

AMNİYOSENTEZ İLE FETAL KARYOTİP TAYİNİ: 610 OLGUMUZUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fetal Karyotyping with Amniocentesis: Analysis of 610 Cases

Dr. ALİN BAŞGÜL, Dr. Zehra Kavak, Dr. Esra Uyar

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Fetal Maternal Tıp Ünitesi

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı kliniğimizde uygulanan amniyosentez vakalarımızı gözden geçirmek, amniyosentez endikasyonlarımızı, amniyosentezdeki başarı oranlarımızı ve sonuçlarımızı değerlendirmektir.

Materyal ve Metod: Son 4 yıl boyunca amniyosentez yaptığımız 610 olgunun kayıtları retrospektif olarak tarandı. Hastaların karakteristik özellikleri, amniyosentez endikasyonları, amniyosentez komplikasyonları, fetal karyotip sonuçları ve bu gebeliklerin sonuçları araştırıldı.

Bulgular: Gerçekleştirilen 610 amniyosentezden 606'sında doku kültürü başarılı oldu (%99.34). Kromozomal anomali sıklığı %3.5 (21/606) olarak bulundu. En Sık amniyosentez endikasyonlarımız; Üçlü testte yüksek risk saptanması, İlerlemiş anne yaşı ve ultrasonografide saptanan fetal anomali veya belirteçler olarak bulundu. İşleme bağlı düşük 1 hastada meydana geldi (%0.16). Anormal karyotipli 21 fetusun 13 tanesi sonlandırıldı, 4 tanesinde üçüncü trimesterde in utero ex fetus saptandı, birinde neonatal ölüm meydana geldi, bir hastada düşük oldu, 2 hastanın bebeğinde sağlıklı olarak doğdu.

Sonuç: Amniyosentez güvenilir bir karyotipleme aracı olup amniyosentez sonrası düşük riski oldukça azdır. Ultrasonografide saptanan anomali vakalarına ve tarama testleri yüksek gelen hastalara fetal karyotipleme önerilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Amniyosentez, fetal karyotipleme, gebelik sonuçları.

ABSTRACT

Objective: The aim of our study was to review and analyse the data of the patients who underwent amniocentesis in our clinic.

Materials and Methods: During the last 4 years, the records of 610 cases who had amniocentesis were reviewed. The characteristic findings of the patients recorded. We assessed our indications, results and success rate for amniocentesis. The outcome of these pregnancies were also searched retrospectively.

Results: The culture results were successful in 604 out of 610 cases (99.3%). The most common indications were raised risk of Down's syndrome and other trisomies in the triple testing, advanced maternal age and pathological ultrasonographic findings. The frequency of fetal abnormal karyotypes were 3.5% (21/604 cases). Procedure related pregnancy loss happened in 1 patient (1/610, 0.16%). While, 13 of 21 cases with chromosomal abnormality were electively terminated, 4 of them died in utero, 1 died in the neonatal period, 1 had abortion and 2 of them were born healthy.

Conclusion: amniocentesis is a safe and reliable diagnostic procedure for second-trimester high-risk pregnancies when performed by an experienced team. Fetal karyotyping must be recommended to the patients who had fetal abnormality detected by ultrasound and to the patients with high risk in the triple testing.

Key words: Amniocentesis, fetal karyotyping, pregnancy outcome.

Giriş:

Amniosentez kromozom kültür tekniklerinin geliştirilmesinin ardından 1960'lı yıllarda yapılmaya başlanmışsa da, prenatal tanıda yaygın klinik kullanıma ultrasonografiyle beraber 1970 ve 1980 li yıllarda girmiştir (1,2). Günümüzde kullanılan girişimsel prenatal tanı teknikleri, amniyosentez (AS), kordosentez (KS) ve koryonik villüs örnekleme (KVÖ) yöntemleridir (3). AS, hamileliğin 15. haftasından itibaren fetal karyotipleme için uygulanan en yaygın invaziv tekniktir (4). Bu çalışmada 2002 ve 2006 yılları arasında kliniğimizde amniyosentezle karyotip tayini yapılan vakaların analizi yapıldı.

Materyal ve Metod:

Marmara Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Fetal Maternal Tıp Ünitesi bölümünde 2002-2006 yılları arasında yapılan amniyosentezlerin kayıtları retrospektif olarak tarandı. Hastalara ait bilgilerin taranmasında ünitemizde kullanmakta olduğumuz Astraia Fetal Tıp programından (GmbH, Almanya) yararlanıldı. Gebelik sonuçları hasta dosyalarından veya hastalara telefonla ulaşılarak elde edildi.

Tüm olgulara ve eşlerine amniyosentez öncesinde işlemin tekniği ve olası komplikasyonları hakkında sözlü ve yazılı bilgi verildi. Danışmanlık sonrası amniyosentezi kabul eden çiftlere işlem öncesinde yazılı onay formu imzalatıldı. Girişimlerde Voluson 730 Expert (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) ultrason cihazı ve 3.5MHz transabdominal convex prob kullanıldı. Tüm vakalarda amniyosentez işlemine sistematik detaylı ultrasonografi değerlendirmesini takiben geçildi. İşlemden 22 Gauge, hiperekojen iğne kullanıldı. İşlem amniyosentez kurallarına uygun olarak ve hafta başına 1 cc amniyon sıvısı alınarak yapıldı. Alınan materyaller genetik tanı merkezinde incelendi. Tüm olgularda kromozomlardaki sayısal ve yapısal düzensizliklerin değerlendirilmesi amacı ile en az 20 metafaz plağı görüntü analiz sistemi kullanılarak incelendi. Tüm hastalara amniyosentez sonuçları danışmanlık hizmeti verilerek açıklandı. Hastaların karakteristik özellikleri, işlemin yapıldığı gestasyonel hafta, amniyosentez endikasyonları, fetal karyotip sonuçları, amniyosentez yapılan hastaların gebelik sonuçları tarandı.

Bulgular:

Amniyosentez ile karyotipleme serimizde, 610 hastadan sadece 4 vakada üreme olmadığından karyotip sonucu verebilme oranımız (%99.4) olarak bulundu. Çalışma grubunun demografik ve temel özellikleri tablo 1 de belirtilmiştir.

Tablo1. Çalışma grubunun demografik ve temel özellikleri

Yaş (median)	30.0 (18-44)
Paternal yaş (median)	34 (25-51)
Kilo, kg (median)	61.0 (49-85)
Nulliparite sayısı (N)	220 (%36)
Amniyosentezinyapıldığı gestasyonel hafta	18 (16-25)
Yapısal kromozom anomalisi	5 (%0.8)
Sayısal kromozom anomalisi sonucu	16(2.64)
Normal karyotipli kız bebeklerin sayısı	300(%50)
Normal karyotipli erkek bebeklerin sayısı	285(%47)

Karyotip anomalisi saptanan hiçbir vakada ileri paternal yaş izlenmedi. Amniyosentez yapılan haftalar 16 ile 25. gebelik haftaları arasındaydı. Kromozomal anomali sıklığı %3.5 (21/606) olarak bulundu. Bunlardan sayısal kromozom bozukluklarının sıklığı % 2.64 (16/21 anormal karyotipli olgu), yapısal kromozom bozuklukların sıklığı ise % 0,8 (5/21 anormal karyotipli olgu) olarak belirlenmiştir. Tablo 2 de amniyosentez endikasyonlarımız ve sayıları yüzdeleri ile birlikte verildi.

Tablo2. Amniyosentez endikasyonları

Üçlü testte yüksek risk saptanması	267 (%44)
İlerlemiş anne yaşı	218(%36)
Ultrasonografide izlenen fetal anomali/ anomaliler	50(%8)
11-14 hafta testi yüksek bulunup CVS istemeyen hastalar	31 (5%)
Ağır İntrauterin gelişme geriliği	12 (%2)
Akraba evliliği	8 (%1)
Maternal anksiyete	6(%1)
Daha önce kromozom anomalisi olan bebek öyküsü	12(%2)
CVS sonucunda mozaizm saptanması	3(%0.5)
Toksoplazma Ig M sonucu+olan ve PCR la mikroorganizma bakılan hastalar	3(%0.5)

Amniyosentez endikasyonları içinde en sık sebep üçlü testte yüksek risk saptanmasıydı. 30 hastada üçlü testte yüksek risk ek olarak yaş riskide mevcuttu. Bu 30 hastanın birinde anomali saptandı. Üçlü testte yüksek risk saptandığı için yapılan 267 amniyosentezden 6 (%2.3) olguda karyotip anomalisine rastlandı. Sadece ileri yaş sebebiyle yapılan 218 amniyosentez olgusundan bir (%0.46)tanesinde kromozom anomalisi saptandı. Ultrasonografide fetal anomali izlenen ve amniyosentezi kabul eden 50 hasta içinde 7 (%25) hastada kromozom anomalisi tespit edildi. İlk trimester tarama testinde yüksek risk saptanıp KVÖ istemeyen 31 hastanın 4 (%13)ünde fetal kromozom anomalisi saptanırken diğer sebeplerle amniyosentez yapılan 46 hastalardan 3 (%6.5) tanesinde kromozom anomalisine rastlandı. Tablo3'te kromozom anomalisi tespit edilen 21 olgu prognozları ile birlikte verildi. Sayısal kromozom bozukluklarından trizomi 21 en sık gözlenen anomali olarak bulunurken (7/21 olgu), 5 olgu ile seks kromozom anöploidileri (4 olgu,45XO ve1 olgu 47XXY) ikinci sırayı almıştır. Yapısal kromozom anomalilerinde ise 2 olguda delesyon, 1 olguda marker

kromozom,1 olguda inversiyon ve 1 olguda da translokasyon saptanmıştır.

Tablo3. Amniyosentez sonucu kromozom anomalisi saptanan olgular ve gebelik sonuçları

Anormal Karyotip bulguları	Sayı:21 (%3.5)	Gebelik Sonucu
47, XX+21 (Regüler tipte Down Sendromu)	7	6 olgu elektif terminasyon 1 olgu düşük
45XO ,Turner sendromu	4	2 in utero ex fetus, 2 elektif terminasyon
47xy trizomi 4	1	Elektif terminasyon
trizomi 18	1	Elektif terminasyon
Triploidy (digynic,69XXY)	1	İn utero ex
45XX,robt(13;15)pat	1	Elektif terminasyon
22qdel (Digeorge Sendromu)	1	Neonatal ölüm
46xx4pdel (Wolf Hirsprung sendromu)	1	Elektif terminasyon
47,XY, +13	1	İn utero ex
47,XY+mar Marker kromozom	1	Canlı doğum
47,XXY,	1	Elektif terminasyon
46,XX,inv(8)(p21;q22), Inversiyon	1	Canlı Doğum

Amniyosentezden sonraki bir ay içinde 610 hastadan 3'ünde düşük meydana geldiği saptandı (%0.49). Ancak bu hastalardan birinde Down sendromu saptanırken diğer hastada uterin myom mevcuttu. Bir olguda da kromozom anomalisi veya belirgin başka risk faktörü yoktu. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında işleme bağlı düşük riskinin sadece %0.16 (1/610) olduğunu görmekteyiz.

Gebelik sonuçları, gebelik terminasyonu, spontan düşük, in utero ex fetus, neonatal ölüm ve perinatal sağkalım olarak değerlendirildi. Anormal karyotipli 21 fetusun 13 tanesi sonlandırıldı, 4 tanesinde üçüncü trimesterde in utero ex fetus saptandı, birinde neonatal ölüm meydana geldi, bir hastada ise amniyosentezden 2 hafta sonra düşük meydana geldi. 2 hastanın bebeğinde sağlıklı olarak doğdu. Tüm vakaların 456 'sına ulaşılabildi. Buna göre 13 olgu sonlandırıldı, 6 hastada (bunlardan 4 olgu kromozom anomalili ve ikisi ağır intrauterin gelişme geriliği olan olgulardı) in utero ex fetus izlendi, 6 olguda neonatal dönemde ölüm meydana geldi (Bunlardan bir tanesi kromozom anomalisi saptanan Di George sendromlu bir hastayı diğer hastalarda ultrasonda major anomali tespit edilen olgulardı. Neonatal dönemde yaşamayan bebeklerin ailelerine prenatal danışmanlık hizmeti verildiği sırada bu bebeklerin yüksek mortalite oranları aileye anlatılmış fakat aileler gebeliğin sonlandırılmasını dini nedenlerden kabul etmemişlerdi. Geri kalan 431 olguda perinatal sağ kalım mevcuttu.

Tartışma :

Genetik amniyosentez , fetal anomalilerin prenatal tanısında 1967 yılından beri kullanılmaktadır (2). Mid trimester amniyosentezinin anne ve fetus için güvenilirliği birçok, çok merkezli çalışmalarla kanıtlanmıştır (5,6).

Gebelikte ilerlemiş anne yaşı genetik amniosentezde ilk başlarda en sık endikasyonken daha sonradan klinik uygulamaya birçok değişik endikasyonda girmiştir. Örneğin; anormal serum tarama test sonuçları ve ultrasonografi ile tespit edilen yapısal fetal anomaliler . Ancak yinede son 30 yılda amniosentez için en sık endikasyon gebelikte ileri anne yaşı olmuştur (1,7,8). Daha önceki yıllarda ailede veya daha önceki bebekte kromozom anomalisi veya yapısal fetal anomalilerin olması birçok kişinin amniosentez kararı almasını sağladığıysada günümüzde gittikçe ilerleyen ultrasonografik özellikler ve üst düzey ultrasonografiye duyulan güvenin artmasıyla bu endikasyonda artık eski popülerliğini koruyamamıştır (9). Yine ultrasonografi ile fetal anomalilerin daha fazla tespit edilebilmesi ve fetal anomalilerle kromozom bozuklukları arasındaki yakın ilişkide bilindikçe ultrasonda gözlenen anomali daha çok amniosentez sebebi olur hale gelmiştir (10). İlerlemiş paternal yaş, tekrarlayan düşük hikayesi, koryon villus örneklemeinde mozaizim, anne veya babada translokasyon taşıyıcılığı gibi endikasyonlar ise amniosentez tercihleri arasında daha az yer kaplamaktadırlar (1,9,10). Bizim vakalarımızın analizinde ilerlemiş anne yaşı üçlü tette yüksek risk saptanması endikasyonunun ardından ikinci sırada yer almıştır. Yazıcıoğlu ve ark. 327 amniosentez olgularından en sık endikasyonu bizim çalışmamızda olduğu gibi üçlü testte yüksek risk olarak bulmuşlardır (11). Kültür sonuçlarında elde ettiğimiz başarı ülkemizdeki diğer araştırmacıların sonuçları ile örtüşmektedir (11,12,13).

Kromozom anomalisi oranımız (%3.5) olup, Güven ve ark, Yayla ve ark, Başaran ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur (13,14,15). Yine Kromberg ve ark. Bu oranı 4554 vakada %3.2 olarak bildirmişlerdir (7). Oysaki Yazıcıoğlu ve ark. yaptıkları amniosentezlerdeki kromozom anomalisi oranını %5.8 olarak bulmuşlardır (11). Alper ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında yaptıkları 2405 prenatal girişimsel işlem sonucunda anormal fetal karyotiplerinin sıklığını % 2.95 (71/2.405 olgu) olarak bulmuşlardır. Aynı seride sayısal kromozom bozukluklarının sıklığı % 1.87 (45/71 anormal karyotipli olgu), yapısal kromozom bozukluklarının sıklığı ise % 1.08 (26/71 anormal karyotipli olgu) olarak belirlenmiştir (16). Bizim olgularımızdaki anormal fetal karyotip sıklığı bu çalışmayla uyumlu bulunmuşsada bizim olgularımızda sayısal karyotip anomalisi yapısal anomalilerin (%0,8) 3 katı fazla oranında bulunmuştur (%2.64). Literatürde ultrasonografide fetal anomalisi tespiti sonrasında yapılan amniosentezlerdeki kromozom anomalisi riski %8 ile %27 olarak belirtilmiştir. Buna göre bizim oranımız (%25) literatürle uyumlu bulunmuştur (1,9,17). Taner ve arkadaşları ileri yaş sebebi ile yaptıkları amniosentez sonucunda Down sendromu riskini %1.11 ve kromozom anomalisi oranını ise %5.84 olarak bulmuşlardır (18). Bizim hasta grubumuzda yalnızca ileri yaş sebebi ile yapılan amniosentez olgularından sadece birinde Trizomi 21 sendromuna rastlanılmıştı. Güven ve arkadaşları ilerlemiş anne yaşı sebebiyle yaptıkları 49 vakanın hiçbirinde kromozom anomalisine rastlamamıştır. Bu durumu vaka sayısının azlığı ile

açıklamışlardır (13). Horger EO ve arkadaşları 2001 yılında 4600 amniosentez olgusunu bildirdi. Onların sonuçlarına göre başarılı amniyotik sıvı aspirasyonu operatör tecrübesi ile ilgili iken işlemi yapan doktorun tecrübesi gebelik sonuçlarını değerlendirmede önemli bulunmadı (9). Bizim olgularımızda yalnızca bu konuda çok tecrübeli iki operatör tarafından yapıldı. Düşük riskimizin azlığı ve karyotip verebilme başarımızın yüksekliği tecrübeli operatörlerle yüksek başarı oranını yakalayabilmenin mümkün olduğunu göstermekle beraber, bu konuda çok fazla tecrübesi olmayan operatör faktörünün analizini yapmamızı engelledi.

Giorlandino ve arkadaşları tek operatörle yapılan 4564 vakada % 0.16 oranında düşük vakası rapor etmişlerdir (19). Bu çalışmada yapılan amniosentezlerin neredeyse tamamına yakın kısmı yüksek riskli gruba yapılmış olmasına rağmen (ilerlemiş anne yaşı, anormal serum sonuçları, ailede anomalisi hikayesi, ultrasonografide fetal anomalisi saptanması vb.) gebelik kaybı oldukça düşüktür (3/610) İşleme bağlı düşük oranımız ise sadece %0.16 olarak bulunmuştu. Amniosentezin yapıldığı ilk yıllarda amniosentezle fetal kayıp oranı %4 lerdeyken günümüzde bu oran %0.2 ile %2 oranında değişmektedir (1,9,219). Fetal kayıp oranlarının düşmesinde eş zamanlı modern ultrason cihazlarının üretilmesi, gittikçe artan amniosentez endikasyonları, artan hasta talebi ve kazanılmış tecrübenin yer aldığı düşünülmektedir(20). Amniosentez tecrübesi arttıkça ve ultrason teknolojisinin inanılmaz bir hızla ilerlemesiyle bu işlemin daha kolay ve güvenilir olması beklenen bir sonuçtur (20,21). Leschot ve arkadaşları operatör tecrübesi ile fetal ölüm veya düşük riskinin önemli ölçüde düştüğünü belirtmişlerdir (22). Bununla beraber Martin ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında bu konuda önemli bir fark gözlemlememişlerdir (23). Deneyimli bir ekip tarafından gerçekleştirildiğinde amniosentezin, yüksek risk taşıyan gebeliklerde rahatlıkla uygulanabilen, düşük riski oldukça az, güvenilir bir prenatal tanı yöntemi olduğu kanısına varılmıştır. Ultrasonografide saptanan anomalisi vakalarına ve tarama testleri yüksek gelen hastalara fetal karyotipleme önerilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986; 7;(1):1287-93.
- 2- Jacobson CB, Barter RH. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol* 1967;99:796-807.
- 3- d'Ercole C, Shojai R, Desbriere R, Chau C, Bretelle F, Piechon L et al. Prenatal screening: invasive diagnostic approaches. *Childs Nerv Syst* 2003;19(7-8):444-7.
- 4- Blackwell SC, Abundis MG, Nehra PC. Five-year experience with midtrimester amniocentesis performed by a single group of obstetrician-gynecologists at a community hospital. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:130-2.
- 5- Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis: How safe? *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:608-16.
- 6- Sant-Cassia LJ, MacPherson MB, Tyack AJ. Midtrimester amniocentesis: is it safe? A single centre controlled prospective study of 517 consecutive amniocenteses. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91(8):736-44.
- 7- Kromberg JG, Bernstein R, Jacobson MJ, Rosendorff J, Jenkins T. A decade of mid-trimester amniocentesis in Johannesburg. Prenatal diagnosis, problems and counselling. *S Afr Med J* 1989;76(7):344-9.
- 8- Bell JA, Ansford AJ. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: analysis of 1000 consecutive amniotic fluids. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1981;21(4):207-10.
- 9- Horger EO 3rd, Finch H, Vincent VA. A single physician's experience with four thousand six hundred genetic amniocenteses. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(2):279-88.
- 10- Hanson FW, Tennant FR, Zorn EM, Samuels S. Analysis of 2136 genetic amniocenteses: experience of a single physician. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:436-43.
- 11- Yazıcıoğlu HF, Dülger Ö, Çankaya A, Özyurt O, Aygün N, Çebi M ve Ark. Süha Süleymaniye Doğumevindeki prenatal invazif girişimlerin komplikasyon hızı, verim ve maliyet açısından analizi. *Perinatoloji Dergisi* 2004;12(3):128-134.
- 12- Tekşen F, Koç A. Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Prenatal Tanı Laboratuvarında ilk uygulanan amniyosentez vakaları. *Journal of Ankara Medical School* 2000;22(3):159-161.
- 13- Güven MA, Ceylaner S. Amniyosentez ve kordeosentez ile prenatal tanı: 181 olgunun değerlendirilmesi. *Perinatoloji Dergisi*;2002;10(2):25-30.
- 14- Yayla M, Bayhan G, Yalınkaya A, Alp N. Amniyosentez ve kordosentez ile fetal karyotip tayini: 250 olguda sonuçlar. *Perinatoloji Dergisi* 1999;7:255-8.
- 15- Başaran S, Karaman B, Aydın K, Yüksel A. Amniyotik sıvı, trofoblast dokusu ve fetal kan örneğinde sitogenetik incelemeler: 527 olguluk seri sonuçları. *Jinekoloji Obstetrik Dergisi* 1992;6:81-9.
- 16- Alper Ö, Çalışkan M, Nal Ö, Yakut N, Şimşek S, Mendilcioğlu M ve ark. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin prenatal tanı sitogenetik sonuçları *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi* 2005;19(1):10-16.
- 17- Balcı O, Gezginç K, Acar A, Akyürek C. Prenatal ultrasonografi taramasında fetal anomali saptanan gebelerde amniyosentez sonuçlarının değerlendirilmesi. *Kadın Doğum Dergisi* 2004;3(2):438-442.
- 18- Taner CE, Altınbaşoğlu FH, Özkirişiçi FS, İmren A, Büyüktosun C, Özgenç Y ve ark. İleri maternal yaş gebeliklerinde amniyosentez sonuçları. *Perinatoloji Dergisi* 2002;4:336-9.
- 19- Giorlandino C, Mobili L, Bilancioni E, D'Alessio P, Carcioppolo O, Gentili P, et al. Transplacental amniocentesis: Is it really a higher-risk procedure? *Prenat Diagn* 1994;9:803-6.
- 20- Caughey AB, Lyell DJ, Washington AE, Filly RA, Norton ME. Ultrasound screening of fetuses at increased risk for Down syndrome: how many missed diagnoses? *Prenat Diagn.* 2006;26(1):22-7.
- 21- Welch RA, Salem-Elgharib S, Wiktor AE, Van Dyke DL, Blessed WB. Operator experience and sample quality in genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(1):189-91.
- 22- Leschot NJ, Verjaal M, Treffers PE. Risks of midtrimester amniocentesis: assessment in 3000 pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:804-7.
- 23- Marthin T, Liedgren S, Hammar M. Transplacental needle passage and other risk factors associated with second trimester amniocentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:728 - 32.