priori* rizičnih po dobi, dok ih je 239 (3,5%) bilo rizično po rezultatima kombiniranog testa. Razlika između broja trudnica rizičnih po životnoj dobi i kombiniranom testu statistički je značajna ($\chi 2$=997,3242, P<0,001).

Tablica 3. Usporedba broja trudnica *a priori* rizičnih za trisomiju 21 po životnoj dobi i rizičnih po rezultatima kombiniranog testa, uz graničnu vrijednost rizika od 1:250 (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Rizična skupina	rizik > 1:250	rizik < 1:250	P
T21* rizik po životnoj dobi N (%)	1457 (21,1%)	5441 (78,9%)	< 0,001†
T21* rizik po kombiniranom testu N (%)	239 (3,5%)	6659 (96,5%)	

* Trisomija 21; † χ2-test

Odnos broja *a priori* rizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi i onih rizičnih po rezultatima kombiniranog testa obzirom na graničnu vrijednost rizika od 1:250 prikazan je u Tablici 4. Od 1457 trudnica rizičnih po životnoj dobi, 118 (8,1%) ih je rizično i po rezultatima kombiniranog testa, dok 1339 (91,9%) trudnica po testu nije rizično. Od 5441 trudnica koje nisu rizične po životnoj dobi, 121 (2,22%) ih je rizično po kombiniranom testu, dok ostalih 5320 (97,78%) nije rizično ni po testu.

Tablica 4. Odnos broja trudnica *a priori* rizičnih za trisomiju 21 po životnoj dobi i rizičnih po rezultatima kombiniranog testa, uz graničnu vrijednost rizika od 1:250 (KBC Split; 2011.-2017.).

	Visokorizične po kombiniranom testu (N)	Niskokorizične po kombiniranom testu (N)	Ukupno (%)
Visokorizične po životnoj dobi (N)	118	1339	1457 (21,12)
Niskorizične po životnoj dobi (N)	121	5320	5441 (78,88)
Ukupno N (%)	239 (3,46)	6659 (96,54)	6898 (100)

U Tablici 5. prikazane su artimetičke sredine i standardne devijacije koncentracija i MoM vrijednosti β-hCG, PAPP-A i nuhalne prozirnosti po dobnim skupinama.

Tablica 5. Prikazane su vrijednosti beta podjedinice humanog korionskog gonadotropina (β-hCG), proteina A udruženog s trudnoćom (engl. *pregnancy associated protein A*; PAPPA) i nuhalne prozirnosti (NP) po dobnim skupinama. (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Dobna skupina (godine)	β-hCG mIU/mL	MoM β-hCG	PAPP-A mIU/mL	MoM PAPP-A	NP mm	MoM NT
< 20	40,21 (32,1)	1,24 (0,94)	3870,85 (2527,16)	1,31 (0,65)	1,35 (0,87)	0,87 (0,67)
20-25	43,04 (31,05)	1,35 (0,9)	4032,63 (2520,87)	1,45 (0,82)	1,25 (0,45)	0,8 (0,28)
25-30	40,16 (29,67)	1,29 (0,94)	4164,21 (2718,93)	1,48 (0,81)	1,27 (0,53)	0,81 (0,34)
30-35	40,3 (30,05)	1,31 (0,94)	4157,56 (2625,53)	1,46 (0,75)	1,31 (0,5)	0,82 (0,32)
35-40	38,38 (26,79)	1,26 (0,83)	4083,54 (2568,08)	1,47 (0,78)	1,33 (0,5)	0,83 (0,31)
> 40	41,36 (40,1)	1,38 (1,2)	3907,34 (2613,76)	1,47 (0,74)	1,52 (1,18)	0,98 (0,87)
ukupno	40,15 (29,68)	1,3 (0,92)	4124,8 (2628,98)	1,47 (0,78)	1,3 (0,53)	0,82 (0,34)

Podatci su prikazani u obliku aritmetičke sredine. U zagradama je navedena standardna devijacija.

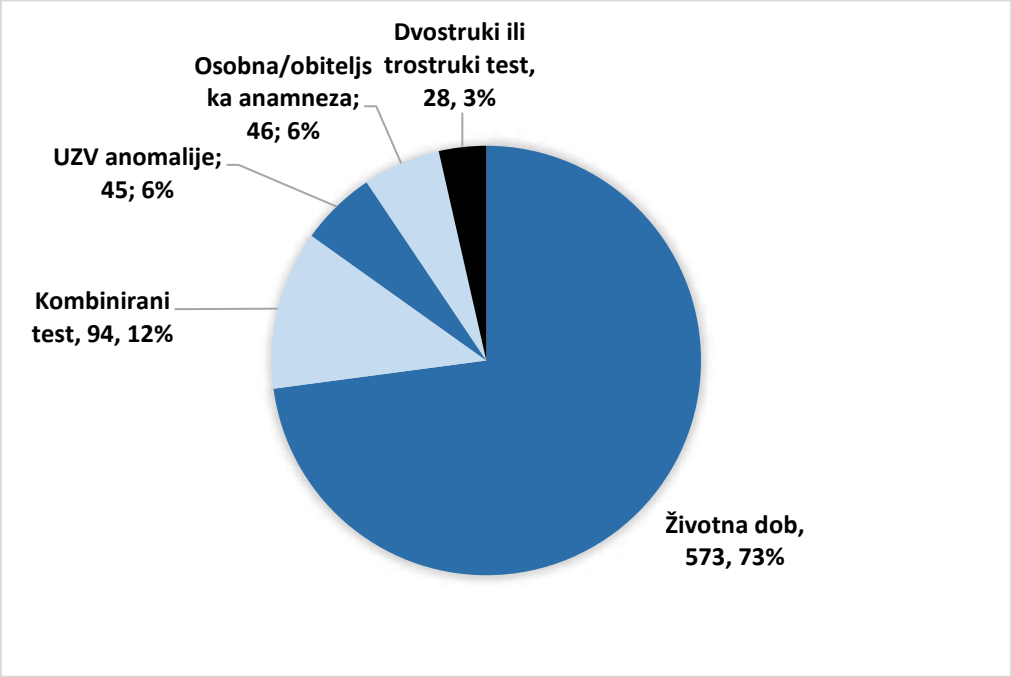
U Klinici je tijekom promatranog razdoblja (2011.-2017. godine) izvršeno 789 RACZ. U istom je razdoblju bilo ukupno 30877 porođaja. Tablica 6. prikazuje ukupan broj biokemijskih probirnih testova (dvostruki i trostruki test), kombiniranih testova te RACZ izvedenih u navedenom razdoblju, kao i njihov udio u ukupnom broju porođaja.

Tablica 6. Prikaz ukupnog broja izvedenih biokemijskih probirnih testova, kombiniranih testova, ranih amniocenteza te njihovog udjela (%) u ukupnom broju porođaja po godini izvođenja (KBC Split; 2011.-2017. godine).

	2011.	2012.	2013.	2014.	2015.	2016.	2017.	ukupno
Biokemijski probirni testovi (N)	407	303	253	209	154	104	96	1526
Kombinirani test (N)	511	1009	1116	1194	1040	1043	986	6898
Probirni testovi – ukupno (N)	918	1312	1369	1403	1194	1147	1082	8424
Udio probirnih testova u ukupnom broju porođaja (%)	19,67	27,8	31,14	31,97	28,15	26,89	25,78	27,28
Udio kombiniranog testa u ukupnom probiru (%)	55,66	76,91	81,52	85,1	87,1	90,93	91,13	81,89
RACZ* (N)	193	174	168	102	71	45	36	789
RACZ – udio u ukupnom broju porođaja (%)	4,13	3,69	3,82	2,32	1,67	1,05	0,86	2,55

*RACZ- rana amniocenteza

Od ukupno 789 izvedenih RACZ, 94 (12%) indicirano je zbog povišenog rizika od kromosomopatija ploda po rezultatu kombiniranog probirnog testa, dok ih je 28 (3%) napravljeno prema nalazima biokemijskih probirnih testova (dvostruki ili trostruki test). Slika 8. prikazuje indikacije za izvođenje RACZ u KBC Split.



Slika 8. Distribucija indikacija za ranu amniocentezu (KBC Split; 2011.-2017. godine).

U KBC Split u promatranom je razdoblju bilo 88 trudnoća s kromosomopatijom (0,29%, 1:345 trudnoća), od čega je rođeno 48 novorođenčadi (0,16%, 1:645 živorođenih), a 40 plodova je pobačeno.

U Klinici je tijekom promatranog razdoblja (2011.-2017. godine) rođeno 48 djece s kromosomopatijom, među kojima je najučestalija bila trisomija 21 (39 djece; 81,25%). Ostale kromosomopatije uključivale su: trisomiju 18 (petero djece; 10,42%), deleciju 5. kromosoma (dvoje djece; 4,12%), trisomiju 13 (jedno dijete; 2,08%) te Turnerov sindromom (jedno dijete; 2,08%). Kombiniranom testu probira je tijekom trudnoće pristupilo 11 (22,92%) majki djece rođene s kromosomopatijom, od kojih je u četiri izračunati rizik bio manji, a u sedam veći od 1:250 (Tablica 7. i Slika 11.). Od sedam trudnica s visokorizičnim rezultatom kombiniranog

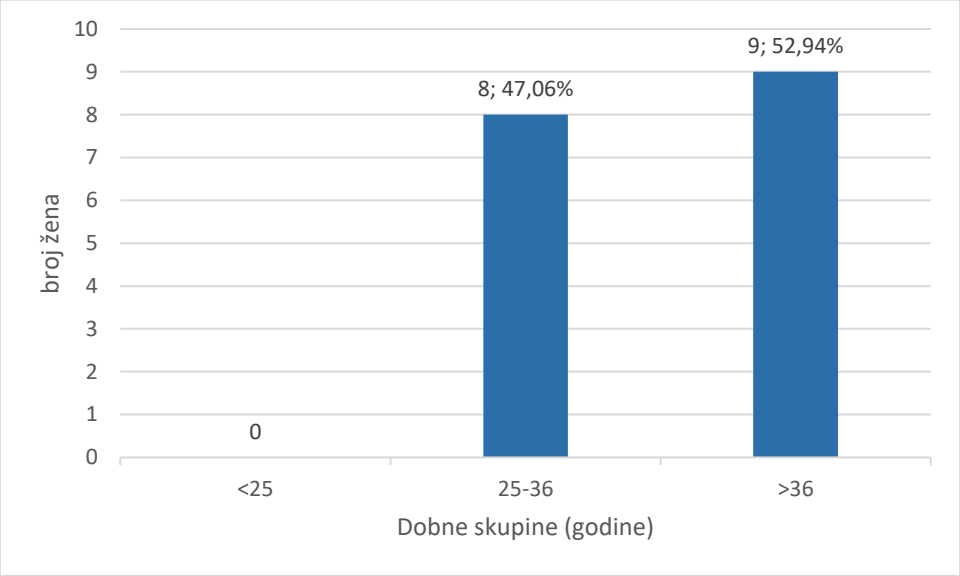
testa, u samo jedne provedena je RACZ. Dobiven je patološki kariogram, ali se trudnica nije odlučila podnijeti zahtjev za prekid trudnoće iz eugeničkih razloga. Ostale se nisu odlučile za invazivnu prenatalnu dijagnostiku kromosomopatija. U niti jedne od navedenih trudnica nije proveden biokemijski probir (dvostruki i trostruki test). RACZ je izvršena u još tri trudnice koje su rodile dijete s kromosomopatijom zbog drugih indikacija (životna dob od 36 godina i više te UZV nalaz malformacija).

U promatranom je razdoblju u Klinici izvršeno 40 prekida trudnoće na zahtjev trudnica zbog kromosomopatije ploda. Najčešća je indikacija bila trisomija 21 (29; 72,5%). Ostale indikacije odnosile su se na: trisomiju 18 (7; 17,5%), trisomiju 13 (2; 5%) i triploidiju (2; 5%). RACZ je u 12 (30%) od navedenih pacijentica izvršena zbog visokorizičnog rezultata probirnog testa; u 10 pacijentica nakon kombiniranog, a u dvije nakon biokemijskog testa (dvostruki i trostruki test) (Tablica 7.).

Tablica 7. Prikaz udjela (%) probirnih testova u ukupnom broju porođaja te u izvršenim prekidima trudnoća iz eugeničkih razloga. Prikazan je i udio (%) probirnih testova u porođajima djece s kromosomopatijom (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Udio probirnih testova u ukupnom broju porođaja	27,28%
- kombinirani test	22,34%
- biokemijski probirni testovi	4,94%
Udio probirnih testova u izvršenim eugeničkim pobačajima	30%
- kombinirani test	25%
- biokemijski probirni testovi	5%
Udio probirnih testova u majki novorođenčadi s kromosomopatijom	22,92%
- kombinirani test	22,92%
- biokemijski probirni testovi	0%

Slika 9. prikazuje dobnu strukturu majki djece rođene s kromosomopatijom koje su uspješno detektirane kombiniranim testom i žena u kojih je proveden prekid trudnoće na zahtjev zbog kromosomopatije ploda, a indikacija za RACZ je bio visokorizični kombinirani test probira. Više od 50% žena u kojih je uspješno detektirana kromosomopatija kombiniranim testom imalo je 36 ili više godina.



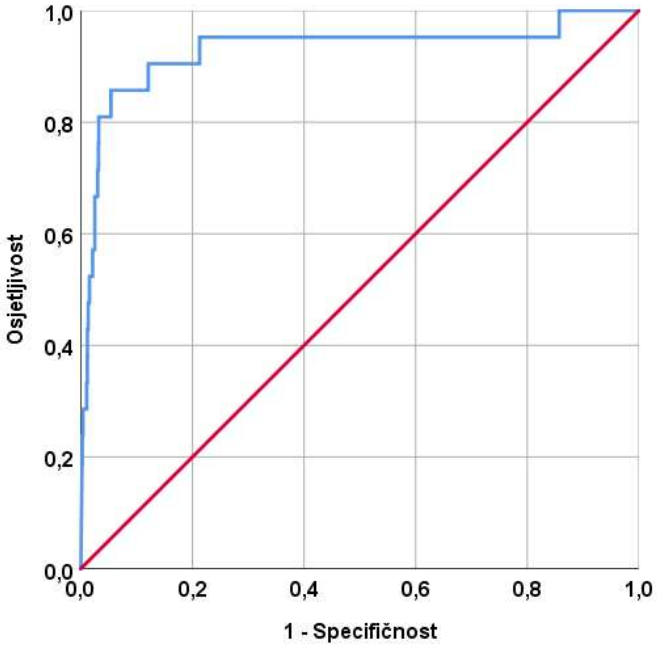
Slika 9. Prikazana je dobna struktra žena u kojih je kombiniranim testom uspješno detektirana kromosomopatija ploda (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Zbog životne dobi od 36 godina i više izvršeno je 573 RACZ, od čega je kromosomopatija potvrđena u 17 slučajeva (2,97%). Od 94 RACZ izvršenih zbog visokorizičnog kombiniranog probirnog testa, 11 (11,7%) je potvrdilo kromosomopatiju.

Od ukupno 1457 *a priori* visokorizičnih trudnica po životnoj dobi koje su pristupile kombiniranom testu, kromosomopatija je potvrđena u 10 (0,69%) slučajeva. Od 239 visokorizičnih rezultata kombiniranog testa, kromosomopatija je potvrđena u 17 (7,11%) slučajeva.

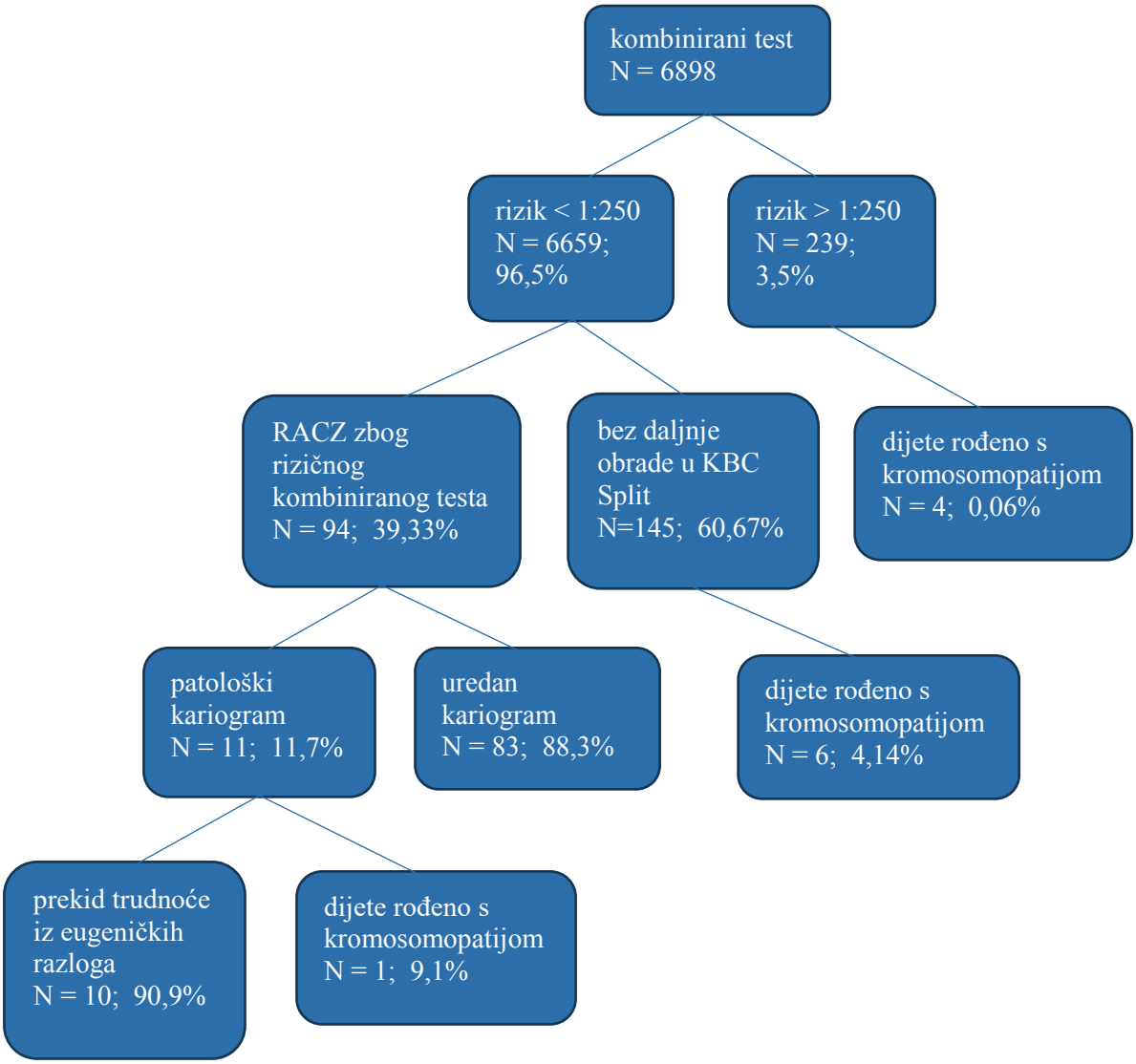
Područje ispod krivulje (engl. *Area under the curve*; AUC) tj. dijagnostička točnost za kombinirani test na ispitivanoj populaciji je: AUC= 0,929, 95% interval pouzdanosti 0,859 – 1,000, P<0,001 (Slika 10.). Uz fiksnu specifičnost od 95%, osjetljivost kombiniranog testa je

81% na ispitivanoj populaciji. Uz fiksnu graničnu vrijednost od 1:250, osjetljivost kombiniranog testa iznosi 81% uz specifičnost od 96,8%.



Slika 10. Prikaz ROC (engl. *Receiver operating characteristic*) krivulje za kombinirani test na ispitivanoj populaciji (KBC Split; 2011.-2017. godine).

Sažete rezultate kombiniranog testa probira s krajnjim ishodima testiranja prikazuje Slika 11. Probiru je pristupilo 6898 trudnica. Niskorizičan rezultat za kromosomopatije ploda dobilo je 6659 (96,5%) trudnica, od čega su 4 rezultata (0,06%) bila lažno negativna. Od 239 visokorizičnih rezultata, kromosomopatija je potvrđena u 17 (7,1%) slučajeva. Kombiniranim testom uspješno je detektirano 17 (80,1%) od ukupno 21 trudnoća s kromosomopatijom.



Slika 11. Prikazan je dijagram toka kombiniranog testa probira s ishodima testiranja (KBC Split; 2011.-2017. godine).

5. RASPRAVA

Probirni testovi prvog tromjesečja danas predstavljaju zlatni standard antenatalnog traganja za kromosomopatijama ploda. Mnoga istraživanja provedena 1990.-ih godina ukazala su na prednost kombiniranja biokemijskih biljega PAPP-A i β-hCG te ultrazvučnog biljega nuhalne prozirnost u detekciji kromosomopatija ploda tijekom prvog tromjesečja naspram dotad prevladavajućim probirnim testovima drugog tromjesečja. Od tada se kombinirani test u svijetu sve više primjenjuje i postaje jednom od najčešće primjenjivanih metoda probira na kromosomopatije ploda. Kombiniranim testom postiže se veći stupanj detekcije, uz dodatnu prednost dobivanja rezultata već u prvom tromjesečju, što u slučaju pozitivnog rezultata potvrđenog invazivnom metodom otvara mogućnost za raniji sigurniji prekid trudnoće (21, 72, 73). U Hrvatskoj je 2006. godine u Kliničkoj bolnici Sestre Milosrdnice u Zagrebu započela sustavna primjena kombiniranog testa (54). U Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split kombinirani test probira provodi se od 2011. godine. U promatranom je sedmogodišnjem razdoblju (2011.- 2017. godine) kombiniranom testu pristupilo 6898 trudnica. Najmanje kombiniranih testova provedeno je u prvoj godini izvođenja (2011. godine - 7,4% od ukupnog broja kombiniranih testova), jer su u tom prijelaznom razdoblju veliki udio prenatalnog probira na kromosomopatije ploda još uvijek činili biokemijski testovi probira (dvostruki i trostruki test). U prvoj godini izvođenja (2011.) udio kombiniranog testa probira u ukupnom broju prenatalnih probirnih testova na kromosomopatije iznosio je 55,66%, dok se na biokemijske testove probira odnosilo preostalih 44,44%. Sljedećih godina udio kombiniranih testova u ukupnom broju probirnih testova neprestano je rastao te danas iznosi više od 90%.

Prihvaćanje prenatalnih probirnih testova na kromosomopatije ploda od strane trudnica u razvijenim zemljama varira od 20% do više 90% (74). Na prihvaćanje pozitivno utječu informiranost trudnice o važnosti testiranja, viši obrazovni status, izvođenje testiranja za vrijeme rutinskog pregleda u trudnoći, a ulogu u prihvaćanju imaju i religijska stajališta žene te drugi čimbenici (74-76). Pokrivenost trudnica probirnim testovima manja je u zemljama u kojima prenatalna skrb nije dio primarne zdravstvene zaštite (75). U zemljama u kojima je program OSCAR prihvaćen kao standardizirani model s ciljem informiranja trudnica, provođenja kombiniranog testa i dobivanja rezultata u istom danu, prihvaćenost kombiniranog testa probira doseže do 98% (73, 77). U KBC Split udio probirnih testova u ukupnom broju porođaja iznosi 27,28%. Stvarna pokrivenost trudnica prenatalnim probirom na kromosomopatije u Splitu vjerojatno je veća s obzirom da se dio trudnoća prati u privatnim ustanovama za koje nismo skupljali podatke.

U trenutku izvođenja kombiniranog testa, 77,86% trudnica bilo je mlađe od 35 godina. Najviše je žena imalo između 30 i 35 godina (39,99%), a najmanje manje od 20 godina (1,01%) te više od 40 godina (1,97%). Takvi su rezultati u skladu s posljednjim izvješćem Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo o životnoj dobi rodilja u Hrvatskoj (78). Drugi autori također opisuju sličnu dobnu distribuciju trudnica koje pristupaju kombiniranom testu. U istraživanju provedenom 2015. godine u Kaliforniji 73,6% trudnica koje su pristupile kombiniranom testu bilo je mlađe od 35 godina (79). Korejski su autori za svoju populaciju prikazali sličnu dobnu distribuciju trudnica koje pristupaju kombiniranom testu: 78,4% trudnica bilo je mlađe od 35 godina, od čega je 49% imalo između 30 i 35 godina (80).

Kombinirani test probira u KBC Split izvodi se između 10. i 14. tjedna trudnoće, u skladu s preporukama medicine utemeljene na dokazima (35, 58). Najveću osjetljivost kombiniranog testa moguće je postići prilikom testiranja u 11. tjednu trudnoće (81). Osjetljivost PAPP-A kao biokemijskog biljega doseže maksimum u 9., 10. i 11. tjednu trudnoće, zbog veće razlike u koncentraciji PAPP-A između trisomičnih i euploidnih trudnoća u navedenom razdoblju u odnosu na kasnije. Iako se razlika slobodnog β-hCG između trisomnih i euploidnih trudnoća povećava s dobi trudnoće, važnost te razlike manja je od razlike PAPP-A (33). U KBC Split manji je dio trudnica (8,5%) trudnica testiran u 11. tjednu. Najviše trudnica pristupilo je probirnom testu u 12. tjednu trudnoće (48,93%), a u 13. tjednu još 37,85%. Proporcija visokorizičnih trudnica za kromosomopatije po tjednima trudnoće u vrijeme izvođenja kombiniranog testa je približno jednaka, osim za 10. tjedan zbog malog broja ispitanica koje su tada pristupile testiranju.

Brojna istraživanja potvrđuju da se, zbog starenja primarnih oocita, porastom životne dobi povećava rizik od rađanja djeteta s kromosomopatijom (7, 19). Stoga starije trudnice imaju veću prosječnu vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi i po rezultatima kombiniranog testa, što su pokazali i naši rezultati. Isto kao i prosječna vrijednost izračunatog rizika, porastom životne dobi povećava se i broj trudnica *a priori* visokorizičnih po životnoj dobi, kao i po rezultatima kombiniranog testa. Najveći broj visokorizičnih trudnica po kombiniranom testu pripadao je skupini starijoj od 35 godina. Dokazali smo postojanje pozitivne korelacije između *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi i kombiniranom testu probira. Povezanost je očekivana s obzirom da je polazište za izračun rizika u kombiniranom testu *a priori* rizik određen životnom dobi.

U ukupnom uzroku od 6898 žena dokazali smo da je značajno veći broj trudnica (21,1%) *a priori* visokorizičan za trisomiju 21 po životnoj dobi nego po rezultatima kombiniranog testa probira (3,5%). Literatura navodi da se probirom po životnoj dobi postiže maksimalna osjetljivost u detekciji Downovog sindroma od 30%, a kombiniranim testom čak do 90% (10). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se upućivanjem trudnica na kombinirani probir može znatno smanjiti ukupan broj RACZ u svrhu potvrde kromosomopatije ploda, a uz to postići i veća osjetljivost u odnosu na probir po životnoj dobi. Invazivne metode potvrde neizbježno nose rizik od spontanog pobačaja, s učestalosti za RACZ od 0,5 do 1% (6).

Svih 1457 spomenutih *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi pripadalo je dobnoj skupini od 35 godina i više. Da je u svih 1457 trudnica navedene dobi bila provedena RACZ, bili bismo otkrili 10 od 21 trudnoća (47,62%) s kromosomopatijom uz medicinsku cijenu od 7 do 15 spontanih pobačaja kao komplikacija RACZ, s obzirom da se očekuje jedan spontani pobačaj na 100 do 200 invazivnih zahvata (6). Drugim riječima, od 1457 *a priori* visokorizičnih trudnica po životnoj dobi, kromosomopatija bi bila potvrđena u 10 (0,69%) slučajeva. Kombiniranim testom je u ukupnom uzorku izdvojen značajno manji broj (239) visokorizičnih trudnica, uz veću uspješnost otkrivanja kromosomopatija (17 trudnoća, 7,11%). Među ženama starijim od 35 godina visoki rizik potvrđen je u samo 118 (8,09%) od izvornih 1457 *a priori* visokorizičnih po životnoj dobi. Takvim pristupom hipotetski broj spontanih pobačaja među starijim trudnicama smanjen je na najviše jedan, a u ukupnom uzorku na maksimalno tri. Upućivanjem starijih trudnica na kombinirani probir prije RACZ može se umanjiti učestalost invazivnih zahvata i posljedičnih spontanih pobačaja bez posljedica na stupanj detekcije Downovog sindroma.

Probirom po životnoj dobi moguće je dijagnosticirati samo 30% slučajeva Downovog sindroma. Preostalih 70% djece s Downovim sindromom rađaju majke mlađe od 36 godina koje su *a priori* niskorizične za kromosomopatije ploda (10). Stoga je posebno važna uloga kombiniranog testa da među *a priori* niskorizičnim trudnicama izdvoji skupinu s povećanim rizikom od kromosomopatija ploda. Kombiniranim testom probira smo u skupini *a priori* niskorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi (mlađe od 36 godina) izdvojili i preporučili RACZ u 121 visokorizične trudnice koje probirom po životnoj dobi ne bi bile detektirane. Time je zadovoljen osnovni cilj bilo kojeg probirnog testa na kromosomopatije ploda koji predstavlja otkrivanje visokorizičnih trudnica među niskorizičnom većinom (15).

Budući da je vjerojatnost za pozitivni rezultat kombiniranog testa u funkciji dobnog rizika trudnice, veća osjetljivost u otkrivanju kromosomopatija postiže se u trudnica starije životne dobi (82, 83). Istraživanje provedeno u Kaliforniji na uzorku od 452 000 žena pokazalo je da u trudnica starijih od 35 godina osjetljivost kombiniranog testa doseže više od 95% (79). U studiji provedenoj u Beču na populaciji od 4939 žena, 64% trudnica u kojih je kombinirani test uspješno detektirao kromosomopatiju bilo je starije od 35 godina (84). U našem je istraživanju od ukupno 17 uspješno detektiranih trudnoća s kromosomopatijom 9 (52,94%) žena imalo 36 ili više godina, dok je udio trudnica te životne dobi u ukupnom uzorku iznosio samo oko 20%.

U razvijenim zemljama se od 50 do 80% trudnica nakon pozitivnog rezultata kombiniranog testira odlučuje za RACZ ili neku drugu potvrdnu metodu (77-80). Tišlarić-Medenjak i suradnici za KB Sestre milosrdnice opisuju stopu prihvaćanja invazivnih metoda u trudnica s visokorizičnim rezultatom kombiniranog probira od 77,6% (54). Prihvaćanje RACZ u KBC Split manje je od navedenog. Kombiniranim testom pronađeno je 239 trudnica s rizikom od Downovog sindroma većim od 1:250. U istom je razdoblju zbog kombiniranog testa indicirano 94 RACZ, iz čega proizlazi da je okvirna prihvaćenost 40%. Istraživanja pokazuju da više trudnica pristaje na invazivne potvrdne metode ako su pravilo informirane o važnosti prenatalnog probira na kromosomopatije ploda, kao i o samom postupku (85).

Posljednjih godina primjećuje se stalno opadanje broja izvedenih RACZ (86, 87). Ukupan broj RACZ izvedenih u KBC Split je 2011. godine iznosio 193, dok je 2017. godine izvedeno samo 36 RACZ. Takav trend vjerojatno je posljedica sve veće primjene metode analize slobodne DNA ploda iz krvi majke u svrhu otkrivanja kromosomopatija (NIPT), kojom se već od 10. tjedna trudnoće može postići veća osjetljivost nego u svim drugim probirnim testovima od 99%, s manje od 0,5 % lažno pozitivnih rezultata (65, 86, 87). Smjernice ACOG iz 2012. godine predviđaju uključenje NIPT-ova u postojeće protokole, uz preporuku primjene u visokorizičnih trudnica prije invazivnog zahvata (58). Moguće je da se dio trudnica nakon visokorizičnog rezultata kombiniranog testa odluči za NIPT kao dodatnu provjeru probinim testom boljih karakteristika te tek u slučaju potvrde visokorizičnosti pristaje na RACZ (86, 87). U Republici Hrvatskoj ne postoji službena evidencija provedbe bilo kojeg od velikog broja NIPT testova koji se nude na tržištu. Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje ni u kojim okolnostima za sada ne pokriva troškove izvođenja probira temeljem analize slobodne DNA ploda iz krvi majke.

Downov sindrom se pojavljuje u oko 0,2% svih trudnoća. Budući da se određeni dio plodova s trisomijom 21 gubi spontanim pobačajem i prekidom trudnoće na zahtjev trudnice, incidencija je među živorođenima nešto manja (0,12%) (88-90). U KBC Split je u promatranom razdoblju bilo 88 trudnoća s kromosomopatijom (0,29%, 1:345 trudnoća), od čega je rođeno 48 novorođenčadi (0,16%, 1:645 živorođenih), a 40 plodova je pobačeno. U 21 (26,14%) od navedenih žena tijekom trudnoće izveden je kombinirani test probira, što je razmjerno udjelu kombiniranog testa u ukupnom broju porođaja (22,34%) u KBC Split.

Kombiniranim probirom je među 6898 testiranih trudnica izdvojeno 3,5% (239 od 6898) s izračunatim rizikom od kromosomopatija ploda većim od 1:250. Među njima uspješno je detektirano 81% (17 od 21) zahvaćenih trudnoća, uz 4 lažno negativna nalaza. Neprepoznatih 19% (4 od 21) zahvaćenih trudnoća kombiniranim je testom pogrešno svrstano u skupinu s rizikom manjim od 1:250, koju je činilo 96,5% svih testiranih žena. U literaturi se opisuje osjetljivost kombiniranog testa u rasponu od 80 do maksimalnih 90%, uz 5% lažno pozitivnih nalaza (35, 58, 81). ROC analiza za ispitivanu je populaciju pokazala osjetljivost kombiniranog testa u otkrivanju kromosomopatija od 81% i specifičnost od 96,8%, uz graničnu vrijednost postavljenu na 1:250. Naši rezultati uklapaju se u očekivani raspon osjetljivosti, uz manji broj lažno pozitivnih nalaza, odnosno nešto veću specifičnost.

Pogreške u mjerenju nuhalne prozirnosti najviše utječu na osjetljivost kombiniranog testa te je mogu znatno smanjiti. Za postizanje visoke osjetljivosti neophodno je iznimno precizno mjerenje nuhalne prozirnosti, što je moguće postići samo uz ultrazvučni uređaj vrhunske klase, dobro educiranog ultrasoničara i neograničeno vrijeme za pojedini pregled (58, 91).

Valja naglasiti da je izračun osjetljivosti i specifičnosti za našu populaciju samo okvirna vrijednost i da ne oslikava u potpunosti realno stanje, što je jedno od ograničenja ovog istraživanja. Naime, nismo bili u mogućnosti pojedinačno ispratiti ishode trudnoća za svih 6898 testiranih trudnica, već samo za one koje su zatražile pobačaj iz eugeničkih razloga, koje su prošle RACZ ili su rodile dijete s kromosomopatijom u KBC Split. Za ostale smo pretpostavili da su rodile dijete s urednim kariotipom. Također je moguće da izračun nije u potpunosti precizan zbog relativno malog uzorka kada se u obzir uzme niska učestalost Downovog sindroma u populaciji (0,29% trudnoća).

U našoj zemlji probir na kromosomopatije ploda nije organiziran na razini nacionalnog programa. Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu u preporuci iz 2010. godine predlaže da se svakoj trudnici staroj 36 godina i više u trenutku začeća preporuči RACZ, a mlađima biokemijski probirni testovi drugog tromjesečja ili kombinirani test (15). Zbog dokazanih prednosti kombiniranog testa nad testovima drugog tromjesečja, poput veće osjetljivosti i ranije dijagnoze, svjetske smjernice ga preporučuju kao zlatni standard za sve trudnice koje se jave na pregled u prvom tromjesečju (35, 58, 81). Naše istraživanje potvrdilo je važnost i učinkovitost provođenja kombiniranog testa u otkrivanju kromosomopatija ploda. Kombiniranim testom uspješno su detektirane visokorizične trudnice u skupini *a priori* niskorizičnih, čime je zadovoljena osnovna uloga probira ove vrste. Procijenjena validnost testa u našoj ustanovi usporediva je sa svjetskim standardima.

6. ZAKLJUČCI

1. Probirne testove na kromosomopatije ploda u KBC Split prihvaća oko 27% trudnica, a među njima najveći udio pripada kombiniranom testu.

2. Porastom životne dobi trudnice povećava se prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi trudnice, kao i po rezultatima kombiniranog testa.

3. Porastom životne dobi trudnice povećava se broj *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi, kao i po rezultatima kombiniranog testa.

4. Broj *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi značajno je veći od broja visokorizičnih po rezultatima kombiniranog testa.

5. Prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi veća je od rizika izračunatog kombiniranim testom, uz postojanje pozitivne korelacije.

6. Kombiniranim testom moguće je veliki udio *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 (36 godina i starije) svrstati u niskorizične i tako smanjiti broj ranih RACZ i njihovih komplikacija.

7. Kombiniranim testom moguće je iz skupine *a priori* niskorizičnih trudica za trisomiju 21 (mlađe od 36 godina) uspješno detektirati visokorizične koje probirom po životnoj dobi ne bi bile otkrivene.

8. Proporcija visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po tjednima trudnoće u vrijeme izvođenja kombiniranog testa približno je jednaka.

9. Uz graničnu vrijednost postavljenu na 1:250, približna osjetljivost kombiniranog testa u otkrivanju kromosomopatija za ispitivanu populaciju iznosi 81%, a specifičnost 96,8%, što se uklapa u očekivane standarde.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Cox TM, Sinclair J. Načela medicinske genetike. U: Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. str. 77-128.
2. Turnpenny P, Ellard S. Kromosomi i dioba stanice. U: Turnpenny P, Ellard S. Emeryjeve osnove medicinske genetike. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 31-53.
3. Stipojev F. Citogenetika. U: Kurjak A, Stavljanić- Rukavina A, Pavelić K. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske toplice: Tonimir; 2000. str. 187-202.
4. Mardešić D. Nasljedne i prenatalno stečene bolesti. U: Mardešić D i sur. Pedijatrija. Zagreb: Školska knjiga; 2003. str. 75-127.
5. Hsu LYF. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. U: Milunsky A. Genetic disorders and the fetus, 4th edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1998. str. 179.
6. Singer Z, Podobnik M. Nasljedne bolesti i trudnoća (genetika reprodukcije). U: Đelmiš J, Orešković S i sur. Fetalna medicina i opstetricija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 85-95.
7. Hook EB. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. Obstet Gynecol. 1981;58(3):282-5.
8. Zuffardi O, Maraschio P. Factors predisposing to chromosome pathology. Pathologica. 1983;75 Suppl:96-102.
9. Winkelmann M, Pfitzer P, Schneider W. Significance of polyploidy in megakaryocytes and other cells in health and tumor disease. Klin Wochenschr. 1987;65(23):1115-31.
10. Stipoljev F, Vičić A. Prednosti i ograničenja invazivne prenatalne dijagnostike. Paediatr Croat. 2015;59:130-7.
11. Wagner J. Neinvazivno prenatalno testiranje. Paediatr Croat. 2016; 60(Suppl 1):46-52.
12. Wald NJ. Guidance on terminology. J Med Screen. 2006;13(1):53.
13. Maxim LD, Niebo R, Utell MJ. Screening tests: a review with examples. Inhal Toxicol. 2014;26(13):811-28.
14. MacRae AR, Canick JA. Maternal Prenatal Screening for Fetal Defects. U: Gronowski AM. Handbook of Clinical Laboratory Testing During Pregnancy. Totowa: Humana Press Inc; 2004. str. 71-139.
15. Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu Hrvatskog liječničkog zbora. Nacionalna stručna preporuka za prenatalni probir i dijagnostiku kromosomopatija. Gynaecol Perinatol. 2010;19(2):119-26.
16. Cuckle H. Prenatal Screening Using Maternal Markers. J Clin Med. 2014;3(2):504-20.

17. Đurić K. Biokemijski testovi probira kromosomopatija i njihova primjena u Hrvatskoj. Paediatr Croat. 2015;59:125-9.
18. Sørensen S, Momsen G, Sundberg K, Friis-hansen L, Jørgensen FS. First-trimester risk calculation for trisomy 13, 18, and 21: comparison of the screening efficiency between 2 locally developed programs and commercial software. Clin Chem. 2011;57(7):1023-31.
19. Nicolaides KH. First trimester diagnosis of chromosomal defects. U: Nicolaides KH. The 11–13+6 weeks scan. London: Fetal Medicine Foundation; 2004. str. 7-45.
20. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, i sur. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. N Engl J Med. 2005;353(19):2001-11.
21. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, McGillivray G. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis in obstetrics. Ultrasound Obstet Gynecol. 2016;48:256-68.
22. Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. Fetal Diagn Ther. 2001;16:4-9.
23. Prieto B, Cándenas M, Venta R, Ladenson JH, Alvarez FV. Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. Clin Chem Lab Med. 2002;40(7):667-72.
24. Calabrese G, Fantasia D, Alfonsi M, Morizio M, Celentano C, Guanciali Franchi P, i sur. Aneuploidy screening using circulating fetal cells in maternal blood by dual-probe FISH protocol: a prospective feasibility study on a series of 172 pregnant women. Mol Genet Genomic Med. 2016;4(6):634-40.
25. Sifakis S, Papantoniou N, Kappou D, Antsaklis A. Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome: current knowledge and novel insights. J Perinat Med. 2012;40(4):319-27.
26. Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. Arch Toxicol. 2016;90(12):2917-29.
27. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol. 2002;20(3):219-25.
28. Robinson WP, Mcfadden DE, Stephenson MD. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. Am J Hum Genet. 2001;69(6):1245-54.
29. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. Am J Hum Genet. 2004;75(3):376-85.

30. Caron L, Tihy F, Dallaire L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analyses in one laboratory. Am J Med Genet. 1999;82(2):149-54.
31. Huderer-Đurić K, Suchanek E. Biokemijski probir sindroma Down u trudnoći. U: Kurjak A, Stavljanić- Rukavina A, Pavelić K. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske toplice: Tonimir; 2000. str. 187-202.
32. Đurić K. Biokemijski testovi probira fetalnih anomalija. U: Đelmiš J, Orešković S i sur. Fetalna medicina i opstetricija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 85-95.
33. Shiefa S, Amargandhi M, Bhupendra J, Moulali S, Kristine T. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β-hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. Indian J Clin Biochem. 2013;28(1):3-12.
34. Tørring N. First trimester combined screening - focus on early biochemistry. Scand J Clin Lab Invest. 2016;76(6):435-47.
35. Alldred SK, Takwoingi Y, Guo B, Pennant M, Deeks JJ, Neilson JP, Alfirevic Z. First trimester serum tests for Down's syndrome screening. Cochrane Database Syst Rev. 2015;(11):CD011975.
36. Brajenović-Milić B, Tišlarić D, Bačić J, Paravić J, Silvar AE, Kapović M, i sur. Screening for Down's syndrome and neural tube defect in Croatia. Fetal Diagn Ther. 1998;13:367-71.
37. Alldred SK, Deeks JJ, Guo B, Neilson JP, Alfirevic Z. Second trimester serum tests for Down's Syndrome screening. Cochrane Database Syst Rev. 2012;(6):CD009925.
38. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw A, Mcguire A. Antenatal screening for Down's syndrome. J Med Screen. 1997;4(4):181-246.
39. Bradley LA, Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE, Opitz JM, Irons M, i sur. Levels of unconjugated estriol and other maternal serum markers in pregnancies with Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome fetus. Am J Med Genet. 1999;82:355-8.
40. Bradley LA, Canick JA, Palomaki GE, Haddow JE. Undetectable maternal serum unconjugated estriol levels in the second trimester: risk of perinatal complications associated with placental sulfatase deficiency. Am J Obstet Gynecol. 1997;176:531-5.
41. Van Mieghem T, Hindryckx A, Van Calsteren K. Early fetal anatomy screening: who, what, when and why?. Curr Opin Obstet Gynecol. 2015;27(2):143-50.
42. Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO, i sur. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013;41(1):102-13.

43. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. Am J Obstet Gynecol. 2004;191(1):45-67.
44. Souka AP, Krampl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. Ultrasound Obstet Gynecol 2001;18:9-17.
45. Sonek J, Nicolaides K. Additional first-trimester ultrasound markers. Clin Lab Med. 2010;30(3):573-92.
46. Snijders RJM, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. Lancet. 1998;351:343-6.
47. De Domenico R, Faraci M, Hyseni E, Di Prima FA, Valenti O, Monte S, i sur. Increased nuchal traslucency in normal karyotype fetuses. J Prenat Med. 2011;5(2):23-6.
48. Cicero S, Rembouskos G, Vandecruys H, Hogg M, Nicolaides KH. Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with absent nasal bone at the 11–14 weeks scan. Ultrasound Obstet Gynecol. 2004;23:218-23.
49. Snijders RJM, Sebire NJ, Nayar R, Souka A, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency in trisomy 13 fetuses at 10-14 weeks of gestation. Am J Med Genet. 1999;86:205-7.
50. Sebire NJ, Snijders RJ, Brown R, Southall T, Nicolaides KH. Detection of sex chromosome abnormalities by nuchal translucency screening at 10-14 weeks. Prenat Diagn. 1998;18:581-4.
51. Kurjak A. Ultrazvučna prenatalna dijagnostika. U: Kuvačić I, Kurjak A, Đelimš J i sur. Porodništvo. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 157-68.
52. Renna MD, Pisani P, Conversano F, Perrone E, Casciaro E, Di Renzo GC, i sur. Sonographic markers for early diagnosis of fetal malformations. World J Radiol. 2013;5(10):356-71.
53. Nyberg DA, Souter VL. Sonographic markers of fetal trisomies: second trimester. J Ultrasound Med. 2001;20(6):655-74.
54. Tišlarić-Medenjak D, Košec V, Kos M, Latin V, Harni V, Lovrić B i sur. Kombinirani ultrazvučno-biokemijski probir fetalnih aneuploidija od 10. – 14. tjedna trudnoće: Prvi rezultati primjene testa u Hrvatskoj. Gynaecol Perinatol. 2008;17(4):195-200.
55. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol. 2002;20(3):219-25.
56. Cleary-Goldman J, Berkowitz RL. First trimester screening for Down syndrome in multiple

pregnancy. Semin Perinatol. 2005;29(6):395-400.
57. Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005;25(3):221-6.
58. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. Obstet Gynecol. 2016;127(5):e123-37.
59. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. N Engl J Med. 1999;341(7):461-7.
60. Guanciali-Franchi P, Iezzi I, Palka C, Mattarelli B, Morizio E, Calabrese B, Benn P. Comparison of combined, stepwise sequential, contingent, and integrated screening in 7292 high-risk pregnant women. Prenat Diagn. 2011;31(11):1077-81.
61. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350:485-7.
62. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013;41:26-32.
63. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, i sur. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350:485-7.
64. Gekas J, Langlois S, Ravitsky V, Audibert F, van den Berg DG, Haidar H, Rousseau F. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosome abnormalities: review of clinical and ethical issues. Appl Clin Genet. 2016;9:15-26.
65. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015;45:249-66.
66. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Obstet Gynecol. 2012;120(6):1532-4.
67. Dugoff L. First- and second-trimester maternal serum markers for aneuploidy and adverse obstetric outcomes. Obstet Gynecol. 2010;115(5):1052-61.
68. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, i sur. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (The FASTER Trial). Am J Obstet Gynecol. 2004;191:1446-51.

69. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:1762-7.
70. Roeder HA, Dejbakhsh SZ, Parast MM, Laurent LC, Woelkers DA. Abnormal uterine artery Doppler velocimetry predicts adverse outcomes in patients with abnormal analytes. Pregnancy Hypertens. 2014;4(4):296-301.
71. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Vidaver J, Sullivan L, Canick JA, i sur. Quad screen as a predictor of adverse pregnancy outcome. Obstet Gynecol. 2005;106:260 –7.
72. Wald NJ, Hackshaw AK. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. Prenat Diagn. 1997;17:821-9.
73. Spencer K, Spencer CE, Power M, Moakes A, Nicolaides KH. One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies: a report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. Br J Obstet Gynecol. 2000;107:1271-5.
74. Dormandy E, Michie S, Weinman J, Marteau TM. Variation in uptake of serum screening: the role of service delivery. Prenat Diagn. 2002;22(1):67-9.
75. Van den Berg M, Timmermans DR, Kleinveld JH, Garcia E, Van Vugt JM, Van der Wal G. Accepting or declining the offer of prenatal screening for congenital defects: test uptake and women's reasons. Prenat Diagn. 2005;25(1):84-90.
76. Stefansdottir V, Skirton H, Jonasson K, Hardardottir H, Jonsson JJ. Effects of knowledge, education, and experience on acceptance of first trimester screening for chromosomal anomalies. Acta Obstet Gynecol Scand. 2010;89(7):931-8.
77. Spencer K, Spencer CE, Power M, Dawson C, Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years prospective experience. Br J Obstet Gynecol. 2003;110:281-6.
78. Stevanović R, Capak K, ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. godinu. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017;265-84.
79. Baer RJ, Flessel MC, Jelliffe-Pawlowski LL, Goldman S, Hudgins L, Hull AD, i sur. Detection Rates for Aneuploidy by First-Trimester and Sequential Screening. Obstet Gynecol. 2015;126(4):753-9.

80. Park SY, Jang IA, Lee MA, Kim YJ, Chun SH, Park MH. Screening for chromosomal abnormalities using combined test in the first trimester of pregnancy. Obstet Gynecol Sci. 2016;59(5):357-66.
81. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, i sur. First-trimester or second trimester screening, or both, for Down's syndrome. Firstand Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. N Engl J Med. 2005;353:2001-11.
82. Spencer K. Age related detection and false positive rates when screening for Down's syndrome in the first trimester using fetal nuchal translucency and maternal serum free β-hCG hCG and PAPP-A. Br J Obstet Gynaecol. 2001;108:1043-6.
83. Valinen Y, Rapakko K, Kokkonen H, Laitinen P, Tekay A, Ahola T, Ryynanen M. Clinical first-trimester routine screening for Down syndrome in singleton pregnancies in northern Finland. Am J Obstet Gynecol. 2007;196(3):278.e1-5.
84. Schuster K, Hafner E, Stengl G, Metzenbauer M, Höfinger D, Philipp K. The first trimester 'combined test' for the detection of Down syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies. Prenat Diagn. 2002;22:211-5.
85. Brajenović-Milić B, Babić I, Ristić S, Vraneković J, Brumini G, Kapović M. Pregnant women's attitudes toward amniocentesis before receiving Down syndrome screening results. Womens Health Issues. 2008;18(2):79-84.
86. Robson SJ, Hui L. National decline in invasive prenatal diagnostic procedures in association with uptake of combined first trimester and cell-free DNA aneuploidy screening. Aust New Zeal J Obstet Gynaecol. 2015;55:507-10.
87. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. Prenat Diagn. 2015;35:972-9.
88. Dolk H, Loane M, Garne E, De Walle H, Queisser-Luft A, De Vigan C, i sur. Trends and geographic inequalities in the prevalence of Down syndrome in Europe, 1980-1999. Rev Epidemiol Sante Publique. 2005;53:2S87-95.
89. Morris JK, Alberman E. Trends in Down's syndrome live births and antenatal diagnoses in England and Wales from 1989 to 2008: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. BMJ. 2009;339:b3794.
90. De Graaf G, Buckley F, Skotko BG. 2015. Estimates of the live births, natural losses, and elective terminations with Down syndrome in the United States. Am J Med Genet. Part A 167A:756-67.

91.Evans MI, Van Decruyes H, Nicolaides KH. Nuchal translucency measurements for first-trimester screening: the ‘price’ of inaccuracy. Fetal Diagn Ther 2007;22:401-4.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja je prikazati rezultate i istražiti uspješnost kombiniranog testa probira na kromosomopatije ploda u KBC Split.

Materijali i metode: Provedeno je presječno retrospektivno istraživanje. Uključene su sve trudnice u kojih je proveden kombinirani test probira u Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split od 1. siječnja 2011. do 31. prosinca 2017. godine. Podatci su prikupljeni iz digitalne arhive Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku i arhive Klinike za ženske bolesti i porode. Promatrani su sljedeći podatci: a) godina izvođenja kombiniranog testa, b) životna dob ispitanica, c) navršeni tjedan trudnoće, d) vrijednosti beta podjedinice humanog korionskog gonadotropina (β-hCG) iz periferne krvi majke, e) vrijednost proteina A udruženog s trudnoćom (engl. *pregnancy associated protein A*; PAPP-A) iz periferne krvi majke, f) vrijednost ultrazvučnog biljega nuhalne prozirnosti, g) vrijednosti *a priori* rizika od kromosomopatija ploda po životnoj dobi trudnice, h) vrijednosti rizika od kromosomopatija ploda izračunatog kombiniranim testom, i) indikacija za izvođenje amniocenteze (RACZ), j) prethodna provedenost kombiniranog testa u žena kojima je odobren prekid trudnoće iz eugeničkih ili medicinskih razloga, k) prethodna provedenost kombiniranog testa u žena koje su rodile dijete s kromosomopatijom.

Rezultati: Udio probirnih testova na kromosomopatije ploda u ukupnom broju porođaja iznosio je 27,28%, a među njima je većinu činio kombinirani test (81,89%). Kombiniranom testu u istraživanom razdoblju pristupilo je 6898 trudnica. Najveći broj trudnica pripadao je dobnoj skupini od 30 do 35 godina (39,99%). Kombinirani test provodio se između 10. i 14. tjedna trudnoće, najviše u 12. tjednu (48,93%). Porastom životne dobi trudnice statistički se značajno povećava broj *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi, kao i po rezultatima kombiniranog testa (P<0,001). Broj *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi (1457 trudnica) značajno je veći od broja visokorizičnih trudnica po rezultatima kombiniranog testa (239 trudnica) (P<0,001). Od 1457 *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi, visoki je rizik potvrđen kombiniranim testom u njih 118. Kombiniranim je testom iz skupine *a priori* niskorizičnih trudnica za trisomiju 21 po životnoj dobi (mlađe od 36 godina) pronađena 121 visokorizična trudnica koja probirom po životnoj dobi ne bi bila detektirana. Porastom životne dobi trudnice statistički se značajno povećava prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi trudnice, kao i po rezultatima kombiniranog testa (P<0,001). Prosječna vrijednost *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi veća je od rizika izračunatog kombiniranim testom. Postoji pozitivna

korelacija između vrijednosti *a priori* rizika od trisomije 21 po životnoj dobi i rizika izračunatog kombiniranim testom probira (r=0,377, P<0,001). U 11 od 48 (22,92%) majki djece rođene s kromosomopatijim tijekom trudnoće izveden je kombinirani test. U 10 od 40 (25%) žena kojima je odobren pobačaj iz eugeničkih razloga zbog kromosomopatije ploda rizičan kombinirani test bio je indikacija za RACZ. Kombiniranim testom uspješno je detektirano 17 od navedene 21 trudnoća s kromosomopatijom. Uz fiksnu graničnu vrijednost od 1:250, procijenjena osjetljivost kombiniranog testa za ispitivanu populaciju iznosi 81% uz specifičnost od 96,8% (AUC=0,929, 95% CI 0,859-1,000, P<0,001).

Zaključak: Kombiniranim testom u KBC Split uspješno se postiže osnovni cilj probirnih metoda na kromosomopatije ploda – pronalaženje visokorizičnih trudnica među ženama mlađima od 36 godina. Moguće je i dio *a priori* visokorizičnih trudnica za trisomiju 21 (36 godina i starije) svrstati u niskorizične i tako smanjiti broj RACZ i spontanih pobačaja kao neizbježnih komplikacija invazivnih zahvata prenatalne dijagnostike.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Combined first trimester screening for fetal chromosomal abnormalities in University Hospital Centre of Split

Objective: The aim of this study is to present the results, as well as to investigate the success rate of the combined first trimester screening for fetal chromosomal abnormalities in the University Hospital Centre of Split.

Materials and methods: A retrospective cross-sectional study was carried out. The study involved all pregnant women who underwent combined first trimester screening for fetal chromosomal abnormalities in the University Hospital Centre of Split from January 1st 2011 to December 31st 2017. Relevant data was collected from the Department of Medical Laboratory Diagnostics digital archive, as well as from the Department of Gynecology and Obstetrics archive. The following data was taken into account: a) year in which the test was performed, b) age of the participants, c) gestational age, d) values of the beta subunit of human chorionic gonadotrophin (β-hCG) from the peripheral blood of the mother, e) values of the pregnancy associated protein A (PAPP-A) from the peripheral blood of the mother, f) values of the ultrasound marker nuchal translucency, g) values of *a priori* risk of fetal chromosomal abnormalities based on the age of the mother, h) values of risk of fetal chromosomal abnormalities calculated with the combined first trimester screening, i) indication for performing amniocentesis, j) previous implementation of the combined first trimester screening in women to whom abortion was approved for eugenic or medical reasons, k) previous implementation of the combined first trimester screening in women who bore a child with chromosomal abnormalities.

Results: The amount of screenings for fetal chromosomal abnormalities in the total number of births was equivalent to 27.28%, and most of those screenings were in fact combined first trimester screenings (81.89%). A total of 6898 pregnant women underwent the combined first trimester screening in the research period. Most women were between 30 and 35 years of age (39.99%). The combined screening was performed between the 10th and the 14th week of pregnancy, mostly in the 12th week (48.93%). With the increase of a patient's age, a statistically significant increase in the number of pregnant women who were *a priori* at high risk for trisomy 21 based on age, as well as on the combined test results was detected ($P<0.001$). The number of pregnant women who were *a priori* at high risk for trisomy 21 based on age (1457 pregnant women) was significantly higher than the number of those at high risk for it based on the combined screening results (239 pregnant women) ($P<0.001$). Out of 1457 pregnant women who were *a priori* at high risk for trisomy 21 based on age, the combined test led to

determination of a high-risk pregnancy in 118 cases. When it comes to pregnant women who were *a priori* at low risk for trisomy 21 based on age (under 36 years of age), the combined test led to determination of 121 cases of high-risk pregnancies, which would not have been detected with screening based on age. With the increase of a patient's age, a statistically significant increase in the mean value of *a priori* risk for trisomy 21 based on age, as well as on the combined test results was detected (P<0.001). The mean value of *a priori* risk for trisomy 21 based on age was higher than the one calculated with the combined first trimester screening. There was a positive correlation between the value of *a priori* risk for trisomy 21 based on age and the one calculated with the combined first trimester screening (r=0.377, P<0.001). A total of 11 out of 48 (22.92%) mothers of children born with chromosomal abnormalities underwent combined screening during their pregnancy. In 10 out of 40 (25%) women to whom abortion was approved for eugenic reasons related to fetal chromosomal abnormalities the high-risk combined screening was an indication for amniocentesis. The combined screening led to a successful determination of 17 of the aforementioned 21 pregnancies with chromosomal abnormalities. With the cut-off value set at 1:250, the estimated sensitivity of the combined screening for the research population was equivalent to 81%, with the specificity of 96.8% (AUC=0.929, 95% CI 0.859-1.000, P<0.001).

Conclusion: The combined first trimester screening in the University Hospital Centre of Split leads to a successful attainment of the basic objective of screening methods for fetal chromosomal abnormalities – i.e. to the detection of high-risk pregnant women for fetal chromosomal abnormalities within patients under the age of 36. It is also possible to rank a part of pregnant women who are *a priori* at high risk for trisomy 21 (aged 36 and above) as low-risk, thus reducing the number of early amniocentesis and miscarriages, which are inevitable complications of prenatal diagnostics invasive interventions.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Dora Jakus

Datum i mjesto rođenja: 28.2.1994., Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Kroz smrdečac 29, Split

E-mail: dora0jakus@gmail.com

OBRAZOVANJE

2000. – 2008. Osnovna škola „Split 3“, Split

2008. – 2012. V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2012. – 2018. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program medicina

ZNANJA I VJEŠTINE

Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom.

OSTALE AKTIVNOSTI

2009. – 2011. Volonter u udruzi „HELP“

2013. – 2015. Demonstratorica na Katedri za anatomiju

2013. – 2015. Demonstratorica na Katedri za histologiju i embriologiju

2014. – 2017. Demonstratorica na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju

2015. Dobitnica Dekanove nagrade za akademsku godinu 2013./2014.

2015. – 2018. Demonstratorica na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju

2016. Dobitnica Rektorove nagrade za izvrsnost za akademsku godinu 2014./2015.

2017. – 2018. Demonstratorica na Katedri za kliničke vještine

PUBLICIRANI RADOVI

1.Riado Minguez D, Kowalski M, Vallve Odena M, Longin Pontzen D, Jelicic Kadic A, Jeric M, Dosenovic S, Jakus D, i sur. Methodological and Reporting Quality of Systematic Reviews Published in the Highest Ranking Journals in the Field of Pain. Anesth Analg. 2017;125(4):1348-54.

2. Alujević Jakus I, Jakus D, Marinović J, Ćavar M, Banić I, Vilović K. Expression of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in the Vaginal Wall in Postmenopausal Women with Pelvic Organ Prolapse. Gynecol Obstet Invest. 2017 Aug 30 [Epub ahead of print] doi: 10.1159/000480236.
3. Alujević Jakus I, Jakus D, Aračić N, Stipić I, Vilović K. Immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1α in stromal cells of vaginal tissue in post-menopausal women with pelvic organ prolapse. Indian J Med Res. 2017;146(Suppl):S63-7.