

Analiza četvernega testa za odkrivanje trisomije 21 in trisomije 18 v drugem trimesečju nosečnosti

Analysis of second trimester quadruple screening test for trisomy 21 and trisomy 18

Katja Bricelj,^{1*} Maja Vuković,^{1*} Ivan Verdenik,¹ Joško Osredkar,² Ksenija Geršak¹

¹ University Medical center Ljubljana, Department of Obstetrics and Gynaecology

² University Medical center Ljubljana, University Institute for Clinical Chemistry and Biochemistry

Korespondenca/ Correspondence:

Ksenija Gersak,
e: ksenija.gersak@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

četverni presejalni test;
trisomija 21; trisomija 18

Key words:

quadruple screening test;
trisomy 21; trisomy 18

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 597–602

Prispelo: 9. avg. 2013,
Sprejeto: 26. maj 2014

* prvi dve avtorici sta enako prispevali pri nastanku prispevka.

Izvleček

Izhodišča: V Sloveniji izvajamo presejalni četverni test za odkrivanje kromosomskih nepravilnosti ploda v drugem trimesečju nosečnosti od leta 2006 naprej. Test temelji na meritvah koncentracij štirih biokemičnih označevalcev v krvi nosečnice (β -HCG, α -fetoprotein, nekonjugiran estriol in inhibin A). Namen naše naloge je bil analizirati rezultate testa, opredeliti občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost testa za odkrivanje trisomije 21 in 18 ter vpliv nekaterih materinih kliničnih parametrov na izračun tveganja.

Metode: Retrospektivno smo zbrali rezultate četvernega testa za 3.719 vzorcev krvi nosečnic za obdobje od 1. 2. 2006 do 31. 12. 2009 na UKC Ljubljana. Pridobili smo podatke o starosti, teži in kajenju nosečnic, rezultate kariotipizacij plodov, ki so bili uvrščeni v skupino z zvečanim tveganjem, in klinične podatke o novorojenčkih.

Rezultati: V analiziranem obdobju je bila občutljivost testa za trisomijo 21 50 %, specifičnost 95 %, pozitivna napovedna vrednost 2,3 % in negativna napovedna vrednost 99,8 %. Za trisomijo 18 smo izračunali specifičnost 98 %, občutljivost 100 %, pozitivno napovedno vrednost 1,4 % in negativno napovedno vrednost 100 %. Na lažno pozitiven rezultat sta pri trisomiji 21 vplivala teža nosečnice (razmerje obetov OR = 1,034; $p < 0,001$) in starost (OR = 0,832; $p < 0,001$), pri trisomiji 18 pa starost nosečnice (OR = 0,924; $p = 0,17$) in kajenje (OR = 0,396; $p = 0,006$).

Zaključki: Četverni presejalni test je visoko specifičen za odkrivanje plodov s trisomijo 21, vendar ima na analizirani skupini nizko občutljivost, nizka je tudi njegova pozitivna napovedna vrednost. Za odkrivanje plodov s trisomijo 18 je test visoko specifičen in občutljiv, visoka je tudi negativna napovedna vrednost, pozitivna napovedna vrednost testa pa ostaja nizka.

Abstract

Background: The second trimester quadruple screening test for foetal chromosomal abnormalities has been carried out in Slovenia since 2006. Our objective was to analyse the quadruple test results, define sensibility and specificity, the positive and negative predictive value of the screening test for trisomy 21 and trisomy 18 and the influence of some maternal clinical parameters on risk calculation.

Methods: Retrospectively collected results of 3,719 maternal blood samples were analysed in the period from 1 February 2006 to 31 December 2009 at the University Medical Centre Ljubljana. We obtained information on maternal age, body weight and smoking habits, karyotyping of foetuses and clinical data on newborns.

Results: The sensitivity of the test for trisomy 21 was 50 %, specificity 95 %, positive predictive value 2.3 % and negative predictive value 99.8 %. Specificity for trisomy 18 was 98 %, sensitivity 100 % and the positive and negative predictive value 1.4 % and 100 % respectively. In trisomy 21, false positive results were influenced by maternal weight (OR = 1.034; $p = 0.00$) and age (OR = 0.832; $p = 0.00$), and in the case of trisomy 18 by maternal age (OR = 0.924; $p = 0.17$) and smoking (OR = 0.396; $p = 0.006$).

Conclusions: A quadruple test has an appropriate specificity for detecting foetuses with trisomy 21; however, it displays a low sensibility as well as a low positive predictive value. The test reveals high specificity and sensibility for the detection of foetal trisomy 18, and has a high negative predictive value, yet its positive predictive value remains low. Therefore, the test is primarily intended for pregnant women who, for various reasons, missed out on screening opportunities in the first trimester of their pregnancy.

Uvod

Kromosomopatije so pomemben vzrok umrljivosti v perinatalnem obdobju. Downov sindrom ali trisomija 21 je ena najpogostejših kromosomskih nepravilnosti ploda in tudi najbolj pogost posamezen vzrok duševne zaostalosti otrok, ki prizadene približno enega na 1000 otrok.¹ S presejalnimi testi za kromosomopatije želimo opredeliti tveganje posamezne nosečnice, da nosi plod s trisomijo 21, 18 ali 13, oz. tiste z visokim tveganjem. Diagnozo kromosomopatije ploda lahko postavimo le z nadaljnjimi invazivnimi preiskavami, kot so biopsija horionskih resic, amniocenteza ali kordocenteza.

Invazivne preiskave v nosečnosti opravimo le pri nosečnicah z visokim tveganjem za rojstvo otroka s kromosomopatijo ali genopatijo zato, ker je preiskava še vedno invazivna in ima v 1–2 % možnost spontanega splava.²

Tveganje za nosečnost s plodom s trisomijo 21 narašča s starostjo nosečnice. Najmanjše tveganje imajo posameznice med 20. in 24. letom starosti (1/1400), pri 35. letu tveganje naraste na 1/350, pri starosti 45 let pa doseže verjetnost 1/25. Kljub večjemu tveganju za plod z trisomijo 21 pri starejših nosečnicah se večina otrok s to kromosomopatijo rodi mlajšim ženskam, saj se te pogosteje odločajo za rojstvo otroka.¹

Obstoječe presejanje v Sloveniji ureja določba, objavljena v Uradnem listu Republike Slovenije leta 1981 št. 33/02, ki temelji na starosti nosečnice. Nosečnice, mlajše od 35. leta starosti, lahko presejanje opravijo samoplačniško. Po podatkih državnega perinatalogskega informacijskega sistema se že skoraj 80 % nosečnic odloči za testiranje.²

Eden od presejalnih testov za kromosomopatije v prvem trimesečju nosečnosti je ultrazvočni pregled ploda z merjenjem debeline nuhalne svetline (priporočeno med 11. in 13. tednom nosečnosti), ki ga opravlja ginekolog z veljavno licenco. Hkrati z ultrazvočnim pregledom ali že pred njim (med 9. in 10. tednom nosečnosti) se opravi še biokemično testiranje z dvojnimi presejalnimi testom. Nosečnicam, ki pridejo na pregled po 13. tednu, pa se priporoča četverni test.²

V Sloveniji izvajamo presejalni četverni test za odkrivanje kromosomopatij pri plodu v drugem trimesečju nosečnosti od leta 2006 naprej. Četverni test je zamenjal trojni presejalni test, ki je bil na voljo že od leta 1995 in ni vseboval meritev serumskega označevalca inhibina-A. Uporabo četvernega testa je leta 1992 predlagal Lith s sodelavci, ki je z uvedbo meritev inhibina-A v serumu povišal verjetnost odkrivanja kromosomskih napak ploda ter znižal lažno pozitivne vrednosti testa.³ Četverni test temelji na meritvah koncentracij štirih biokemičnih označevalcev v krvi nosečnice: β -humanega horionskega gonadotropina (β -hCG), ki je hormon sinciotrofoblasta, glavne serumske beljakovine ploda α -fetoproteina (AFP), nekonjugiranega estriola, ki ga tvorita tako zarodek kot posteljica, ter inhibina A, proteina gonad in posteljice.

Povezava med kromosomopatijami in nizkimi vrednostmi AFP pa je bila prvič opisana leta 1984.^{4–6} Nizke vrednosti AFP so verjetno posledica zmanjšane izločanja AFP preko ledvic ploda s trisomijo 21 in oslabiljenega prehoda skozi posteljico. V prvem trimesečju je delovanje plodovih ledvic funkcionalno še omejeno, zato se vrednost AFP ne razlikuje od normalnih nosečnosti. Meritve AFP v tem obdobju niso uporabne za presejanje za Downov sindrom. V drugem trimesečju pa sta materina starost in AFP med seboj neodvisna kazalca tveganja za Downov sindrom in kot kombinacija podata boljšo oceno tveganja kot vsak posamično.^{7,8} V nosečnosti s plodom z Downovim sindromom so pomembne nizke vrednosti AFP, ki so skupaj z estriolom v povprečju za 25–30 % nižje kot v normalni nosečnosti.^{9–11} Spremembe v koncentraciji uE3 so tudi posledica nezrelosti plodov z Downovim sindromom: nizke vrednosti so posledica nepravilnega delovanja ali nezrelosti skorje plodove nadledvičnice, jeter ali posteljice.¹² Pri Downovem sindromu je ugotovljena pogostejša hipoplazija nadledvičnice.¹³ Pomembno nižje vrednosti uE3 v materinem serumu so bile ugotovljene tudi pri trisomiji 18, 13, triploidiji in Turnerjevem sindromu.¹¹

Leta 1987 so Bogart in sodelavci opisali, da je merjenje vrednosti hCG bolj učinkovito

za ugotavljanje kromosomopatij kot merjenje AFP.¹⁴ Ker so plodovi s trisomijo 21 relativno nezreli, so manj razvite tudi njihove posteljice, zato pri njih pride do zapoznelega zorenja horionskih resic, kar se kaže s povišanjem koncentracije posteljičnih produktov (hCG) in relativnim znižanjem koncentracije tistih hormonov, pri katerih pri sintezi sodeluje plod (AFP, uE₃).¹⁵ Koncentracije β-hCG v materinem serumu so pri plodovih z Downovim sindromom v povprečju dvakrat višje kot pri zdravih plodovih, njegove vrednosti pa nižje v primeru trisomije 13 ali 18.^{11,14}

Meritev ravni inhibina A se je v številnih študijah pokazala kot uporaben serumski biokemični označevalac pri ugotavljanju nosečnosti z Downovim sindromom. Višje vrednosti inhibina A so najverjetneje posledica povišane ekspresije inhibina A v posteljici.¹⁵ V prvem trimesečju niso ugotovili nobenih razlik v ravni inhibina A med nosečnicami z zdravim plodom in nosečnicami s plodom, ki ima trisomijo 21. Pomemben porast inhibina A pri nosečnostih s trisomijo 21 se je pokazal v 11. tednu nosečnosti, kar sovpada s trendom gibanja drugih placentarnih označevalcev.¹⁶ Izjema je le βHCG, ki je povišan tako v prvem kot tudi v drugem trimesečju pri nosečnicah s plodom s trisomijo 21. Želeli smo analizirati rezultate četvernega testa na vzorcu slovenskih nosečnic, opredeliti občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost testa za odkrivanje trisomije 21 in trisomije 18 ter vpliv nekaterih materinih kliničnih parametrov na izračun tveganja.

Material in metode

V retrospektivno raziskavo smo vključili vse nosečnice, ki so imele v obdobju od 1. 2. 2006 do 31. 12. 2009 opravljen četverni presejalni test. Vzorci krvi so bili odvzeti v drugem trimesečju, med zaključenim 14. in 19. tednom nosečnosti, ter analizirani na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana. V presejanje so bile vključene samo nosečnice z enoplodno nosečnostjo in brez sladkorne bolezni, odvisne od insulina. Iz sprejemne medicinske dokumentacije smo pridobili podatke o starosti, teži ter kajenju nosečnice.

Retrospektivno smo iz Nacionalnega perinatanega informacijskega sistema, porodnih zapisnikov in listov novorojenčkov v arhivu Ginekološke klinike UKC Ljubljana zbrali podatke o poteku nosečnosti, porodu, poporodnem obdobju in podatke o novorojenčku. V ambulanti za ultrazvočne preglede na KO za perinatologijo smo pridobili podatke o invazivnih diagnostičnih posegih in rezultatih kariotipizacij plodov. Ženske z manjkajočimi podatki smo poklicali osebno po telefonu.

Analiza vzorcev in določitev hormonov četvernega testa sta potekali z dvema napravama – z analizatorjem ELISA Personal lab (Adaltis, Italija) in elektroluminiscenčnim analizatorjem Immulite 2000 (Siemens, Nemčija). Analize so bile izvedene v skladu z navodili proizvajalca. Po meritvah vrednosti posameznega parametra smo določili povprečne medianih vrednosti oziroma mnogokratnika normalne mediane (*angl.* mean of median – MoM) za vse štiri izmerjene parametre (hCG, uE₃, AFP in inhibin A).

Tveganje za trisomijo 21 in trisomijo 18 je bilo izračunano na podlagi MoM izmerjenih označevalcev, starosti matere in ultrazvočno izmerjenega premera glavice ploda s programom Alpha 7.0. Za prazno vrednost (*angl.* cut off) visokega tveganja je bilo opredeljeno tveganje 1/190.

Pridobljene podatke smo analizirali s statističnim programom IBM SPSS Statistics V19, določili občutljivost in specifičnost testa za trisomijo 21 in trisomijo 18 ter pozitivno in negativno napovedno vrednost.

Naredili smo multivariantno analizo vpliva osnovnih kliničnih parametrov (starost, teža, kajenje) na lažno pozitiven rezultat za vsako od trisomij in določili povprečne vrednosti posameznih hormonov. Za statistično pomembne smo smatrali podatke z izračunano vrednostjo $p < 0,05$.

Rezultati

V analizo smo vključili 3.719 nosečnic, ki so v drugem trimesečju nosečnosti opravile četverni hormonski test. Ugotovili smo, da je imelo 179 (4,8 %) nosečnic povišano tveganje za trisomijo 21 ($\geq 1/190$). Po amniocentezi s kariotipizacijo je bilo potrjeno, da so 4 no-

sečnice s pozitivnim rezultatom presejanja nosile plod s trisomijo 21. Vse so se odločile za prekinitve nosečnosti. Zaradi lažno negativnega rezultata presejanja so se v istem obdobju rodili 4 novorojenčki s trisomijo 21.

Glede na rezultate presejanja smo odkrili tudi 72 (1,9 %) nosečnic, ki so imele povišano tveganje za trisomijo 18. Po pregledu rezultatov kariotipizacij plodov in kliničnimi podatki o novorojenčkih je le ena nosečnica nosila plod s trisomijo 18 in nosečnost prekinila, lažno negativnih rezultatov presejanja ni bilo.

Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost

V analiziranem obdobju je bila za trisomijo 21 občutljivost testa 50 %, specifičnost 95 %, pozitivna napovedna vrednost 2,3 % in negativna napovedna vrednost 99,8 %. Za trisomijo 18 smo izračunali specifičnost 98 %, občutljivost 100 %, pozitivno napovedno vrednost 1,4 % in negativno napovedno vrednost 100 %.

Multivariantna analiza

Po multivariantni analizi vpliva kliničnih parametrov na lažno pozitiven rezultat za zvečano tveganje za kromosomopatije sta se pri trisomiji 21 kot statistično pomembna dejavnika izkazala teža nosečnice (razmerje obetov (OR)=1,034; 95-odstotni interval zaupanja (95 % IZ) od 1,016 do 1,052; $p < 0,001$) in starost nosečnice (OR = 0,832; 95 % IZ od 0,794 do 0,872; $p < 0,001$), pri trisomiji 18 pa starost nosečnice (OR = 0,924; 95 % IZ od 0,865 do 0,986; $p = 0,17$) in kajenje (OR = 0,396; 95 % IZ od 0,205 do 0,765; $p = 0,006$). Učinek teže pri trisomiji 21 je pozitiven (B (koeficient učinka) = 0,033), starost matere pa ima negativen učinek (B = -0,184). Pri trisomiji 18 sta učinka obeh parametrov negativna: učinek starosti (B = -0,079), učinek kajenja (B = -0,926).

Prisotnost kongenitalnih malformacij, deformacij in kromosomskih abnormalnosti

Pokazali smo, da je statistično pomembna povezava med lažno pozitivnimi in re-

snično negativnimi rezultati za trisomijo 18 in prisotnostjo kongenitalnih okvar genitalnih organov (po MKB – 10, Q50-Q56) (Pearson $\chi^2 = 0,001$, $p = 0,032$). Med lažno pozitivnimi in resnično negativnimi za trisomijo 21 smo pokazali tudi prisotnost statistično pomembne povezave s katero koli okvaro med kongenitalnimi malformacijami, deformacijami in kromosomskimi abnormalnostmi (po MKB-10, Q00-Q99) (Pearson $\chi^2 = 0,054$, $p = 0,029$). Pokazali smo, da je statistično pomembna tudi povezava med prisotnostjo katere koli okvare (po MKB-10, Q00-Q99) med lažno pozitivnimi za trisomijo 21 in s splošno populacijo (Pearson $\chi^2 = 0,006$, $p = 0,001$).

Kajenje, teža in starost

Odkrili smo statistično pomembno povezavo med kadilkami in nekadilkami z lažno pozitivnimi in resnično negativnimi za trisomijo 18 (Pearson $\chi^2 = 0,007$, $p = 0,012$). Za statistično pomembno se je pri lažno pozitivnih in resnično negativnih v primeru trisomije 21 pokazala teža, saj je F test značilen (F test = 10,061, $p = 0,002$). Pri lažno negativnih je srednja teža 64,44 kg, medtem ko je pri resnično negativnih 68,01 kg.

Pokazali smo statistično pomembno povezavo med starostjo matere ter lažno pozitivnimi in resnično negativnimi za trisomijo 18, saj je F test tudi tu značilen (F test = 7,149; $p = 0,008$). Srednja starost matere pri lažno pozitivnih je 31,81 let, pri resnično negativnih pa 30,12 let. Pokazali smo tudi statistično pomembno povezavo med lažno pozitivnimi in resnično negativnimi za trisomijo 21 in starostjo matere, saj je F test tudi v tem primeru značilen (F test = 61,169; $p = 0,001$). Srednja starost matere pri lažno pozitivnih je 33,14 let, pri resnično negativnih pa 29,98 let.

Povprečne vrednosti parametrov četvernega testa

Za posamezno trisomijo smo pri lažno pozitivnih in resnično negativnih določili povprečne vrednosti parametrov četvernega testa. Prikazane so v Tabelah 1 in 2. Vse vrednosti so statistično pomembne, saj je F test zanje značilen, razen v primeru inhibina A pri trisomiji 18 (F test = 3,649; $p = 0,056$).

Za trisomijo 21 je AFP (F test = 25,651; $p < 0,001$), uE3 (F test = 36,359; $p < 0,001$), beta hCG (F test = 298,012; $p < 0,001$), inhibin A (F test = 302,403; $p < 0,001$) in za trisomijo 18 je AFP (F test = 4,378; $p = 0,037$), uE3 (F test = 28,471; $p < 0,001$), beta hCG (F test = 23,741; $p < 0,001$). F test za inhibin A pri trisomiji 18 ni značilen.

Razpravljanje

V raziskavi smo opredelili občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost četrnega presejalnega testa ter vpliv starosti, teže in kajenja matere pri vrednotenju končnega rezultata testa za trisomijo 21 in trisomijo 18.

Test je opravilo 3.719 nosečnic v štiriletnem opazovanem obdobju. Glede na povprečno število porodov v Sloveniji, ki je bilo med letoma 2006 in 2009 20.607, smo zajeli 18 % nosečnic.

Občutljivost testa je opredeljena kot sposobnost, da test pokaže pozitiven rezultat, če je bolezen prisotna, njegova specifičnost pa pravilno negativni rezultat, če je preiskovanec zdrav. Pozitivna napovedna vrednost testa je delež rezultatov, ki so med vsemi pozitivnimi rezultati testa pravilno pozitivni, negativna napovedna vrednost pa je delež rezultatov, ki so med vsemi negativnimi rezultati pravilno negativni. Zato si za vsak presejalni test želimo, da so njegove značilne vrednosti visoke, kajti pri nizki napovedni vrednosti izpostavimo preveliko število zdravih preiskovank invazivnim diagnostičnim preiskavam. Pomembno vlogo pri napovedi pozitivne napovedne vredno-

sti ima tudi prevalenca bolezni. Ob majhni prevalenci je pozitivna napovedna vrednost nizka.¹⁷

Četverni presejalni test se je izkazal kot visoko specifičen za odkrivanje plodov s trisomijo 21, vendar ima za analizirano skupino naključno zbranih nosečnic nizko občutljivost in nizko pozitivno napovedno vrednost. Za odkrivanje plodov s trisomijo 18 je test visoko specifičen in občutljiv, visoka je tudi negativna napovedna vrednost, pozitivna napovedna vrednost testa pa ostaja nizka.

Ocenjevanje občutljivosti četrnega testa za slovensko populacijo nosečnic je lahko pristransko zaradi nizkega števila nosečnosti s plodovi s kromosomopatijo, vključenih v raziskavo.

Ugotovili smo, da na izračun tveganja pri lažno pozitivnih rezultatih za trisomijo 21 vplivata starost in teža nosečnice, pri trisomiji 18 pa starost in kajenje. Pri nosečnicah z lažno pozitivnim rezultatom presejanja za trisomijo 21 je bila teža nižja (64,44 kg) od pravilno negativnih (68,01 kg), starost lažno negativnih pa višja (33,14 let) od starosti pravilno negativnih (29,98 let). Pri trisomiji 18 teža ni imela vpliva na izračun tveganja, starost pa je bila pri lažno pozitivnih (31,81 let) v primerjavi s pravilno negativnimi (30,12 let) prav tako višja. Naši rezultati potrjujejo predhodne ugotovitve, da poleg mnogokratnika normalne mediane (MoM) za posamezen parameter na izračun tveganja najbolj vpliva materina starost.¹⁸

V literaturi najdemo nasprotujoče si podatke o zvečani pojavnosti kongenitalnih malformacij pri novorojenčkih mater z lažno pozitivnim rezultatom četrnega testa.

Tabela 1: Povprečne vrednosti parametrov pri trisomiji 21.

Trisomija 21	AFP ($\mu\text{g/L}$)	uE3 (nmol/L)	Beta hCG (IE/L)	Inhibin A (IE/L)
Lažno negativni	27,03	4,72	55.983,42	300,78
Resnično negativni	32,66	8,25	27.323,82	167,95

Tabela 2: Povprečne vrednosti parametrov pri trisomiji 18.

Trisomija 18	AFP ($\mu\text{g/L}$)	uE3 (nmol/L)	Beta hCG (IE/L)	Inhibin A (IE/L)
Lažno negativni	28,82	3,27	15.584,87	150,32
Resnično negativni	32,42	8,09	28.620,69	173,95

Vrednosti posameznih porametrov nad 2 ali 3 MoMe so lahko povezane z zvečanim tveganjem za rojstvo otroka, ki je premajhen za gestacijsko starost, in z zvečanim tveganjem za prirojene malformacije.¹⁹⁻²¹ V naši raiskavi smo potrdili povezavo med lažno pozitivnimi rezultati za trisomijo 21 in kongenitalnimi malformacijami, pri lažno pozitivnih rezultatih za trisomijo 18 pa je bila dokazana povezava s kongenitalnimi okvarami genitalnih organov. Zato je kljub normalnim izvidom kariotipizacije utemeljen usmerjen ultrazvočni pregled v iskanje manjših (t. i. minor) prirojnih malformacij.^{21,22}

Zaključek

Presejanje s četvernim testom v drugem trimesečju nosečnosti se je s svojimi rezultati in dostopnostjo uveljavilo v Sloveniji in je namenjeno predvsem nosečnicam, ki so zaradi različnih vzrokov zamudile možnosti presejanja v prvem trimesečju nosečnosti. Njegova glavna pomanjkljivost pa je pomik odločanja o prekinitvi ali nadaljevanju nosečnosti pri odkritih plodovih s kromosomopatijo v 19. do 22. teden nosečnosti.

Literatura

1. Tul N. Presejalni hormonski testi za Downov sindrom. *Med Razgl* 1997; 36: 523-37.
2. Tul N. Presejanje za kromosomopatije pri plodu. *Med Razgl* 2011; 50 Suppl 2: 137-48.
3. Van Lith JM, Pratt JJ, Beekhuis JR, et al. Second-trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome. *Prenat Diagn* 1992; 12: 801-6.
4. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, et al. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 886-94.
5. Brock DHJ, Bolton AE, Monaghan JM. Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement. *Lancet* 1973; ii: 943-4.
6. 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: 886-94.
7. Pajntar M, Novak-Antolič Ž in sodelavci. Nosečnost in vodenje poroda, 2. dopolnjena izdaja. Ljubljana: Cankarjeva založba, 2004.
8. Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. *Lancet* 1984; i: 926-9.
9. Wald NJ, Hackshaw AK, George LM. Assay precision of serum alpha fetoprotein in antenatal screening for neural tube defects and Down's syndrome. *J Med Screen* 2000; 7: 74-7.
10. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, et al. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 330-3.
11. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 334-41.
12. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 883-7.
13. 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.
14. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 1987; 7: 623-30.
15. Benn PA, Fang M, Egan JF, et al. Incorporation of Inhibin-A in Second-Trimester Screening for Down Syndrome. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 451-4.
16. Lambert-Messerlian GM, Canick JA. Clinical application of inhibin a measurement: prenatal serum screening for Down syndrome. *Semin Reprod Med* 2004; 22: 235-42.
17. Geršak K. Načela in lastnosti presejalnih testov. *Med Razgl* 2011; 50 Suppl 2: 19-24.
18. Gilbert RE, Augood A, Gupta R, Ades EA, Logan S. Screening for Down's syndrome: effects, safety and cost effectiveness of first trimester strategies. *BMJ* 2001; 323: 324-6.
19. Güdücü N, Gönenç G, Işçi H, Yiğiter AB, Dündar I. Can quadruple test parameters predict SGA infants? *J Obstet Gynaecol* 2013; 33: 269-71.
20. Lao MR, Calhoun BC, Bracero LA, et al. The ability of the quadruple test to predict adverse perinatal outcomes in a high-risk obstetric population. *J Med Screen* 2009; 16: 55-9.
21. Aagaard-Tillery KM, Malone FD, Nyberg DA, et al. Role of second-trimester genetic sonography after Down syndrome screening. *Obstet Gynecol* 2009; 114: 1189-96.
22. Novak-Antolič Ž. Psihične obremenitve pri presejalnih testih v nosečnosti. V: Bregant L, ur. Strah, bolečina, žalost. Zbornik prispevkov. Ljubljana: GK, 1997: 15-22.