

Presejalni hormonski testi za Downov sindrom Hormonal screening tests for Down syndrome

Nataša Tul*

Ključne besede
Downov sindrom
alfa-fetoproteini
gonadotropini horionski
estriol

Key words
Down syndrome
alpha-fetoproteins
gonadotropins chorionic
estriol

Izvleček. Downov sindrom je najpogostejši posamezni vzrok za duševno zaostalost otrok. Prenatalno odkrivanje poteka v Sloveniji z amniocentezo in kariotipizacijo od leta 1981, in sicer s presejanjem na podlagi starosti matere. V letih 1987–94 smo prenatalno odkrili le 17 % plodov z Downovim sindromom. Leta 1995 smo začeli s presejanjem s trojnim hormonskim testom v drugem trimesečju enoplodnih nosečnic. V materini krvi določimo vrednosti alfa-fetoproteina, humanega horionskega gonadotropina in nekonjugiranega estriola ter izračunamo tveganje za rojstvo otroka z Downovim sindromom. Pričakujemo, da bomo odkrili približno 60 % plodov z Downovim sindromom ob 5–7 % lažno pozitivnih rezultatov. V članku predstavljamo praktične vidike testa in opisujemo hormone, ki jih določamo. Posebej opisujemo zaplete, ki se pojavljajo pri nosečnicah, ki so lažno vključene v skupino z visokim tveganjem za rojstvo otroka z Downovim sindromom. Opisano je tudi presejanje z merjenjem nuchalne svetline in laboratorijske metode, ki bodo morda uporabne v prihodnosti.

Abstract. Down syndrome is the most common individual cause of mental retardation in children. Prenatal screening for Down syndrome, based on the maternal age, has been practised in Slovenia since 1981. Between 1987 and 1994, Down syndrome was diagnosed prenatally in merely 17 % of infants. In 1995, triple-marker testing for the second trimester prenatal diagnosis of Down syndrome was introduced. Using this method we measured alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotrophin and unconjugated estriol in maternal blood, and estimated the pregnant woman's risk of carrying a baby with Down syndrome. The expected percentage of detected Down syndrome cases is approximately 60 %, with the rate of false positive results being 5 to 7 %. The paper describes some practical aspects of the test, and presents pregnancy complications after a false-positive screen for Down syndrome. The paper describes a screening method using ultrasound measurements of fetal nuchal translucency, and new laboratory tests, likely to become useful tools of prenatal diagnosis of Down syndrome in the future.

Downov sindrom

Downov sindrom (DS) ali trisomija 21 (T21) je najpogostejši posamezni vzrok za duševno zaostalost otrok. Prizadene približno enega od tisoč rojenih otrok. V Sloveniji je bila v obdobju 1987–1994 incidenca DS 1/896 rojenih otrok.

Leta 1933 je Penrose prvi opisal povezavo med starostjo mater, in rojstvom otroka z DS (1). Slika, ki prikazuje to odvisnost, ima obliko nagnjene črke J. Najmanjše tveganje je pri nosečnicah med 20. in 24. letom starosti, in sicer 1/1400 rojenih otrok. V starosti 35 let je tveganje 1/350, nato pa tveganje vedno bolj strmo narašča ter je v starosti 45 let 1/25 (2).

*Mag. Nataša Tul, dr. med., Ginekološka klinika, Štajmerjeva 3, 1000 Ljubljana.

Kljub dejstvu, da je tveganje za avtosomne trisomije pri plodu večje pri starejših nosečnicah, pa se večina tako prizadetih otrok (68 %) rodi mlajšim ženskam, saj se pogosteje odločajo za rojstvo otrok (1).

Dodatni kromosom 21 izvira v 95 % iz spolnih celic staršev. V 86 % izvira iz matrine celice. Vzrok je v 75 % nepravilna prva mejotična delitev (pride do nepravilnega razdvajanja (angl. *nondisjunction*) kromosomov), v 25 % pa druga mejotična delitev (2).

V 9 % prinese odvečni kromosom očetova celica. Do nepravilne delitve pride v 50 % med prvo in v 50 % med drugo mejotično delitvijo (2). V 5 % je vzrok nepravilna mitotična delitev – posledica je mozaicizem (2). Zelo redek vzrok je lahko uravnotežena translokacija pri enem od staršev.

Prenatalno odkrivanje DS je možno s karyotipizacijo plodovih celic, ki jih dobimo z invazivno preiskavo (amniocentezo, biopsijo horionskih resic, kordocentezo). Ker obstaja pri teh preiskavah 0,5–2 % (odvisno od ustanove, kjer se preiskava dela) tveganje za spontani splav, ker karyotipizacija zahteva precejšnje laboratorijske zmogljivosti in je celoten postopek zelo drag, prenatalne diagnostike ne moremo delati pri vseh nosečnicah, ampak le pri tistih, kjer obstaja večje tveganje za DS. Tveganje ocenjujemo s presejalnimi testi.

Presejalni testi

Presejalni testi so orodje, s katerim želimo poiskati del prebivalstva s povečanim tveganjem za določeno nepravilnost. **Zavedati se moramo, da to niso diagnostični testi.**

Presejalni testi so upravičeni, če je bolezen resna, ozdravljiva – če je ugotovljena dovolj zgodaj – in razmeroma pogosta (3). Zahteve za učinkovit presejalni test so: da je varen, zanesljiv (visoka občutljivost in specifičnost) in dostopen za celo skupino, ki jo želimo presejati, cenovno ugoden, da mu sledi učinkovit diagnostični test in ukrepanje.

Tabela 1. Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost; *a* – resnično pozitivni, *b* – lažno negativni, *c* – lažno pozitivni, *d* – resnično negativni, *Se* – občutljivost, *Sp* – specifičnost, *PNV* – pozitivna napovedna vrednost, *NNV* – negativna napovedna vrednost.

Rezultat testa	Bolezen prisotna	Bolezen odsotna
Pozitiven	a	c
Negativen	b	d

$$Se = a/(a + b)$$

$$Sp = d/(c + d)$$

$$PNV = a/(a + c)$$

$$NNV = d/(b + d)$$

Občutljivost testa (*Se*) pomeni verjetnost, da bo rezultat testa pozitiven, če je bolezen prisotna. Lažna negativnost je razlika med občutljivostjo, izraženo v odstotkih, in 100 %.

Specifičnost (Sp) testa je verjetnost, da bo rezultat testa negativen, če bolezni ni. Lažna pozitivnost je razlika med specifičnostjo, izraženo v odstotkih, in 100 %. Pozitivna napovedna vredost (PNV) pove verjetnost, da je bolezen prisotna, če je test pozitiven. Negativna napovedna vredost (NNV) pa pove verjetnost, da je preiskovanec zdrav, če je rezultat testa negativen.

Presejanje za Downov sindrom na podlagi materine starosti

Prvi in še vedno najširše uporabljan presejalni test za prenatalno odkrivanje DS je presejanje na podlagi starosti matere. Nosečnice nad določeno starostno mejo so uvrščene v skupino s povečanim tveganjem in ponujena jim je diagnostična preiskava. Presejanje na podlagi starosti matere se je v svetu začelo konec sedemdesetih let, v Sloveniji pa leta 1981.

Med letoma 1981 in 1994 so bile v Sloveniji v skupino s povečanim tveganjem uvrščene nosečnice, stare 37 in več let ob pričakovanem dnevu poroda, 32 % se jih je odločilo za amniocentezo s kariotipizacijo (ACK). Prenatalno smo odkrili 17 % plodov z DS.

Leta 1995 se je starostna meja za ACK v Sloveniji znižala na 35 let. V Sloveniji imamo okoli 6 % nosečnic, starejših od 35 let (4). Če bi se vse odločile za ACK, bi lahko v idealnem primeru odkrili največ 30 % plodov z DS. Vsi ostali se rodijo mlajšim nosečnicam.

Tako kot v Sloveniji se tudi drugod po svetu le določeni (običajno manjši) del nosečnic, starejših od postavljene starostne meje, odloči za diagnostične preiskave (5). V vzhodni Angliji je v letih 1985–1987 prišla na ACK polovica nosečnic, starejših od 35 let, in prenatalno so odkrili 24 % DS (6). Rezultati presejanja samo na podlagi starosti matere tako niso zadovoljivi.

Presejanje za Downov sindrom na podlagi biokemičnih sprememb v materini krvi

Leta 1984 je bilo naključno ugotovljeno, da je koncentracija alfa-fetoproteina (AFP) v materinem serumu v drugem trimesečju v nosečnostih s T21 in trisomijo 18 (T18) pomembno nižja kot v neprizadetih nosečnostih (1). Sledila so odkritja številnih drugih hormonov, ki imajo pri nosečnicah z DS drugačno porazdelitev kot pri nosečnicah s kromosomsko normalnimi plodi, in začelo se je obdobje presejanja za DS na podlagi biokemičnih sprememb v materini krvi.

Za vsak hormon, ki ga določamo v materinem serumu, lahko izračunamo srednjo vrednost (mediano) koncentracije pri nosečnicah v določenem tednu nosečnosti. Ko nato izmerimo vrednosti za vsako posamezno nosečnico, lahko vrednosti izrazimo kot mnogokratnik srednje (normalne) vrednosti (mnogokratnik mediane, MoM). S primerjanjem vrednosti MoM za določene hormone posamezne nosečnice z vrednostmi za kromosomsko normalne plode lahko izračunamo tveganje posameznice za kromosomopatijo pri plodu.

Izražanje koncentracij hormonov z MoM poenostavi primerjanje vrednosti med laboratoriji.

Alfa-fetoprotein

Alfa-fetoprotein je bila prva opisana fetalna beljakovina (leta 1956) (1). Je glavna serumska beljakovina pri plodu (7). Ker imata serumski albumin in AFP precej homolognih aminokislinskih mest, je možno, da je AFP plodov analog za serumski albumin (7).

Leta 1973 je bila dokazana povezava med visokimi vrednostmi AFP v materinem serumu in pojavom nepravilnosti v zapiranju nevralne cevi pri plodu (NTD) (8) ter leta 1977 uporabnost merjenja koncentracije AFP v serumu nosečnic v drugem trimesečju za iskanje plodov z NTD. Povezava med nizkimi vrednostmi AFP in kromosomopatijami je bila prvič opisana leta 1984 (1). Nižje vrednosti AFP so verjetno posledica zmanjšane izločanja AFP preko ledvic ploda z DS in oslabljenega prehoda skozi posteljico (1). Ker v prvem trimesečju plodovi ledvici še ne delujeta, se vrednosti AFP ne razlikujejo od kromosomsko normalnih nosečnosti in AFP ni uporaben za presejanje za DS.

Materina starost in AFP v drugem trimesečju sta med seboj neodvisna pokazatelja tveganja za DS in njuna kombinacija da boljšo oceno tveganja, kot je ocena le na podlagi materine starosti ali le AFP (9).

Pri vrednostih AFP 2,5 MoM ali več je nosečnica uvrščena v skupino z večjim tveganjem za NTD in nepravilnosti trebušne stene. Višje vrednosti AFP pomenijo večje tveganje za NTD (10). Občutljivost in specifičnost AFP pri odkrivanju NTD sta visoki (npr. 91 % občutljivost in 96 % specifičnost za spino bifido). Večji del povišanih vrednosti je kljub temu ostal nepojasnjen do odkritja povezave povišane koncentracije AFP s porodniškimi zapleti – fetalno ali neonatalno smrtjo, nizko porodno težo, oligohidramnijem, predčasno ločitvijo posteljice, preeklampsijo (11). Pri polodovih z DS, ki imajo hkrati še NTD ali, pogostejše, omfalokelo, je koncentracija AFP običajno povišana.

Humani horionski gonadotropin

Prvi odkriti posteljčni hormon je humani horionski gonadotropin (hCG), opisan je bil leta 1920. Je kompleksen glikoprotein. Sinteza hCG poteka v sinciotrofoblastu.

Koncentracija hCG v materinem serumu naraste skokovito takoj po zanositvi, vrh doseže med 8. in 11. tednom nosečnosti, nato pada do 18. tedna nosečnosti. Vzrok za padec je diferenciacija trofoblastnega tkiva. Od 18. tedna do poroda so povprečne koncentracije hCG enake (12) in znašajo okoli 10 % najvišjih vrednosti v 10. tednu nosečnosti.

Leta 1987 so Bogart in sodelavci opisali, da je merjenje hCG bolj učinkovito za iskanje kromosomsko nepravilnih plodov kot merjenje AFP (12). Plodovi z DS so relativno nezreli, prav tako njihove posteljice, pri katerih pride do zapoznelega zorenja horionskih resic in zato proizvajajo več hCG – približno toliko kot tri tedne mlajše normalne posteljice (5). Nekateri govorijo o disfunkcionalni posteljici, pa tudi o neravnovesju med plodom in posteljico, ki se kaže s povišanjem koncentracije posteljčnih produktov (na primer hCG) in relativnim znižanjem koncentracije tistih, kjer pri sintezi sodeluje plod (na primer AFP, nekongjugirani estriol (uE3)) (13).

Povprečno je koncentracija hCG pri nosečnostih z DS dvakrat višja kot v normalnih nosečnostih (5). Koncentracije β -hCG so pri nosečnostih z DS nekoliko bolj povečane kot koncentracije intaktnega hCG (14–16). Ker se koncentracije hCG do 18. tedna naglo spreminjajo, moramo natančno poznati trajanje nosečnosti, po 18. tednu pa ni več potrebno prilagajanje koncentracij hCG trajanju nosečnosti (12).

Koncentracije hCG so v nosečnostih s trisomijo 18 in trisomijo 13 nižje kot v normalnih nosečnostih (17). Vzrok za to dejstvo nam še ni znan.

Nekonjugirani estriol

Pri sintezi estrogenov sodelujejo skorja plodove nadledvičnice, plodova jetra in posteljica.

Leta 1972 sta Jorgensen in Trolle objavila opažanje, da je bilo pri 75 % nosečnic, ki so nosile plod z DS (in le pri 16 % nosečnic z normalnimi plodi), izločanje nekonjugiranega estriola (uE3) v seču nizko (18), leta 1988 pa je Canick s sodelavci prišel do odkritja, da so vrednosti uE3 tudi v serumu nosečnic, ki nosijo plode z DS, pomembno nižje (19). Spremembe v koncentraciji uE3 se da pojasniti – tako kot spremembe v koncentracijah AFP in hCG – z relativno nezrelostjo plodov z DS (5). Vzrok za nižje vrednosti uE3 pa je lahko tudi nepravilno delovanje ali nezrelost skorje plodove nadledvičnice, jeter ali posteljice. Pri DS je pogostejša hipoplazija nadledvičnice (19).

Pomembno nižje vrednosti uE3 v materinem serumu so tudi pri T18, T13, triploidiji, Turnerjevem sindromu (6).

Hormonske kombinacije – trojni hormonski test

Že leta 1988 so Wald in sodelavci izračunali, da bi s trojnim hormonskim testom (THT) – to je s kombinacijo merjenja koncentracije AFP, hCG in uE3 ter starosti nosečnice – odkrili 60 % plodov z DS. Petim odstotkom nosečnic, ki jih test uvrsti v skupino z visokim tveganjem, bi priporočili amniocentezo ter bi tako – na primer – v Veliki Britaniji znižali število rojenih otrok z DS z 900 na 350 na leto (5). Ko govorimo o THT, navadno mislimo na kombinacijo merjenja koncentracije hCG, AFP in uE3 in materine starosti v drugem trimesečju nosečnosti. Če uporabljamo druge hormonske kombinacije, to posebej označimo.

Tabela 2. Povprečne vrednosti mnogokratnika mediane (MoM) za različne hormone pri Downovem sindromu (20); n – število plodov z Downovim sindromom, na katerem je bil izračunan MoM.

Hormon	n	MoM
Alfa-fetoprotein	1140	0,73
Nekonjugirani estriol	613	0,73
Humani horionski gonadotropin	850	2,02
β-humani horionski gonadotropin	477	2,30

Cuckle je naredil metaanalizo 44 študij in izračunal MoM-vrednosti za posamezne hormone pri DS (tabela 2) (20). Pri kromosomsko normalnih plodih je vrednost MoM za vse hormone v serumu matere ena.

Tveganje za vsako posamezno nosečnico izračunamo tako, da najprej ugotovimo tveganje, ki ga ima nosečnica zaradi svoje starosti. Nato določimo MoM-vrednosti za hormone. Tveganje zaradi starosti pomnožimo z izračunom verjetnosti. Le-tega dobimo iz statističnih modelov porazdelitve vrednosti hormonov (MoM-ov hCG, AFP in uE3) v neprizadetih in prizadetih nosečnostih (5). Rezultat testa interpretiramo kot pozitiven ali negativen glede na to, ali preseže dogovorjeno mejo ali ne.

Že prvi demonstracijski projekti so pokazali, da je THT učinkovit in sprejemljiv del prenatalnega varstva (21). Odstotki odkritih plodov z DS in odstotki pozitivnih rezultatov se med posameznimi raziskavami razlikujejo (tabela 3), vendar je število odkritih plodov z DS vedno večje kot ob presejanju le na podlagi materine starosti. Dogovorjene meje ocene tveganja so med različnimi centri različne – od 1/160 do 1/350 (20). V Sloveniji je dogovorjena meja 1/190.

Tabela 3. Število vseh vključenih nosečnic, število nosečnic z Downovim sindromom, dogovorjena meja ocene tveganja, odstotek nosečnic s pozitivnim rezultatom trojnega hormonskega testa, odstotek odkritih primerov Downovega sindroma v različnih študijah (v vseh so merili koncentracije humanega horionskega gonadotropina, alfa-fetoproteina in nekonjugiranega estriola v serumu nosečnice drugem trimesečju).

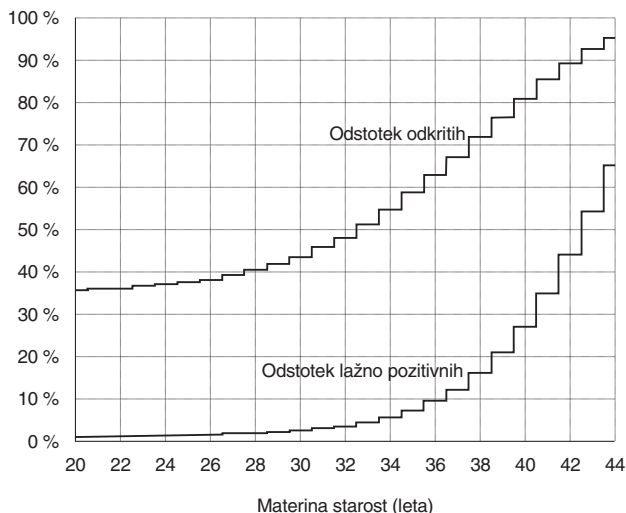
Študija	Število vključenih nosečnic	Število vključenih nosečnic z Downovim sindromom	Dogovorjena meja ocene tveganja	Odstotek pozitivnih rezultatov	Odstotek odkritih primerov Downovega sindroma
Wald s sodelavci (21)	12063	25	1/250	4,1	48
Cheng s sodelavci (1)	7718	22	1/195	6	91
Goodburn s sodelavci (6)	25359	48	1/200	4	75
Benn s sodelavci (23)	11434	20	1/270	5,9	70
Benn s sodelavci (23)	11434	20	1/190	3,7	50
Kellner s sodelavci (16)	2349	15	1/270	8	80

Vpliv materine starosti na presejanje s trojnim hormonskim testom

Materina starost je v THT vrednotena kot eden izmed presejalnih dejavnikov v kombinaciji s hormonskimi dejavniki (5). Zaradi velikega vpliva materine starosti pri izračunavanju tveganja z naraščajočo materino starostjo narašča število lažno pozitivnih nosečnic, prav tako pa tudi število odkritih plodov z DS (22). Na voljo so nomogrami, iz katerih lahko za vsako starost razberemo, kakšen je povprečen odstotek odkritih DS in koliko je lažno pozitivnih rezultatov (24).

Določanje trajanja nosečnosti

Ker se vrednosti hormonov s trajanjem nosečnosti zelo spreminjajo, moramo ob jemanju krvi natančno poznati trajanje nosečnosti.



Slika 1. Odstotek odkritih plodov z Downovim sindromom (zgornja krivulja) in odstotek lažno pozitivnih rezultatov (spodnja krivulja) glede na materino starost pri meji 1/190. Prirejeno po (24).

Ultrazvočna ocena je natančnejša kot ocena, ki temelji le na datumu zadnje menstruacije. Z rutinskim ocenjevanjem trajanja nosečnosti z ultrazvokom se odkrivanje plodov z DS poveča za približno 10 % ob enakem številu lažno pozitivnih rezultatov (5 %) (25).

Biparietalni premer (BIP) je meritev izbora, ker tako pri normalnih plodih kot pri plodih z DS natančno oceni trajanje nosečnosti. Merjenje BIP poveča tudi učinkovitost odkrivanja NTD s 73 % na 85 % (25). Plodi z NTD imajo povprečno manjši BIP, zato so prizadeti plodi ocenjeni kot mlajši in jim je pripisan višji MoM AFP, kar izboljša odkrivanje teh nepravilnosti (25).

Dolžina stegenice ni primerna meritev za določanje trajanja nosečnosti, ker so pri DS dolge kosti krajše. Tem plodom bi zato s to meritvijo pripisali krajšo nosečnost, izračun pa bi pokazal manjše tveganje, kot je v resnici (25).

Odkrivanje plodov s trisomijo 18

Incidenca T18 ob rojstvu je 1/7000 rojenih. Živorojeni redko preživijo dlje kot leto dni zaradi multiplih strukturnih anomalij (17). Pri T18 so vrednosti hCG, AFP in uE3 nizke, za razliko od T21, kjer je koncentracija hCG visoka. Zaradi te razlike s presejanjem za DS ne odkrijemo plodov s T18; presejanje za T18 lahko poteka hkrati s presejanjem za DS, upoštevati pa moramo drugačne porazdelitve koncentracij hormonov.

S prirejenim protokolom za izračunavanje tveganja (ki kot mejne vrednosti upošteva AFP (0,75 MoM), hCG (0,5 MoM) in uE3 (0,6 MoM) lahko odkrijemo 50 in celo do 85 % T18 (26)), ob tem pa je manj kot 1 % rezultatov pozitivnih (17).

Odkrivanje aneuploidij spolnih kromosomov

Odkrivanje nepravilnega števila spolnih kromosomov pri plodih je »sopojav« odkrivanja DS z ACK. Za upravičenost odkrivanja teh nepravilnosti ali proti njej je z etičnega stališča težko govoriti, saj take osebe niso telesno ali duševno huje prizadete. Kljub temu se po diagnozi tovrstne nepravilnosti več kot 50 odstotkov staršev odloči za prekinitev nosečnosti.

Pri nosečnicah nad 35 let bi s THT ob 25 % ACK odkrili 44 % vseh spolnih aneuploidij. Med nepravilnostmi spolnih kromosomov se s THT najpogosteje odkrije Turnerjev sindrom (23).

Amniocenteza in kariotipizacija po pozitivnem rezultatu trojnega hormonskega testa

Nosečnicam, ki jih THT uvrsti v skupino s povečanim tveganjem (pozitiven rezultat THT) za rojstvo otroka z DS, je ponujen genetski posvet in nato invazivna diagnostična preiskava, najpogosteje ACK, za kar se odloči 70–85 % nosečnic s povečanim tveganjem. Za ACK zgolj na podlagi starosti se odloča manj kot 50 % nosečnic (6, 21). Mlajše nosečnice s pozitivnim rezultatom THT se odločajo za ACK nekoliko pogosteje kot starejše, obstajajo pa tudi etnične razlike. Le 9 % nosečnic, starejših od 37 let in z majhnim tveganjem po THT, se odloči za AC (21).

Ena na 17 do 50 ACK, narejenih zaradi pozitivnega rezultata THT, pokaže T21 (22, 27), ena na 20 pa različne kromosomske nepravilnosti (50 % avtosomnih trisomij, 25 % anomalij spolnih kromosomov, 25 % strukturnih anomalij) (23).

Cena in razširjenost

Wald s sodelavci je izračunal, da presejanje s THT 20.000 nosečnic, kjer je pričakovano število otrok z DS 26, odkrije 16 prizadetih plodov. Če bi vse nosečnice s povečanim tveganjem želele AC in se v primeru patološkega kariotipa odločile za prekinitev nosečnosti, bi bila cena za preprečitev rojstva vsakega otroka z DS 28.500 funtov. Če 75 % nosečnic sprejme AC in jih 90 % prekine prizadeto nosečnost, se cena dvigne na 38.000 funtov. Tje še vedno občutno manj, kot so ocenjeni stroški za doživljenjsko skrb za otroka z DS (120.000 funtov) (21).

Connor je mnenja, da bi za vse nosečnice, ki si THT želijo, test moralo plačati zdravstveno zavarovanje, sicer so nosečnice v neenakem položaju (28).

Kljub temu da ni uradne statistike o razširjenosti in tipih hormonskih presejalnih testov, ocenjujejo, da je bilo novembra 1994 presejanih 51 % Britank, večina z uporabo več hormonskih označevalcev (29). V okoljih, kjer je test na razpolago, vključijo okoli 75 % nosečnic (6, 21).

Hormonski označevalci v prvem trimesečju nosečnosti

Presejanje za kromosomopatije je možno že v prvem trimesečju, vendar z drugimi označevalci. V tem obdobju pa ni možno biokemično presejanje za NTD, ker se pri teh nepravilnostih koncentracija AFP v materinem serumu pomembno poviša šele po 16. tednu.

Wald in sodelavci so preizkusili 7 hormonskih označevalcev med 8. in 14. tednom nosečnosti: AFP, uE3, hCG, α -hCG, β -hCG, z nosečnostjo povezan plazemski protein A (angl. *pregnancy associated plasma protein A*, PAPP-A) in dimerno obliko inhibina A. Ugotovili so, da se s kombinacijo prostega β -hCG, PAPP-A in materine starosti odkrije 62 % DS ob 5 % lažno pozitivnih rezultatov (30). Približno 55 % nosečnosti z DS, ki jih ugotovimo v 10. tednu, se konča s spontanim splavom.

Lažno pozitiven rezultat trojnega hormonskega testa

Večina nosečnic s pozitivnim izidom trojnega hormonskega testa je lažno pozitivnih, kar pomeni, da je izvid ACK normalen kariotip ploda in kariotipizacija ne razjasni vzroka za pozitiven rezultat THT. Pozitivna napovedna vrednost THT je okoli 4 % (22).

Leta 1995 so Pergament in sodelavci opisali pogostejše zaplete v nosečnosti pri nosečnicah z lažno pozitivnim rezultatom THT. Pri tretjini nosečnic, starih manj kot 35 let in z lažno pozitivnim rezultatom THT, so ugotovili neugoden izid nosečnosti, zlasti je bila pomembno večja pogostnost plodove smrti, prezgodnjega poroda, preeklampsije in novorojenčkov, premajhnih za trajanje nosečnosti (31). Milunsky in sodelavci pa so ugotovili neugoden izid v kar dveh tretjinah nosečnosti z lažno pozitivnim THT (tveganje (1/270): prevladovala je nizka porodna teža otrok ter smrt ploda ali novorojenčka, v 19 % so bile prisotne prirojene anomalije (32).

Tudi mi smo s primerjanjem 31 nosečnic z lažno pozitivnim rezultatom THT in 62 nosečnic s pravilno negativnim rezultatom THT ugotovili, da lažno pozitiven rezultat THT uvršča nosečnico v skupino ogroženih nosečnic. Pri polovici nosečnic iz lažno pozitivne skupine so se pojavili zapleti: pogostejše se je pojavljala grozeč prezgodnji porod in kar 6-krat pogostejše so rodile pred dopolnjenim 37. tednom nosečnosti, 19,4 % njihovih novorojenčkov je bilo premajhnih za trajanje nosečnosti (in 6,5 % novorojenčkov mater s pravilno negativnim THT). Dva novorojenčka sta imela prirojene anomalije (eden obojestransko hidronefrozo, drugi odprt Botalov vod). V kontrolni skupini anomalij ni bilo. Pri naših lažno pozitivnih nosečnicah nismo opazili pogostejšega pojavljanja hipertenzivnih zapletov. Ugotovili smo, da ima za napovedovanje zapletov in neugodnega izida nosečnosti najpomembnejšo vrednost hCG, višji od 2 MoM (33).

Različni avtorji so ugotovili različne hormonske označevalce kot najpomembnejše za napovedovanje zapletov: Santolaya - Forgas in sodelavci (34) ter Pregament in sodelavci (31) nizko koncentracijo nekonjugiranega estriola (pod 0,75 MoM), Lieppman s sodelavci (35), Muller s sodelavci (27), Tanaka s sodelavci (36), Sorensenova in sodelavci (37) ter Wenstromova in sodelavci (38) pa tako kot mi zvišano koncentracijo hCG.

Opisujejo, da z naraščanjem koncentracije hCG narašča tveganje za prezgodnji porod in nizko porodno težo, prav tako pa tudi tveganje za gestacijsko hipertenzijo (39). Patofiziološko razlago so opisali Lieppman in sodelavci: nezadostna prekrvavitev (oziroma slaba oskrba s kisikom) citotrofoblasta lahko vodi v hiperplazijo citotrofoblastnih celic in posledica je povečano nastajanje hCG. To so dokazali na živalskih modelih (35). Pri gestacijski hipertenziji pride do nepravilnega vdiranja trofoblasta v endometrij, posledica so zgodnje uteroplacentarne žilne spremembe in kasneje ateroza, kar vse poslabša

prekrvavitev citotrofoblasta in zato vodi do povečanega nastajanja hCG in zvišane koncentracije hCG v materinem serumu. Slaba prekrvavitev ima za posledico zaostajanje ploda v rasti pri gestacijski hipertenziji. S histološko preiskavo posteljice po porodu je mogoče dokazati patofiziološki vzrok zapletov (35).

Tudi z naraščanjem vrednosti AFP v materinem serumu narašča delež nosečnosti z zapleti. Wenstromova in sodelavci, ki so pri nosečnicah, pri katerih so plodi v maternici zaostajali v rasti, opazili zvišano koncentracijo AFP, mislijo, da je ta AFP posledica zgodnje poškodbe posteljičnega žilja (oziroma pregrade med materjo in plodom), zato je večji prehod AFP v materino kri. Posledica je slab dotok hranljivih snovi plodu in slabša rast (38).

Tudi Beekhuis in sodelavci se strinjajo, da skozi nepravilno razvito posteljico prehaja v materin obtok več AFP, nepravilnosti posteljice pa prispevajo k povečanemu tveganju za neugoden izid (40). Leta 1992 so opisali, da je pri desetih od enajstih nosečnic, ki so imele AFP 2,0 MoM ali več in hkrati še hCG 2,0 MoM ali več, prišlo do zapletov v nosečnosti in rodili so se le trije zdravi otroci (40). Z morfometričnimi študijami so dokazali večjo prostornino in večjo površino posteljic pri nosečnicah s povišanim AFP, kar pojasni tudi pogostejše zvišana koncentracija hCG v nosečnostih z zapleti (40).

Kombinacija zvišanih koncentracij hCG in AFP in znižane koncentracije uE3 je vsekakor neugoden napovedni znak, saj se pri dveh tretjinah teh nosečnic pojavijo resni zapleti. Zvišana hCG in AFP se pojavita ob nepravilnem delovanju posteljice in ob porušeni integriteti fetoplacentarnega stika, nizka koncentracija uE3 pa kaže na nepravilno delovanje posteljice ali plodovih jeter (32).

Pomemben delež med nosečnicami z lažno pozitivnim rezultatom THT predstavljajo primeri, kjer gre za mozaicizem posteljice (angl. *confined placental mosaicism*, CPM). Mozaicizem posteljice je bil odkrit po uvedbi horionske biopsije za odkrivanje kromosomopatij. Prisoten je v 1–2 % nosečnosti in ugotovljeno je, da slabo vpliva na potek nosečnosti. Najpogostejše je z zapleti povezan mozaicizem s trisomijo 16. Najpogostejši zaplet so novorojenčki, premajhni za gestacijsko starost; 60 % teh nosečnic ima zelo zvišano serumsko koncentracijo hCG, podatkov o tem, ali imajo te nosečnice težje posteljice, pa ni. V 54 % nosečnosti z mozaicizmom posteljice je rezultat THT pozitiven. V nosečnosti po izventesni oploditvi (*in vitro* fertilizacija z embriotransferjem, IVF-ET) nosečnostih je mozaicizem pogostejši in morda je to razlog za zvišane koncentracije hCG in pogostejše lažno pozitiven rezultat THT (41). Koncentracija AFP je lahko normalna (41) ali zvišana nad 2,5 MoM (42).

Ob hkratnem povečanem tveganju za Downov sindrom in nepravilnosti v zapiranju nevalne cevi so Groli in sodelavci v vseh petih primerih ugotovili mozaicizem s trisomijo 16, vsi plodi so kazali zastoj rasti v maternici, eden je umrl. Vse to kaže na izjemno tvegano nosečnost v primeru hkrati visoke koncentracije hCG in AFP (42). Biopsija horionskih resic je v teh primerih bolj informativna kot ACK; Groli s sodelavci svetuje, da naj bi v teh okoliščinah naredili obe preiskavi (42).

Zaradi pozitivnega rezultata THT narejene biopsije horionskih resic so pojasnile del vzrokov za zastoj rasti ploda v maternici. Zdravljenje mozaicizma seveda ni mogoče, vprašanje pa je, ali se da z jemanjem antitrombotičnih zdravil izboljšati izid nosečnosti (42).

Merjenje koncentracije AFP se že dve desetletji uporablja za iskanje nepravilnosti v zapiranju nevralne cevi in trebušne stene.

Zaradi rutinske uporabe merjenja koncentracije AFP v drugem trimesečju nosečnosti se je število otrok, rojenih z nepravilnostmi v zapiranju nevralne cevi, v ZDA znižalo z 1,3/1000 leta 1970 na 0,6/1000 leta 1989. Še bolj dramatične rezultate so dosegli v Avstraliji, kjer je celotno število ugotovljenih nepravilnosti v zapiranju nevralne cevi med leti 1966 in 1991 ostalo enako, za 84 % pa se je zmanjšalo število otrok, rojenih z nepravilnostmi v zapiranju nevralne cevi (z 2,29 na 0,35/1000 rojenih otrok). Okoli 85 % nepravilnosti so odkrili pred 28. tednom nosečnosti z merjenjem AFP ali z ultrazvokom, 80 % nosečnic se je odločilo za prekinitve nosečnosti (43). Kljub temu da je presejanje za DS s hormonskimi testi še zelo daleč od podobnih rezultatov, so v Veliki Britaniji že opazili upadanje števila rojstev otrok z DS (13). Z vse večjim številom dokazov, da je THT uporaben tudi za napovedovanje različnih perinatalnih zapletov, pa dobiva THT še dodatno klinično vlogo.

Presejanje za Downov sindrom na podlagi ultrazvočne meritve nuhalne svetline v 12. tednu nosečnosti

Nuhalna svetlina je ultrazvočni pojem, ki se je začel uveljavljati v začetku devetdesetih let. Je največja širina svetline med kožo in mehkim tkivi, ki pokrivajo hrbtenico v nuhalnem predelu ploda. Plodi s kromosomskimi nepravilnostmi ter srčnimi napakami imajo širšo nuhalno svetlino kot normalni plodi. Nosečnicam, pri katerih je nuhalna svetlina v 12. tednu nosečnosti povečana (3 mm ali več), ponudimo kariotipizacijo. Dobro izurjeni in natančni preiskovalci lahko ob 5 % posegov za kariotipizacijo odkrijejo do 85 % plodov z DS (44). Obstajajo tudi računalniški programi, ki na podlagi materine starosti in meritve nuhalne svetline točno izračunajo tveganje za Downov sindrom v določeni gestacijski starosti.

Svetovanje staršem pred presejalnimi testi

Svetovanje je najpomembnejši del presejalnih testov. Najbolje je, če so s prenatalnimi presejalnimi testi seznanjeni vsi bodoči starši še pred zanositvijo, sicer pa jim o njih povemo čim prej v nosečnosti. Tako imajo čas razmisliti ter se odločiti za testiranje ali proti testiranju. Ker predstavljajo presejalni testi hudo psihično obremenitev, se moramo o njih izčrpno pogovoriti.

Pomembno je, da bodoči starši vedo, da so testi presejalni in ne diagnostični ter da testi le razvrstijo nosečnice v skupino z velikim ali majhnim tveganjem. Uvrstitev v skupino z velikim tveganjem ne pomeni, da ima plod DS, pomeni le, da je tveganje večje. Le 2–3 % teh plodov ima dejansko DS, 97 % pa jih je kromosomsko normalnih (45). Bodoči starši morajo vedeti, kaj rezultati pomenijo. Tveganje 1/100 pomeni, da je v skupini stotih nosečnic, ki imajo enak izvid glede tveganja, en otrok prizadet, 99 pa ne. Seveda

pa tudi uvrstitev v skupino z majhnim tveganjem ne da zagotovila, da bo otrok zdrav, verjetnost, da bo otrok prizadet, pa je zelo majhna (po avstralskih podatkih je verjetnost 1/3050).

Presejalni testi so neinvazivni in tako niso nevarni ne za nosečnico ne za plod, primeri so skoraj za vse nosečnice (le pri nosečnicah z že obstoječo sladkorno boleznijo in tistih z večplodno nosečnostjo zaenkrat THT ne pride v poštev). Zelo pomembo je, da so narejeni ob točno določenem času – merjenje nuhalne svetline okoli 12. tedna, THT med 15. in 18. tednom nosečnosti. Še preden se bodoči starši odločijo za testiranje, morajo vedeti, da jim bo v primeru »pozitivnega« rezultata ponujena diagnostična invazivna preiskava, kjer obstaja nevarnost splava v 0,5–2 %. Sami se lahko v tem primeru odločijo za preiskavo ali proti preiskavi. V obeh primerih morajo imeti v zdravnikih popolno podporo. Prav tako je v rokah bodočih staršev odločitev, ali bodo, če bo izvid karyotipizacije plodov z DS, nosečnost nadaljevali ali prekinili; tudi v teh primerih moramo spoštovati njihovo odločitev in jim nuditi popolno podporo.

Kaj pa nosečnice, starejše od 35 let, ki jim ponudimo ACK, pa jo odklonijo? Seveda jim ponudimo presejalne teste. Kot vse ostale nosečnice pa morajo vedeti, da jim z merjenjem nuhalne svetline in THT ne moremo zagotoviti kromosomskega normalnega otroka. Nikakor pa ne smemo nikogar siliti ne v presejalne teste ne v diagnostične preiskave.

Nekateri centri v svetu opuščajo svetovanje invazivnih preiskav po 35. letu in vse bolj svetujejo presejalne teste. Seveda je potrebno za take odločitve imeti veliko izkušenj s tovrstnimi testi. Slej ko prej se zgodi, da se ob opustitvi ACK zaradi negativnega rezultata presejalnega testa starejši materi rodi otrok z DS. V ZDA in tudi drugje zaradi medicinsko-pravnih razlogov priporočajo diagnostične preiskave starejšim, mlajšim pa presejalne (46).

Prenatalna diagnostika v prihodnosti

Merjenje nuhalne svetline in THT sta varna presejalna testa tako za mater kot za plod, vendar pa je vsa danes uporabna diagnostika (ki sledi pozitivnemu rezultatu) invazivna in v 0,5–2 % povzroči spontani splav. Za plod varna, zanesljiva in hitra karyotipizacija bi bila nadvse dobrodošla.

Z izolacijo in analizo celic posteljice in ploda, ki so med nosečnostjo prisotne v materini krvi, je neinvazivna karyotipizacija že nekaj let možna, vendar še neprimerna za klinično uporabo zaradi tehničnih težav. Največji problem predstavlja pridobivanje plodovih celic iz materine krvi, saj jih je tam zelo malo (1 plodova celica na 5000 materinih) in jih je težko ločiti od materinih celic. Izoliramo lahko trofoblastne celice, plodove eritroblaste (ki imajo jedro) ali levkocite. Izoliramo jih s pomočjo različnih monoklonskih protiteles, ki so vezana na magnetni ali fluorescenčni označevalec in jih zato lahko izločimo v magnetnem gradientu ali s pomočjo fluorescence. Ker fetalni limfociti, ki imajo dolgo življenjsko dobo, ostanejo v materini krvi tudi po nosečnosti in so lahko prisotni še v naslednjih nosečnostih, trofoblastne celice pa ne izražajo vedno plodovega karyotipa (mozaicizem), so se eritroblasti z jedrom pokazali kot najprimernejše celice za preiskavo. Po izolaciji lahko kromosome preiščemo s fluorescenčno hibridizacijo *in situ* ali z metodo

veržne reakcije s polimerazo. Za odkrivanje aneuploidij je primerna metoda fluorescenčna hibridizacija *in situ* in z njo so že dokazali T21 in T18 (49).

Za preiskavo potrebujemo 20–40 ml materine krvi, delamo jo lahko od 11. tedna nosečnosti dalje, rezultate lahko dobimo že tri dni po odvzemu krvi (47).

Kljub temu da je že leta 1893 Schmorl opazil celice sinciciotrofoblasta v krvi materničnih ven (cit. v (48)) ter so leta 1992 dokazali trisomijo 21 pri plodu (49), so tehnične težave še vedno tako velike, da ni videti, da bi bila ta metoda klinično uporabna še v tem stoletju.

Tudi celocenteza (punkcija ekstracelomskega prostora) in pridobivanje plodovih celic iz sluzi materničnega vratu sta eksperimentalni tehniki, ki ta trenutek ne obetata prav veliko.

Literatura

1. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 886–894.
2. Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, et al. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population based study. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 628–33.
3. Novak – Antolič Ž. Psihične obremenitve pri presejalnih testih v nosečnosti. In: Bregant L, ed. *Strah, bolečina, žalost*. Zbornik prispevkov. Ljubljana: 1997: 15–22.
4. Verdenik I, Pajntar M. *Perinatologia Slovenica* 1995. Ljubljana: 1995.
5. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 883–7.
6. Goodburn SF, Yates JRW, Raggatt PR, et al. Second-trimester maternal serum screening using alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotrophin, and unconjugated oestriol: experience of a regional programme. *Prenat Diagn* 1994; 14: 391–402.
7. Tomasi TB. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Ann Rev Med* 1977; 28: 453–65.
8. Brock DHJ, Bolton AE, Monaghan JM. Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement. *Lancet* 1973; ii: 943–4.
9. Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. *Lancet* 1984; i: 926–9.
10. Crandall BF, Robinson L, Grau P. Risk associated with an elevated maternal serum alpha-fetoprotein level. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 581–6.
11. Milunsky A, Jick SS, Bruell CL, et al. Predictive values, relative risk, and overall benefits of high and low maternal serum α -fetoprotein screening in singleton pregnancies: new epidemiologic data. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 291–7.
12. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 1987; 7: 623–30.
13. Chard T, Macintosh MCM. Screening for Down's syndrome. *J Perinat Med* 1995; 23: 421–36.
14. Wald N, Densem J, Stone R, Cheng R. The use of free beta-hCG in antenatal screening for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 550–7.
15. Macri JN, Kasturi RV, Krantz DA, et al. Maternal serum Down syndrome screening: Free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1248–53.
16. Kellner LH, Weiner Z, Weiss RR, et al. Triple marker (α -fetoprotein, unconjugated estriol, human chorionic gonadotropin) versus α -fetoprotein plus free- β subunit in second-trimester maternal serum screening for fetal Down syndrome: A prospective comparison study. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1306–9.

17. Leporrier N, Herrou M, Herlicoviez M, Leymarie P. The usefulness of hCG and unconjugated oestriol in prenatal diagnosis of trisomy 18. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 335–8.
18. Jorgensen PI, Trolle D. Low urinary estriol excretion during pregnancy in women giving birth to infants with Down's syndrome. *Lancet* 1972, 782–4.
19. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 330–3.
20. Cuckle H. Improved parameters for risk estimation in Down's syndrome screening. *Prenat Diagn* 1995; 15: 1057–65.
21. Wald NJ, Kennard A, Densem JW, Cuckle HS, Chard T, Butler L. Antenatal maternal serum screening for Down's syndrome: results of a demonstration project. *BMJ* 1992; 305: 391–4.
22. Cheng EY, Luthny DA, Zebelman AM, Williams MA, Lieppman RE, Hickok DE. A prospective evaluation of second trimester screening test for fetal Down syndrome using maternal serum alpha-fetoprotein, hCG, and unconjugated estriol. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 72–7.
23. Benn PA, Horne D, Briganti S, Greenstein RM. Prenatal diagnosis of diverse chromosome abnormalities in a population of patients identified by triple-marker testing as screen positive for Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 496–501.
24. Cuckle HS, Sehmi IK, Holding S. Nomograms to help inform women considering Down's syndrome screening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 69: 69–72.
25. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Kennard A, Smith D. Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 144–9.
26. Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE, Canick JA, Saller DN, Panizza DA. Prospective interventional trial of a screening protocol to identify fetal trisomy 18 using maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, and human chorionic gonadotropin. *Prenat Diagn* 1992; 12: 925–30.
27. Muller F, Aegerter P, Boué A. Prospective maternal serum human chorionic gonadotropin screening for the risk of fetal chromosome anomalies and of subsequent fetal and neonatal deaths. *Prenat Diagn* 1993; 13: 29–43.
28. Connor M. Biochemical screening for Down's syndrome. *BMJ* 1993; 306: 1705–6.
29. Cuckle HS, Ellis AR, Seth J. Provision of screening for Down's syndrome. *BMJ* 1995; 311: 512.
30. Wald NJ, George L, Smith D, Densem JW, Petterson K. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 407–12.
31. Pergament E, Stein AK, Fiddler M, Cho NH, Kupfermanc MJ. Adverse pregnancy outcome after a false-positive screen for Down syndrome using multiple markers. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 225–8.
32. Milunsky A, Nebiolo L. Maternal serum triple analyte screening and adverse pregnancy outcome. *Fetal Diagn Ther* 1996; 11: 249–53.
33. Tul N. *Napovedna vrednost lažno pozitivnega trojnega hormonskega testa za zaplete v nosečnosti*. Magistrska naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1997.
34. Santolaya-Forgas J, Jessup J, Burd LJ, Prins GS, Burton BK. Pregnancy outcome in women with low midtrimester maternal serum unconjugated estriol. *J Reprod Med* 1996; 41: 87–90.
35. Lieppman RE, Williams MA, Cheng EY, et al. An association between elevated levels of human chorionic gonadotropin in the midtrimester and adverse pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 168: 1852–7.
36. Tanaka M, Natori M, Kohno H, Ishimoto H, Kobayashi T, Nozawa S. Fetal growth in patients with elevated maternal serum hCG levels. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 341–3.
37. Sorensen TK, Williams MA, Zingheim RW, Clement SJ, Hickok DE. Elevated second-trimester human chorionic gonadotropin and subsequent pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 834–8.
38. Wenstrom KD, Owen J, Boots LR, DuBard MB. Elevated second-trimester human chorionic gonadotropin levels in association with poor pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1038–41.
39. Gonen R, Perez R, David M, Dar H, Merksamer R, Sharf M. The association between unexplained second-trimester maternal serum hCG elevation and pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 83–6.

40. Beekhuis JR, Lith JMM van, Wolf BTHM de, Manting A. Increased maternal serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in compromised pregnancies other than for neural tube defects or Down syndrome. *Prenat Diagn* 1992; 12: 643–7.
41. Morssink LP, Sikkema-Raddatz B, Beekhuis JR, Wolf BTHM de, Manting A. Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MShCG levels, but not with elevation of MSAFP levels. *Prenat Diagn* 1996; 16: 845–51.
42. Groli C, Cerri V, Tarantini M, et al. Maternal serum screening and trisomy 16 confined to the placenta. *Prenat Diagn* 1996; 16: 685–9.
43. Evans MI, O'Brien JE, Dvorin E, Johnson MP. Biochemical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1994; 6: 453–8.
44. Pandya PP, Santiago C, Snijders RJM, Nicolaides KH. First trimester fetal nuchal translucency. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995; 7: 95–102.
45. Muller F, Bussieres L. Maternal serum markers for fetal trisomy 21 screening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 65: 3–6.
46. Chard T, Macintosh MCM. Screening for Down's syndrome. *J Perinat Med* 1995; 23: 421–36.
47. Zeng Y, Carter NP, Price CM, et al. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 1993; 30: 1051–6.
48. Adinolfi M. On a non-invasive approach to prenatal diagnosis based on the detection of fetal nucleated cells in maternal blood samples. *Prenat Diagn* 1991; 11: 799–804.
49. Elias S, Price J, Dockter M, Wachtel S, Tharapel A, Simpsom JL. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 1992; 340: 1033.

Prispelo 25. 11. 1997