

Nieinwazyjny test prenatalny w I trymestrze ciąży (pomiar NT oraz oznaczenia β -hCG i PAPP-A) w diagnostyce wad płodu w populacji polskiej – porównanie biochemicznych norm własnych i danych światowych

Noninvasive prenatal test in the first trimester of pregnancy (NT and estimation of β -hCG and PAPP-A) in the diagnosis of fetal abnormalities in Polish population – comparison of the biochemistry own normal ranges and literature reported data

Mandryka-Stankewycz Sofija, Perenc Małgorzata, Dec Grażyna, Sieroszewski Piotr

Klinika Medycyny Płodu i Ginekologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Wstęp: W ramach wieloletnich doświadczeń dobrano odpowiednie badania biochemiczne, które, wykonywane w różnych trymestrach ciąży, pozwalają na osiągnięcie jak największej skuteczności w rozpoznawaniu aberracji chromosomowych.

Cel pracy: Opracowanie własnych norm dla stężeń ciążowego białka osoczkowego A (PAPP-A) i wolnej podjednostki β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG) w surowicy krwi kobiet ciężarnych pomiędzy 10,0 a 13,6 tygodniem ciąży i porównanie biochemicznych norm własnych i danych światowych. Oszacowanie czułości pomiaru przezierności karkowej płodu i oznaczeń biochemicznych stężeń PAPP-A i wolnej podjednostki β -hCG dla określenia ryzyka wystąpienia wad genetycznych płodu.

Materiał i metody: Badaniami objęto 582 kobiety ciężarne w wieku od 14 do 46 lat.

Przeprowadzono skrining ultrasonograficzny i biochemiczny pomiędzy 10,0 a 13,6 tygodniem ciąży. Mierzono grubość przezierności karkowej płodu (zgodnie ze standardami FMF). Oznaczano stężenia PAPP-A oraz wolnej β -hCG w surowicy ciążarnej. Oznaczenia biochemiczne wykonywano metodą immunoenzymatyczną (Delfia Express).

Wyniki: Wyznaczono zakresy wartości prawidłowych dla stężeń PAPP-A i wolnej podjednostki β -hCG w grupie kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą. Czułość pomiaru przezierności karkowej płodu dla ustalenia ryzyka wystąpienia wad genetycznych płodu wynosiła 80%, natomiast czułość oznaczeń biochemicznych stężeń PAPP-A i wolnej podjednostki β -hCG odpowiednio 40% i 60%.

Wnioski:

1. Opracowane własne normy dla stężeń PAPP-A i wolnej β -hCG w surowicy krwi kobiet ciężarnych w poszczególnych tygodniach I trymestru ciąży nie różnią się znamienne od norm FMF.

2. Stwierdzone różnice wartości pomiaru przezierności karkowej płodu w badaniu ultrasonograficznym oraz stężeń markerów biochemicznych (PAPP-A i wolnej β -hCG) w grupie ciężarnych z rozpoznanymi aneuploidiami u płodów potwierdziły zasadność zastosowania tych parametrów jako składowych testu przesiewowego wykrywającego wady genetyczne płodu w I trymestrze ciąży w populacji polskiej.

Adres do korespondencji:

Sofija Mandryka-Stankewycz
Klinika Medycyny Płodu i Ginekologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
94-029 Łódź, ul. Wileńska 37
tel. 42 686 84 21, e-mail : getman@op.pl

Otrzymano: 15.09.2009
Zaakceptowano do druku: 29.10.2009

Słowa kluczowe: **nieinwazyjny test prenatalny / przezierność karkowa /
/ ciążowe białko osoczowe PAPP-A / aberracje chromosomowe /**

Abstract

The aim of study: Estimation of Polish population standards of the concentrations of pregnancy-associated plasma protein - A (PAPP-A) and free beta - human chorionic gonadotropin (β -HCG) in the maternal blood between 10.0 and 13.6 week of pregnancy and comparison of the biochemistry own normal ranges and literature reported data.

Estimation the sensitivity of the fetal nuchal translucency measurement, biochemical concentrations of PAPP-A and free β -HCG in detection of the fetal chromosomal abnormalities.

Material and methods: 582 women in the age 14 to 46 years old with singleton pregnancies were included to the study. The screening was performed between 10.0 and 13.6 week of gestation. The fetal nuchal translucency, serum concentrations of PAPP-A and free β -HCG were measured. The specific risk was calculated using the Fetal Medicine Foundation software (FTS) by accredited sonographers.

Results: Standards for serum concentrations of PAPP-A and free β -HCG in normal pregnancies were determined. The measurement sensitivity of the fetal nuchal translucency in detection of the fetal chromosomal abnormalities was 80% and sensitivity of serum concentrations of PAPP-A and free β -HCG was 40% and 80%.

Conclusions: There is no significant differences between estimated biochemistry standards (PAPP-A and free β -HCG) for Polish population and literature reported data.

Observed differences in measurements of fetal NT, serum concentrations of PAPP-A and free β -HCG in a control group and the group with the aneuploidies confirmed usefulness of these methods for the first trimester prenatal screening.

Key words: **noninvasive prenatal test / nuchal translucency (NT) /
/ pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) / chromosom aberrations /**

Wstęp

Aktualnie przy ocenie ryzyka występowania aneuploidii chromosomowych u płodu bierze się pod uwagę nie tylko wiek matki, ale także wyniki badań biochemicznych (stężeń osoczowego białka ciążowego - A (PAPP-A) i wolnej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG) w surowicy krwi ciężarnej) oraz pomiar przezierności karkowej płodu (NT) [1, 2, 3, 4, 5].

Połączenie wyżej wymienionych parametrów (stężenia PAPP-A, wolnej β -hCG i pomiaru przezierności karkowej NT) zdefiniowano w literaturze światowej jako standardowy test skринingowy w I trymestrze ciąży. Jego wykonanie pozwala na ograniczenie ilości badań inwazyjnych, a także wyselekcjonowanie grupy wysokiego ryzyka wystąpienia aneuploidii u płodu.

W grupie tej wskazane jest przeprowadzenie celowanej diagnostyki inwazyjnej [5].

Cel pracy

Celem pracy było opracowanie własnych norm dla stężeń ciążowego białka osoczowego A (PAPP-A) i wolnej podjednostki β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG) w surowicy krwi kobiet ciężarnych pomiędzy 10,0 a 13,6 tygodniem ciąży i porównanie biochemicznych norm własnych i danych światowych. Oszacowanie czułości pomiaru przezierności karkowej płodu i oznaczeń biochemicznych stężeń PAPP-A i wolnej podjednostki β -hCG dla określenia ryzyka wystąpienia wad genetycznych płodu.

Materiał i metody

Badania wykonano w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badaniami objęto 582 wybrane losowo kobiety ciężarne w wieku 14-46 lat .

W badanej populacji przeprowadzono skринing ultrasonograficzny i biochemiczny pomiędzy 10 a 13,6 tygodniem ciąży.

Wiek ciążowy obliczano na podstawie pomiaru długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (CRL).

Dokonywano pomiaru przezierności karkowej w wymiarze przednio-tylnym – badanie wykonywano od 11,0 tygodnia ciąży (wg standardów FMF), oznaczano stężenia PAPP-A oraz wolnej β -hCG w surowicy krwi ciężarnych. Oznaczenia biochemiczne wykonywano metodą immunoenzymatyczną (Delfia Express, Perkin Elmer) .

Wyniki uzyskanych badań zostały zebrane w arkuszu kalkulacyjnym EXCEL MS OFFICE 2003 i poddane analizie statystycznej (Statgraphics Centurion XV).

Obliczono następujące parametry: wartość średnią (X_m), błąd standardowy wartości średniej (SEM), wartość maksymalną (Max) i minimalną (Min) oraz medianę (Med). Dla zbiorów danych, których rozkład wielkości jest normalny (wg Gaussa) zastosowano do opisu wartości średnią (X_m), odchylenie standardowe (SD), błąd standardowy wartości średniej (SEM), wartość maksymalną (Max) i minimalną (Min). Istotne różnice wartości średnich badanych parametrów były wyznaczone za pomocą testu t-Studenta. Obliczono czułość i swoistość badanych stężeń wolnej podjednostki β -hCG, PAPP-A i pomiaru NT płodu dla rozpoznania trisomii 21, jednej z najczęstszych aberracji chromosomowych.

Wyniki

Oceniono 582 wyniki badań biochemicznych, w których oznaczono stężenia wolnej podjednostki β -hCG i PAPP-A (badano surowicę ciężarnych od 10,0 tygodnia ciąży) oraz 530 wyników badań ultrasonograficznych, w których oceniono NT (badanie wykonywano od 11,0 tygodnia ciąży).

Nieinwazyjny test prenatalny w I trymestrze ciąży...

Aberracje chromosomowe płodów rozpoznane były na podstawie inwazyjnych badań genetycznych przeprowadzonych prenatalnie oraz oceny pourodzeniowej.

Grupa kobiet z ciążą fizjologiczną stanowiła podstawę do wyznaczenia zakresów wartości prawidłowych dla badanych parametrów.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej. W obu grupach oceniono: wartość średnią (X_m), błąd standardowy wartości średniej (SEM), wartość maksymalną (Max) i minimalną (Min) oraz medianę (Med). Następnie dokonano porównania wartości średnich. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela I i tabela II.

Uzyskane wartości badanych parametrów w obydwu grupach porównano przy pomocy trzech testów: testu F Snedecora (F), testu T, testu Studenta (t).

Pomiędzy grupą badaną a kontrolną stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach średnich wieku, przezierności karkowej i stężeń PAPP-A. (Tabela III).

Uzyskane dla ciąż prawidłowo przebiegających wyniki pomiarów przezierności karkowej, stężeń PAPP-A i wolnej β -hCG stanowiły podstawę do obliczenia median w poszczególnych tygodniach ciąży w zależności od długości ciemieniowo-siedzeniowej (CRL) płodów oraz przedstawienie ich w postaci wielokrotności mediany (MoM) oraz percentyli. (Tabela IV).

Porównano MoM wolnej β -hCG, MoM PAPP-A i MoM NT w obu grupach badanych. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach 1, 2, 3.

Oszacowano czułość badania dla określenia ryzyka wystąpienia najczęściej spotykanej aberracji chromosomowej – zespołu Downa. Dla izolowanego pomiaru stężenia wolnej β -hCG czułość wynosiła 60%, dla izolowanego pomiaru stężenia PAPP-A – 40%, zaś dla pomiaru grubości NT płodu 80%.

Dyskusja

W wyborze markerów ocenianych w badaniu wzięto pod uwagę dane z piśmiennictwa. Wald i wsp. oceniając siedem potencjalnych markerów aneuploidii (AFP, estriol, całkowitą hCG, wolną α -hCG, wolną β -hCG, PAPP-A, inhibinę A) szczególną uwagę zwraca na wolną β -hCG i PAPP-A. Autor podaje, że analizując również wiek ciężarnej wymienione markery pozwalają na wykrycie 63% przypadków zespołu Downa, przy wyniku fałszywie dodatnim (FPR) 5,5%. Współczynnik wykrywalności (DR) uzyskany w badaniu jest porównywalny do DR uzyskanego przy pomocy testu potrójnego i wyższy od DR dla testu podwójnego (AFP + HCG + wiek ciężarnej) [6]. Porównywalną wartość uzyskano w niniejszym badaniu.

W przeprowadzonym badaniu wyznaczono zakresy wartości prawidłowych dla PAPP-A i wolnej podjednostki β -hCG w grupie kobiet z ciążą fizjologiczną.

Różnice w stężeniach badanych parametrów biochemicznych w grupie kobiet z ciążą fizjologiczną w porównaniu do grupy kobiet z wadą genetyczną u płodu posłużyły do oznaczenia czułości i swoistości testu w wykrywaniu trisomii 21 pary chromosomów.

Średnia mediana dla wolnej podjednostki β -hCG w trzech z pięciu przypadków zespołu Downa stwierdzonych w niniejszym badaniu wynosiła 2,3 MoM. Nieco niższe wartości uzyskał Krantz i wsp. w 1996 roku: w grupie kobiet ciężarnych z trisomią 21 u płodu ($n=22$) - wielokrotność mediany dla β -hCG wynosiła 2,09 MoM [7].

Tabela I. Wartości badanych parametrów w grupie kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą.

	Wiek	CRL [mm]	NT	β HCG	PAPP-A
<X>	32,18	58,65	1,28	46,77	2,27
SD	5,49	10,85	0,40	31,14	1,72
SEM	0,23	0,45	0,02	1,30	0,07
n	573	573	530	573	573
Max	46	79	3,6	200	13,5
Mediana	33	59	1,2	38	1,8
Min	14	32	0,9	2,7	0,05

Tabela II. Wartości badanych parametrów w grupie kobiet ciężarnych ze stwierdzonymi aneuploidiami u płodu.

	Wiek	CRL [mm]	NT	β HCG	PAPP-A
<X>	36,44	63,56	3,92	46,31	1,07
SD	4,00	9,48	2,92	32,43	1,12
SEM	1,33	3,16	0,97	10,81	0,37
n	9	9	9	9	9
Max	43,0	75,0	11,0	103,0	3,58
Mediana	37,0	63,0	2,8	45,5	0,44
Min	29,0	46,0	1,8	4,76	0,17

Tabela III. Porównanie wartości średnich badanych parametrów w obu grupach kobiet ciężarnych.

	Wiek	CRL	NT	β HCG	PAPP-A
Test F	0,332673	0,723227	4,87E-62	0,572996	0,24757199
Test T	0,0211	0,1784	0,0263	0,9678	0,0375
t-Studenta	0,983199	0,858450	0,979025	0,333551	0,970062
	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05
	*	NS	*	NS	*

Tabela IV. Percentyle wartości prawidłowych badanych parametrów biochemicznych oraz przezierności karkowej wśród kobiet z ciążą fizjologiczną.

Percentyle	MoM NT	MoM β HCG	MoM PAPP-A
1%	0,50	0,31	0,22
5%	0,60	0,41	0,36
10%	0,70	0,50	0,45
90%	1,42	2,24	2,06
95%	1,60	2,61	2,56
99%	2,09	4,04	4,02

Średnia wartość wielokrotności mediany dla wolnej β -hCG w grupie kobiet w I trymestrze ciąży fizjologicznej wynosiła w niniejszym badaniu 1,23 MoM. Natomiast Borowski i wsp. w pracy opublikowanej w maju 2007 roku podają dla analogicznej grupy średnią wartość wielokrotności mediany, 1,06 MoM [8].

Schielen w 2006 roku w swojej pracy uzyskał w grupie kobiet z ciążą fizjologiczną jeszcze niższą wartość średniej wielokrotności mediany dla β -hCG - 0,98 [9].

Wysokie wartości stężenia wolnej podjednostki β -hCG w surowicy kobiet ciężarnych z trisomią 21 u płodu opisuje w swoich pracach wielu badaczy. Schielen podaje w grupie kobiet z trisomią 21 pary chromosomów u płodu średnią medianę dla β -hCG - 2,19 MoM, natomiast Spencer 2,15 MoM [9]. Wald podaje średnią medianę dla β -hCG w 12 tygodniu ciąży 2,22 MoM, a w 13 tygodniu ciąży 2,5 MoM, Keuter w grupie z kobiet ciężarnych z trisomią 21 u płodu uzyskał średnią wielokrotność mediany 3 MoM [6]. Niższe wartości wielokrotności mediany dla β -hCG podają Dhaifalch.

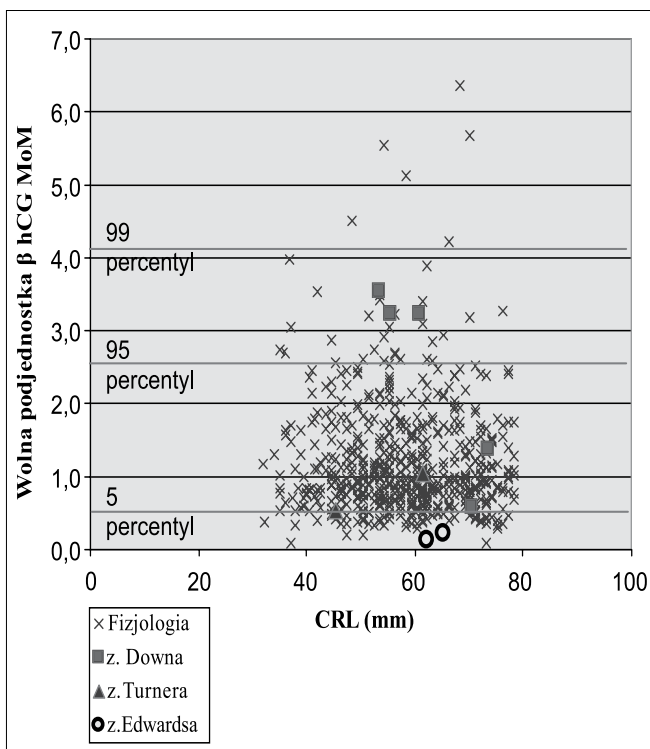
W grupie ciężarnych z ZD u płodu otrzymała średnią wielokrotność mediany dla β -hCG - 1,9 MoM [10].

Biorąc pod uwagę różnice w stężeniach wolnej podjednostki β -hCG zaobserwowane w obydwu badanych grupach, obliczono czułość tego markera w wykrywaniu zespołu Downa. DR dla β -hCG wyniósł 60%. U 77 kobiet ciężarnych uzyskano wartości β -hCG ≥ 2 MoM, co stanowi odsetek FPR w grupie kobiet z ciążą fizjologiczną rzędu 13,44%. Dwukrotnie niższą czułość otrzymał dla β -hCG Wald szacując DR na 35%, natomiast Soergel podaje w swoim badaniu DR rzędu 75%. [6, 11].

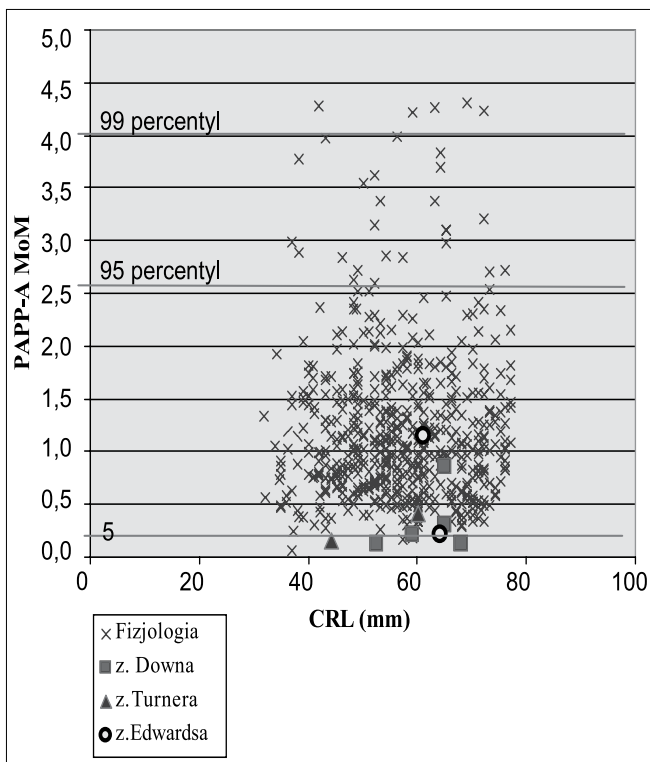
Średnia wielokrotność mediany dla PAPP-A uzyskana w niniejszej pracy w czterech przypadkach z pięciu trisomii 21 była niższa od 0,5 MoM i wynosiła 0,37 MoM. Jest to zgodne z doniesieniami wielu naukowców. Tak na przykład Brambati i wsp. w 1994 roku dla 13 przypadków trisomii 21 otrzymali wielokrotność mediany dla PAPP-A równą 0,31 MoM. Podobne wartości uzyskał Macintosh. Autor w 14 przypadkach ciąż z trisomią 21 stwierdził wielokrotność mediany dla PAPP-A 0,34 MoM. Krantz w 1996 roku i Haddow w 1998 roku podają wielokrotność mediany dla trisomii 21 pary chromosomów rzędu 0,41 MoM, a Spencer w 1999 roku w grupie 210 kobiet ciężarnych z trisomią 21 u płodu uzyskał wielokrotność mediany 0,51 MoM [7]. Natomiast Wald w swoim badaniu podaje następujące wartości: w 11 tygodniu ciąży - 0,38 MoM, a w 12 tygodniu - 0,44 MoM [6]. Dhaifalch w populacji czeskiej otrzymuje dla PAPP-A w trisomii 21 średnią wielokrotność mediany 0,2 MoM, a Schielen - 0,16 MoM, Tsai - 0,45 MoM [9, 10, 12].

W niniejszej pracy u kobiet z ciążą fizjologiczną średnia wielokrotność mediany PAPP-A wynosiła 1,17 MoM. Nieco niższą średnią wielokrotność mediany w grupie ciąż fizjologicznych podają Borowski, Bartosz, Włoch, Wielgoś i Szaflik w badaniu obejmującym pięć ośrodków w Polsce (ICZMP w Łodzi, ŚIAM w Rudzie Śląskiej, IMiD w Warszawie, AM w Lublinie oraz AM w Warszawie). Autorzy uzyskali w grupie ciężarnych (n=800) z ciążą fizjologiczną średnią wielokrotność mediany dla PAPP-A 1,07 [8].

Oznaczony pomiar stężenia dla PAPP-A jako markera biochemicznego trisomii 21 w niniejszym badaniu pozwolił na oszacowanie czułości testu i wyniósł 80%.



Wykres 1. Stężenia wolnej β -hCG w grupie ciężarnych z aneuploidią u płodu oraz w grupie kontrolnej.



Wykres 2. Stężenia wolnej PAPP-A w grupie ciężarnych z aneuploidią u płodu oraz w grupie kontrolnej.

Nieinwazyjny test prenatalny w I trymestrze ciąży...

U 80 kobiet z grupy ciężarnych z ciążą fizjologiczną wartości PAPP-A były $\leq 0,5$ MoM, czyli odsetek wyników fałszywie dodatnich wyniósł 13,9%.

De Graaf uzyskał czułość dla pomiaru stężenia PAPP-A rzędu 55,3%, Wald podaje DR dla PAPP-A rzędu 35%, Palomaki szacuje ten wskaźnik na 36%.

Wysoka czułość PAPP-A i β -hCG uzyskana w niniejszym badaniu może być spowodowana małą liczbą kobiet ciężarnych z wadami genetycznymi u płodu.

Jak wynika z przytoczonych wyżej prac, wartości parametrów biochemicznych jak i ultrasonograficznych uzyskane w naszym badaniu odpowiadają wartościom przyjętym na całym świecie.

Test łączący badania biochemiczne z ultrasonograficznymi może być zastosowany jako skrining aneuploidii chromosomowych u płodu. Połączenie markerów biochemicznych i ultrasonograficznych w test zintegrowany pozwoliło na wykrycie 4 z 5 przypadków zespołu Downa dając czułość 80%. Piąty przypadek trisomii 21 został zidentyfikowany po wykonaniu u ciężarnej testu potrójnego w 16 tygodniu ciąży. U wszystkich pięciu przypadków zespołu Downa rozpoznanie zostało potwierdzone badaniami cytogenetycznymi.

Zaobserwowane różnice stężeń markerów biochemicznych w obu grupach ciężarnych: z ciążą fizjologiczną oraz z aneuploidią u płodu, są zgodne z obserwacjami autorów na całym świecie.

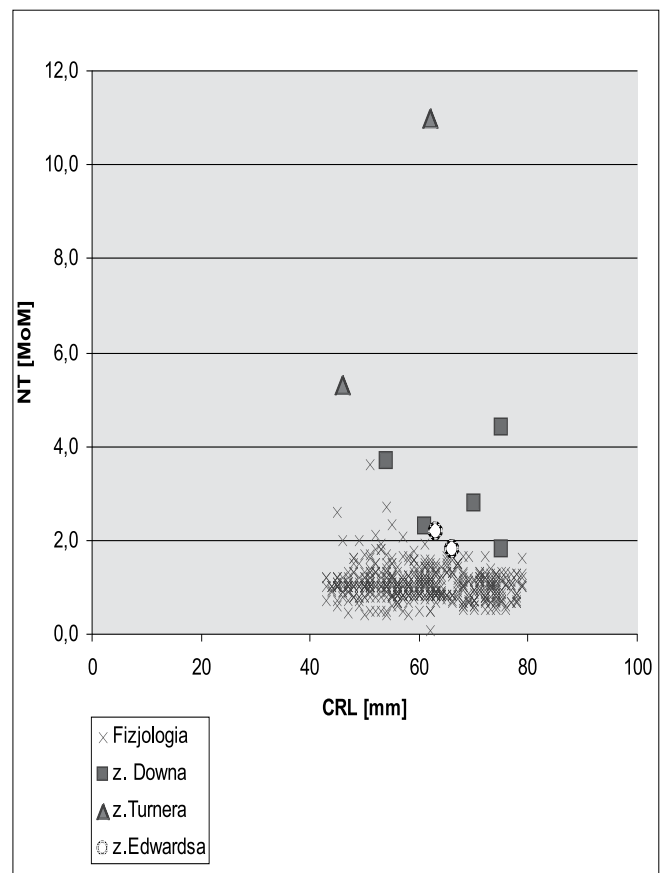
Wnioski

- Opracowane własne normy dla stężeń ciążowego białka osoczkowego A i wolnej podjednostki β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w surowicy krwi kobiet ciężarnych pomiędzy 10,0 a 13,6 tygodniem ciąży nie różnią się znamienne od danych światowych.
- Zaobserwowane różnice w wartościach pomiarów przezroczności karkowej płodu w badaniu ultrasonograficznym oraz stężeniach PAPP-A i wolnej β -hCG w surowicy krwi ciężarnych grupy kontrolnej i w grupie ciężarnych z rozpoznanymi aneuploidiami potwierdziły zasadność zastosowania wyżej wymienionych parametrów jako składowych testu przesiewowego wykrywającego wady genetyczne płodu w I trymestrze ciąży w populacji polskiej.

Badania przeprowadzone w ramach finansowania z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - nr rej. grantu: N406 044 31/1354.

Piśmiennictwo

- Nicolaides K, Węgrzyn P. Badanie Ultrasonograficzne między 11(+0)-13 (+6) tygodniem ciąży. London: *Fetal Medicine Foundation*, 2004, 9-50.
- Baś-Budecka E, Suzin J, Lipecka-Kidawska E, [i wsp.]. Pomiar faldy karkowego-nieinwazyjna metoda skreeningu wad płodu. Cz. I. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 187-191.
- Sieroszewski P, Baś-Budecka E. Pomiar faldy karkowego-nieinwazyjna metoda skreeningu wad płodu. Cz. II. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 192-196.
- Sieroszewski P, Suzin J, Baś-Budecka E. Test zintegrowany-bezpieczny screening dla wykrywania wad płodu w ciąży. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 197-202.



Wykres 3. Szerokość NT w grupie ciężarnych z aneuploidią u płodu oraz w grupie ciąż prawidłowych. 5%-0,6 MoM; 95%-1,6MoM; 99%-2,09MoM.

- Sieroszewski P, Perenc M, Baś-Budecka E, [i wsp.]. Ocena markerów ultrasonograficznych dla określania ryzyka aneuploidii chromosomowych u płodu w I połowie ciąży. *Ginekol Pol.* 2005, supl. 2.
- Wald N, George L, Smith D, [et al.]. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. International Prenatal screening Research Group. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996, 103, 407-412.
- Krantz D, Hallahan T, Orlandi F, [et al.]. First-trimester Down syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. *Obstet Gynecol.* 2000, 96, 207-213.
- Borowski D, Czuba B, Cnota W, [i wsp.]. Ocena poziomów osoczkowego białka ciążowego A (PAPP-A) i wolnej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (beta hCG) między 11 a 14 tygodniem ciąży - polskie badania wielośrodkowe. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 384-387.
- Schielen P, van Leeuwen-Spruijt M, Belmouden I, [et al.]. Multi-centre first trimester screening for Down syndrome in the Netherlands in routine clinical practice. *Prenat Diagn.* 2006, 26, 711-718.
- Dhaifalah I, Santavy J, Zapletalova J. Screening for chromosomal anomalies in the first trimester: A report on the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, 150, 275-278.
- Soergel P, Pruggmayer M, Schwerdtfeger K, [et al.]. Screening for trisomy 21 with maternal age, fetal nuchal translucency and maternal serum biochemistry at 11-14 weeks. *Fetal Diagn Ther.* 2006, 21, 264-268.
- Tsai M, Huang Y, Hwa K, [et al.]. Combined measurement of fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-hcg, and pregnancy-associated plasma protein A for first trimester Down's syndrome screening. *J Formos Med Assoc.* 2001, 100, 319-325.