آزمون‌های غربالگری بارداری در ناهنجاری‌های جنینی

پرتو دانش
فصلنامه‌ی تخصصی پزشکی و پیرا پزشکی

■ **اکرم فرهادی**
مدیر کیفی آزمایشگاه تشخیص طبی دانش

■ **محمدحسن یوسفی**
مسئول علمی آزمایشگاه تشخیص طبی دانش

چکیده:

سلامتی فرزند متولد نشده اغلب بزرگ‌ترین نگرانی مادرهای باردار است. غربالگری دوران بارداری می‌تواند با این نگرانی مقابله کند. در حال حاضر غربالگری در بارداری، برای تعدادی از اختلالات کروموزومی و نقائص ساختاری جنین هنگام تولد صرف نظر از سن بارداری و سوابق خانوادگی پیشنهاد می‌شود. در دهه‌های اخیر توسعه‌هایی در روش‌های غربالگری با استفاده از مارکرهای شیمیایی چندگانه و سونوگرافی در سه ماهه اول و سه ماهه دوم بارداری به وجود آمده است. گام بعدی در انقلاب غربالگری بارداری شناسایی DNA آزاد سلول جنین در خون مادر بود که منجر به توسعه تست‌های غیر تهاجمی بارداری (NIPT) شد. دقت بالای غربالگری تریزومی ۲۱ در روش DNA سلول‌های آزاد جنینی در مقایسه با گزینه‌های غربالگری سنتی یک تاثیر بزرگی در عرصه غربالگری و تشخیص پیش از تولد داشت. مزیت آزمایشات غربالگری این است که هیچ گونه خطر سقط را به همراه ندارد و صدمه‌ای به جنین نمی‌رساند.

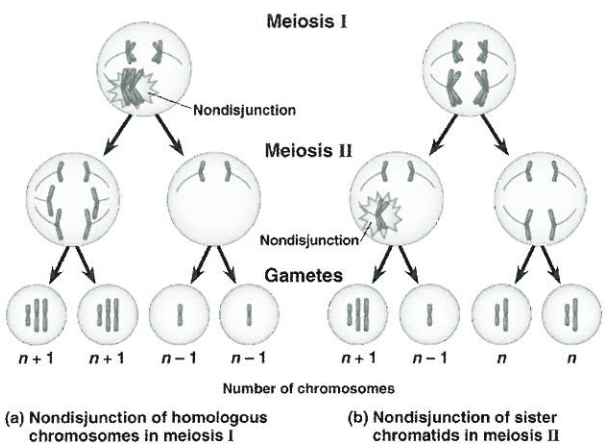
کلید واژگان: اختلالات کروموزومی، غربالگری بارداری، سندروم داون، تریپل مارکر، کوآد مارکر، پنتا مارکر.

مقدمه:

اختلالات کروموزومی (آنوپلوئیدی) یک حالت غیر طبیعی بوده که در اثر آن یک یا چند کروموزوم اضافه یا کاهش می‌گردد. در بیشتر حالت‌های آنوپلوئیدی، جنین زنده نمانده و از بین می‌رود. در این بین، سندرم داون یا تریزومی ۲۱، از شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین اختلالات کروموزمی به شمار می‌رود.(۱) اولین بار پزشکی انگلیسی به نام John Langdon Down فنوتیپ بچه‌هایی با ویژگی‌های مشترک قابل توجه در مقایسه با دیگر بچه‌ها همراه با عقب ماندگی ذهنی را توضیح داد، از آنجایی که این بچه‌ها مانند مردم مغولستان به نظر می‌رسیدند، داون آنها را منگول نامید. این بیماری بعدها به افتخار داون، دکتری که برای اولین بار این سندروم را در سال ۱۸۶۶ تشخیص داده بود سندروم داون نامگذاری شد، اما تا اواسط قرن ۲۰ علت سندروم داون نامشخص ماند. (۲)

هنگامی که شخص سه کپی از کروموزوم ۲۱ به جای دو کپی داشته باشد سندروم داون رخ می‌دهد، که میزان شیوع آن، یک کودک به ازای هر ۸۰۰ تولد می‌باشد که این میزان با افزایش سن مادر بیشتر می‌شود.(۳) کروموزوم اضافی ۲۱ تقریبا در ۹۵ درصد افراد نتیجه جدا نشدن کروموزومی (nondisjunction) در طول تقسیم میوز در تخمک یا اسپرم می‌باشد. هرچند احتمال بروز تریزومی ۲۱ در بارداری‌های بالای ۳۵ سال بیشتر است، با این حال به دلیل وفور بارداری‌های زیر ۳۵ سال ۷۰٪ کودکان مبتلا به سندرم داون متعلق به مادران زیر ۳۵ سال هستند، در نتیجه عده‌ای از متخصصین، غربالگری تمام بانوان باردار را ضروری دانسته‌اند. (۴) از علائم و مشخصات بیمار مبتلا به سندروم داون می‌توان به هیپوتونی عمومی (شلی عمومی بدن)، استخوان پشت سری صاف و نامتقارن، شکاف چشمی تنگ و مورب

(شبیه مغول‌ها)، استخوان‌های گونه بلند، پلک سوم، شکاف لب یا سقف دهان، فاصله بیش از معمول بین دو چشم، کاتاراکت، استرابیسم، پل بینی مسطح و بینی کوچک، قاعده بینی فرو رفته و سوراخ‌های بینی کمی سر بالا، دهان کوچک، زبان بزرگ‌تر از معمول و سطح آن دارای شیارهای عمیق (بزرگی زبان نسبت به دهان)، گوش کوچک و گرد با ارتفاع کم که نرمه آن به پوست چسبیده، گردن کوتاه و پوست پشت گردن شل و چین خورده، موهای بدن نازک و ظریف، عقب ماندگی ذهنی، شل بودن پوست بدن در دوران نوزادی، شل بودن عضلات شکم، شکم برآمده و ... اشاره کرد. (۵،۶)



شکل ۱: جدا نشدن کروموزوم در طول تقسیم میوز

تنها راه جلوگیری از تولد نوزادان مبتلا بـه اختلالات کروموزومـی تشخیص پیش از تولد است. تشخیص پیش از تولد اختلالات کروموزومی در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی به طور معمول در بخش سیتوژنتیک و با روش کشت سلول‌های جنینی موجود در نمونهٔ مایع آمنیون و یا بیوپسی پُرزهای کوریونیک و در نهایت تهیهٔ کاریوتایپ جنین و با دقتی بسیار بالا صورت می‌گیرد. لیکن با توجه به تهاجمی وگران بودن در مورد کلیه بارداری‌ها نمی‌توانند بکار روند. اغلب بارداری‌ها از نظر کروموزومی طبیعی هستند و خطر سقط جنین در این صورت بسیار بیشتر از خطر تولد نوزادان مبتلا به اختلالات کروموزومی خواهد بود، علاوه بر این هزینه سنگینی را به خانواده‌ها تحمیل می‌نماید.

به منظور اجتناب از بکارگیری روش‌های تهاجمی و گران قیمت ابتدا با استفاده از روش‌های غربالگری، که روش‌های غیرتهاجمی و ارزان قیمت هستند، بارداری‌هایی که در معرض خطر بیشتری هستند معین می‌شوند، سپس ابتلا یا عدم ابتلای جنین در بارداری‌های پرخطر تشخیص داده می‌شوند. (۷)

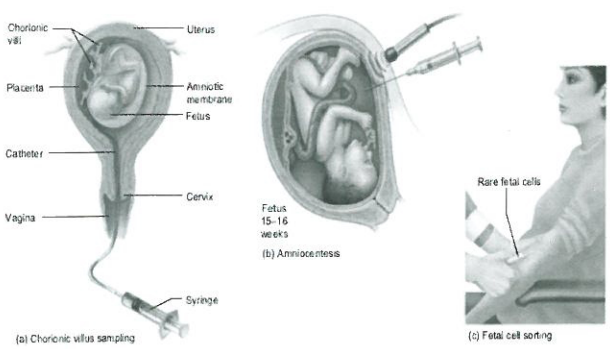
بزرگ‌ترین ایراد در روش‌های سنتی غربالگری، درصد بالای نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب و در موردآزمایش‌های تاییدی، احتمال سقط جنین به علت تهاجمی بودن روش نمونه‌گیری است. (۸)

ما در این مقاله قصد داریم مروری بر روش‌های سنتی و جدید غربالگری بارداری و نرخ تشخیص آنها داشته باشیم.

روش‌های غربالگری

غربالگری آنوپلوئیدی یک بخش مهم از مراقبت‌های روتین دوران بارداری است. غربالگری در زمان‌های مختلف بارداری و با روش‌های گوناگونی انجام می‌شود. غربالگری برای آنوپلوئیدی کروموزومی در بارداری در سال ۱۹۶۰ میلادی با بررسی سن مادر باردار به عنوان تنها مارکر در دسترس شروع شد. (۹) اولین روش در دسترس برای غربالگری آنوپلوئیدی سن بارداری (maternal age) می‌باشد. سن بارداری بالا زمینه را برای ابتلا به سندروم داون و دیگر اختلالات کروموزومی جنین بر پایه جدا نشدن کروموزومی (nondisjunction) مهیا می‌سازد. در واقع، خطر ابتلا به آنوپلوئیدی جنین در زایمان‌هایی که سن مادر ۳۵ سال یا بالاتر می‌باشد برابر یا بیشتر از سقط جنین به خاطر آمنیوسنتز تخمین زده می‌شود. (۱۰)

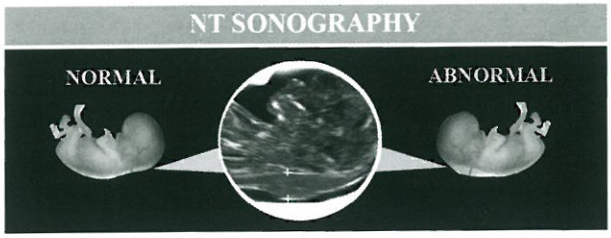
در دهه‌های اخیر توسعه‌هایی در روش‌های غربالگری با استفاده از مارکرهای شیمیایی چندگانه و سونوگرافی در سه ماهه اول و سه ماهه دوم بارداری به وجود آمده است. (۱۱) گام بعدی در انقلاب غربالگری بارداری شناسایی DNA آزاد سلول جنین در خون مادر بود که منجر به توسعه تست‌های غیر تهاجمی بارداری (NIPT) شد. دقت بالای غربالگری تریزومی ۲۱ در روش DNA سلول‌های آزاد جنینی در مقایسه با گزینه‌های غربالگری سنتی یک تاثیر بزرگی در عرصه غربالگری و تشخیص پیش از تولد داشت. (۱۲)



شکل ۲: تست‌های تشخیصی قبل از تولد جهت بررسی اختلالات کروموزوم

غربالگری سه ماهه اول بارداری

فضای nuchal یک فضای پر از مایع استاندارد و قابل شناسایی در پشت گردن جنین است که در هفته‌های ۱۱ تا ۱۴ بارداری در همه جنین‌ها وجود دارد. گزارش‌هایی در ارتباط بین افزایش مایع شفاف پشت گردنی جنین (NT) و تریزومی ۲۱ وجود دارد. (۱۳)



شکل ۳: تعیین NT جهت بررسی سلامت جنین

در هفته ششم زندگی جنینی کانال‌های لنفاتیک از شکاف‌های مزانشیمی تشکیل می‌شوند. از این کانال‌ها حفره‌هایی به منظور تخلیه لنف به داخل سیستم وریدی ایجاد می‌گردد. نقص در درناژ وریدی منجر به اتساع کانال‌های لنفاوی می‌شود کـه به نوع شدیـد آن سیستیک هیگروما گفته می‌شود. (۱۴) سیستیک هیگروما یک حفره پر از مایع است که اغلب ناحیه پشت گردنی جنین را درگیر می‌کند. تقریبا ۵۰ درصد سیستیک هیگروما که در سه ماهه اول بارداری شناسایی می‌شود، با آنوپلوئیدی کروموزومی که اکثرا از نوع سندروم داون می‌باشد همراه است. (۱۵)

امروزه غربالگری سه ماهه اول بارداری بر پایه مارکرهای سونوگرافی مثل اندازه‌گیری میزان NT به همراه اندازه‌گیری میزان هورمون‌های جفت شامـل PAPP-A و Free beta-HCG انجـام می‌گیـرد. (۱۶) غربالگری سه ماهه اول بارداری(FTS) معمولا بین هفته‌هـای ۱۱ تـا ۱۳ بارداری انجام می‌شود. (۱۷)

پروتئین A پلاسمائی مرتبط با حاملگی (PAPP-A) یک متالوپروتئاز است. پروتئین A پلاسمائی مرتبط بـا حاملگی بـه عنوان یک مـارکر بیوشیمیایی در ناهنجاری‌های کروموزومی استفاده می‌شود. مطالعات نشان داد که سطح پایین PAPP-A همراه با ناهنجاری‌های کروموزومـی مخصوصا سندروم داون در جنین می‌باشد و PAPP-A می‌تواند بارداری‌های نامطلوب را پیش بینی کند. (۱۸)

هورمون HCG توسط سلول‌های تروفوبلاست جفت ساخته می‌شود و از نقطه نظر فیزیولوژیک نقش مهمی در ابقاء جسم زرد در هفته‌های نخست بارداری دارد. مارکر Free B-hCG در واقع فرم آزاد هورمون BHCG است که در سه ماهه اول صحت بیشتری برای شناسایی سندروم داون در مقایسه با HCG دارد. در یک مطالعه گذشته نگر اوزتورک و همکاران کاهش سطح B-hCG آزاد را در نمونه سرم سه ماهه اول بارداری هشت مادر که جنین با تریزومی ۱۸ را حمل می‌کردند و افزایش سطح B-hCG را در هفت تا از نه زن باردار که جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ را حمل می‌کردند مشاهده کردند. (۱۹)

غربالگری سه ماهه دوم بارداری

آلفا فیتو پروتئین توسط جنین در اوایل بارداری تولید می‌شود و در سرم مادر باردار قابل شناسایی است. هنگامی که آن در سرم جنین به پیک غلظت می‌رسد به داخل گردش خون مادر وارد می‌شود و می‌توان آن را در سراسر طول بارداری در سرم مادر شناسایی کرد. (۲۰)

در سال ۱۹۷۰، آلفا فیتو پروتئین سرمی (MSAFP[1]) به عنوان یک ابزار غربالگری برای نقص لوله عصبی معرفی شد. مدت کوتاهی بعد، میزان پایین MSAFP در سه ماهه دوم بارداری در جنین‌هایی با سندروم داون تشخیص داده شد. (۲۱)

در همان سال‌ها رابطه بین میزان بالای HCG و میزان پایین استریول آزاد در خون مادر با وجود سندرم داون در جنین مشخص شد و در سال ۱۹۸۸ آزمایش Triple Marker برای ارزیابی خطر سندرم داون و تریزومی ۱۸ و اختلال لوله‌ی عصبی در جنین ۱۴ تا ۲۲ هفته معرفی گردید. (۲۲)

درسال ۱۹۹۰ ارزش اندازه‌گیری مارکر inhibin A درخون مادر به تست تریپل مارکـر اضافه شد و این تست کوادمارکر (چهارگانه) نـام گرفت که نرخ تشخیص از ۶۹ درصد در تریپل مارکر به ۷۷ درصد رسید. در سندرم داون مقدار hCG و Inhibin بالاتر و مقدار AFP و uE3 کمتر از معمول است.(۲۳) از جدیدترین مارکرهایی که در سه ماهۀ دوم بارداری برای غربالگری سندرم داون کشف شده، مارکری به نام Invasive Trophoblast Antigen است.

اهمیت و ارزش این مارکر برای غربالگری سندرم داون اولین بار در سال ۱۹۹۹ توسط دکتر کول و همکارانش به اثبات رسید و از آن پس مطالعات کلینیکی بسیاری توسط سایر دانشمندان در نقاط مختلف دنیا در راستای اثبات کارآمد بودن این مارکر برای غربالگری سندرم داون صورت پذیرفت.

تمـامی مطالعات مـورد اشاره مؤید این نکته بودند که اضافه کردن مارکر

1. Maternal Serum Alpha.Fetoprotein

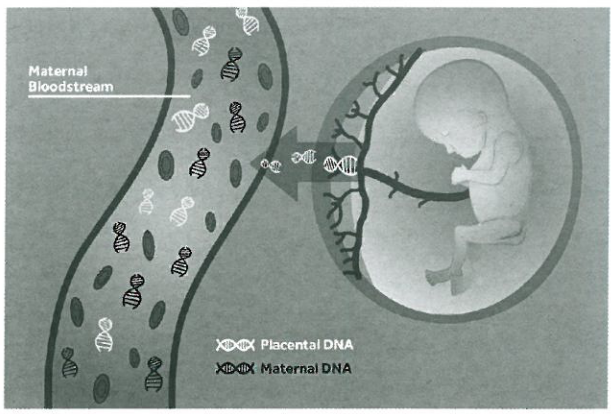
ITA به تست کوآد مارکر به میزان ۶ تا ۷٪ نرخ تشخیص سندرم داون را افزایش می‌دهد و بر این مبنا سرانجام در اواخر ۲۰۰۶ این مارکر به صورت رسمی به تست کوآد مارکر اضافه شد و تست جدید، پنتا مارکر یا پنتااسکرین نام گرفت. تست پنتا مارکر شامل اندازه‌گیری AFP، hCG، استریول آزاد Inhibin A، (uE3) و ITA است. نرخ تشخیص پنتا مارکر برای سندرم داون بیشترین نرخ تشخیص در میان تمام پروتکل‌های غربالگری سه ماههٔ دوم بوده و برابر با ۸۴٪ است. (۲۴)

تست Cell Free Fetal DNA یا Noninvasive Prenatal Testing

از دهه‌های گذشته تلاش برای شناسایی مواد ژنتیکی جنین در خون مادر شروع شد و برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ شرح داده شد. (۲۵) تلاش برای جداسازی و تخلیص سلول جنینی دست نخورده از خون مادر در نهایت؛ بخشی بخاطر کمیاب بودن سلول‌های جنینی و بخشی بخاطر تداوم وجود سلول‌های جنینی بارداری‌های قبلی برای تست‌های قبل از تولد بی نتیجه ماند. (۲۶) در سال ۱۹۹۷، DNA آزاد از سلول‌های جنینی در خون مادر کشف شد و در سال ۲۰۱۱ تست noninvasive prenatal testing به امور بالینی معرفی شد. (۲۷)

Cell Free Fetal DNA در هفته ده بارداری در خون مادر ظاهر شده و بلافاصله بعد از تولد از گردش خون وی پاک می‌شود، طوری که ۲ ساعت پس از زایمان دیگر در خون مادر قابل تشخیص نمی‌باشد. (۲۸)

تست cffDNA تشخیصی نبوده و جایگزین CVS[2] و آمنیوسنتز نمی‌باشد. NIPT در مقایسه با سایر تست‌های غربالگری آنوپلوئیدی جنین دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشد. قدرت تشخیص این تست برای تریزومی ۲۱، ۹۸٪ است. (۲۹)



شکل ۴: ورود DNA آزاد جنین به خون مادر

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، سندروم داون یک نقص مادرزادی با هزینه‌های بالای پزشکی و اجتماعی است که در حال حاضر هیچ دارویی برای درمان آن وجود ندارد. بنابراین غربالگری برای تمام زنان باردار لازم و ضروری می‌باشد. در طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی شامل اندازه‌گیری مارکرهای شیمیایی و پارامترهای سونوگرافی و همچنین ترکیب این دو با هم، برای غربالگری سندرم داون ابداع شده است، اما به علت اشکالات موجود در این روش‌ها، دانشمندان همیشه به دنبال یافتن روش‌هایی بهتر بودند؛ تا اینکه در سال ۲۰۱۱، NIPT به امور بالینی معرفی شد. تست NIPT نسبت به سایر تست‌های غربالگری مزایایی از جمله نتایج مثبت کاذب کمتر، قدرت تشخیص بالاتر، عدم وجود احتمال سقط جنین، تشخیص زود هنگام بدلیل اینکه از هفته ده بارداری به بعد قابل انجام است و جواب دهی سریع می‌باشد.

احتمال مثبت کاذب این تست زیر یک درصد برای تریزومی‌های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ است و بدلیل تفکیک DNA آزاد موجود در گردش خون مادری با منشاء جنینی (cffDNA[3]) از DNA آزاد با منشاء مادری (cfmDNA) که در این روش انجام می‌گیرد، قدرت تشخیص به بالای ۹۹ درصد برای اختلالات کروموزوم‌های ۲۱، ۱۸ و ۱۳ می‌رسد، همچنین بر خلاف روش‌های تشخیصی تهاجمی، بدلیل آنکه این تست فقط بر روی خون مادر انجام می‌شود، خطر سقط جنین وجود ندارد. بنابراین تست‌های تشخیصی تهاجمی مثل CVS یا آمنیوسنتز بعد از نتیجه مثبت تست غربالگری آنوپلوئیدی cffDNA پیشنهاد می‌شود. در پایان یادآور می‌شویم که این تست فقط یک تست غربالگری با قدرت تشخیصی بالا بوده و هیچگاه نمی‌تواند جایگزینی برای تست‌های تشخیصی شود.

2. Chronic Villus Sampling
3. Cell free maternal DNA

Reference:
1. Rasnick D. The aneuploidy theory of cancer and the barriers to its acceptance.
2. Kazemi M, Salehi M, Kheirollahi M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2016;5(3):125.
3. Chakravarty A, Chakravarty S. Chromosome structural variants: Impact on cytogenetic diagnosis and genetic medicine. Journal of Prenatal Diagnosis and Therapy. 2010 Jan 1;1(1):5.
4. Eiben B, Glaubitz R. First-trimester screening: an overview. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2005 Mar 1;53(3):281-3.
5. Benacerraf BR, Barss VA, Laboda LA. A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome. American journal of obstetrics and gynecology. 1985 Apr 15;151(8):1078-9.
6. Kazemi M, Salehi M, Kheirollahi M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2016;5(3):125.
7. Wild Schut ,Weiner, Peters. When to screen and gynecology 1 and 2. 1st Ed. e Andishe pub; 2011.
8. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. International journal of women's health. 2015;7:113.
9. Savva GM, Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Maternal age?specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. Prenatal diagnosis. 2006 Jun 1;26(6):499-504.
10. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. Human genetics. 2009 Feb 1;125(1):41-52.
11. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. Prenatal diagnosis. 2015 Oct 1;35(10):972-9.
12. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. Prenatal diagnosis. 2015 Oct 1;35(10):972-9.
13. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. Bmj. 1992 Apr 4;304(6831):867-9.
14. GhRitlahaRey RK. Management of giant cystic lymphangioma in an infant. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2013 Aug;7(8):1755.
15. Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR. First-trimester septated cystic hygroma: prevalence, natural history, and pediatric outcome. Obstetrics & Gynecology. 2005 Aug 1;106(2):288-94.
16. Schuchter K, Hafner E, Stangl G, Metzenbauer M, H?finger D, Philipp K. The first trimester 'combined test'for the detection of Down syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies. Prenatal diagnosis. 2002 Mar 1;22(3):211-5.
17. Wald NJ, Hackshaw AK. Combining Ultrasound and Biochemistry in First?Trimester Screening for Down's syndrome. Prenatal diagnosis. 1997 Sep 1;17(9):821
18. Sung KU, Roh JA, Eoh KJ, Kim EH. Maternal serum placental growth factor and pregnancy-associated plasma protein A measured in the first trimester as parameters of subsequent pre-eclampsia and small-for-gestational-age infants: A prospective observational study. Obstetrics & Gynecology Science. 2017 Mar 1;60(2):154-62.
19. Torring N. First trimester combined screening-focus on early biochemistry. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2016 Aug 17;76(6):435-47.
20. Aslan D, Karabacak RO, Aslan OD. Maternal serum alpha?fetoprotein levels are normal in Fanconi anemia: Can it be a lack of postnatal inhibition of AFP gene resulting in the elevation?. Pediatric blood & cancer. 2017 Apr 1;64(4).
21. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum ?-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. American journal of obstetrics and gynecology. 1984 Apr 1;148(7):886-94.
22. Canick JA, MacRae AR. Second trimester serum markers. InSeminars in perinatology 2005 Aug 31 (Vol. 29, No. 4, pp. 203-208). WB Saunders.
23. Renier MA, Vereecken A, Van Herck E, Straetmans D, Ramaekers P, Buytaert P. Second trimester maternal dimeric inhibin-A in the multiple-marker screening test for Down's syndrome. Human Reproduction. 1998 Mar 1;13(3):744-8.
24. Palomaki GE, Knight GJ, Roberson MM, Cunningham GC, Lee JE, Strom CM, Pandian R. Invasive trophoblast antigen (hyperglycosylated human chorionic gonadotropin) in second-trimester maternal urine as a marker for Down syndrome: preliminary results of an observational study on fresh samples. Clinical chemistry. 2004 Jan 1;50(1):182-9.
25. Walknowska J, Conte F, Grumbach M. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. The Lancet. 1969 Jun 7;293(7606):1119
26. Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. The Lancet. 1997 Aug 16;350(9076):485-7.
27. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350:485-7.
28. Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. InSeminars in perinatology 2016 Feb 29 (Vol. 40, No. 1, pp. 35-43). WB Saunders.
29. O'leary P, Maxwell S, Sinosich M, DeVoss K, Fletcher J, Ranieri E, Metz MP. Screening for Down syndrome in the second trimester of pregnancy. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2016 Feb 1;56(1):19-21.