

Evaluación de la proteína A plasmática asociada al embarazo como marcador único durante el primer trimestre

Roberto Salazar López,* Ana Lidia Ibarra Gallardo,** Manuel Iduma Meléndrez,*** Rosario Leyva Bojórquez****

Nivel de evidencia: I

RESUMEN

Antecedentes: uno de los principales objetivos del diagnóstico prenatal es detectar el síndrome de Down. La combinación de marcadores bioquímicos y sonográficos es eficaz. La utilización de un solo marcador no ha demostrado la misma eficacia, aunque no se ha evaluado lo suficiente.

Objetivo: mostrar los resultados de la proteína A plasmática asociada al embarazo, en el primer trimestre, como marcador único.

Materiales y métodos: estudio prospectivo, transversal y aleatorizado en el que se evaluaron 400 pacientes con el marcador bioquímico proteína A plasmática asociada al embarazo durante el primer trimestre del embarazo.

Resultados: el marcador detectó un (0.3%) caso verdadero positivo, 28 (7.0%) falsos positivos y 371 (92.8%) verdaderos negativos; no se registraron falsos negativos. Entre las semanas 9 a 11 la tasa de falsos positivos fluctuó de 5.5 a 6.7%, y en la 13 aumentó hasta 18.2%. La proteína A plasmática asociada al embarazo tuvo especificidad de 95.1% (semanas 9 a 12) y edad materna de 82.2%.

Discusión: en los marcadores para diagnóstico prenatal 5% de falsos positivos se considera un parámetro aceptable. La proteína A plasmática asociada al embarazo es poco discriminatoria durante la semana 10 de gestación. Entre las semanas 9 a 11 los falsos positivos variaron de 6 a 7%, y se elevaron en la semana 13. Los marcadores con baja tasa de falsos positivos estimulan la utilización del tamizaje neonatal.

Conclusiones: durante el primer trimestre del embarazo se recomienda la combinación de marcadores bioquímicos (fracción libre de β -hGC y PAPP-A) y sonográficos, por su baja tasa de falsos positivos. La proteína A plasmática asociada al embarazo, como marcador único, puede utilizarse entre las semanas 9 y 11 del embarazo, y los resultados falsos positivos deben someterse a estudio con marcadores combinados.

Palabras clave: proteína A plasmática asociada al embarazo, PAPP-A, primer trimestre, marcadores bioquímicos.

ABSTRACT

Background: One of main targets of prenatal diagnosis is Down's syndrome. Biochemical and sonographic markers together are efficient. The use of a single marker has not shown the same efficiency, although it has not been sufficient evaluated.

Objective: To shown results of PAPP-A as a single marker in first pregnancy trimester.

Materials and methods: Prospective, cross-sectional and random study, which evaluated 400 women with biochemical marker PAPP-A in the first pregnancy trimester.

Results: PAPP-A detected a true positive case (0.3%), 28 false positive cases (7.0%) and 371 true negative cases (92.8%), there were no false negative cases. Between 9 to 11 weeks, rate of false positives fluctuated between 5.5 and 6.7%, in 12th week it was 1.2% and in 13th week 18.2%. PAPP-A has 95.1% of specificity (weeks 9 to 12) and 82.2% of maternal age.

Discussion: A 5% of false positive rate is acceptable for prenatal diagnosis markers. It has been reported that PAPP-A is less discriminatory at 10 weeks of gestation. In this study the rate fluctuated between 6 and 7% (weeks 9 to 11), which increased at 13th week. Markers with low false positive rate stimulate the use of prenatal screening.

Conclusions: The use of combined markers: biochemical (free fraction of β -hGC, PAPP-A) and sonographic, are most recommendable in the first trimester of the pregnancy because of them low rate of false positives. PAPP-A can be used as a single marker between 9 to 11 weeks; false positive cases must be studied with combined markers.

Key words: PAPP-A, first trimester, biochemical markers.

RÉSUMÉ

Antécédents: l'un des objectifs principaux du diagnostic prénatal est celui de détecter le syndrome de Down. La combinaison de marqueurs biochimiques et sonographiques est efficace. L'emploi d'un marqueur unique n'a pas montré la même efficacité, pourtant il n'a pas été suffisamment évalué.

Objectif: montrer les résultats de la protéine A plasmatische liée à la grossesse, dans le premier trimestre, comme marqueur unique.

Matériel et méthodes: étude prospective, transversale et aléatoire dans laquelle on a évalué 400 patientes avec le marqueur biochimique

protéine A plasmatische liée à la grossesse pendant le premier trimestre de la grossesse.

Résultats: le marqueur a détecté un (0.3%) cas vrai positif, 28 (7.0%) faux positifs et 371 (92.8%) vrais négatifs, on n'a pas enregistré faux négatifs. Entre les semaines 9 à 11, le taux de faux positifs a changé de 5.5 à 6.7%, et dans la semaine 13 a augmenté jusqu'à 18.2%. La protéine A plasmatische liée à la grossesse a eu une spécificité de 95.1% (semaines 9 à 12) et âge maternel de 82.2%.

Discussion: dans les marqueurs pour diagnostic prénatal un 5% de faux positifs est considéré comme paramètre acceptable. La protéine A plasmatische liée à la grossesse est peu discriminatoire pendant la semaine 10 de gestation. Entre les semaines 9 à 11, les faux positifs ont varié de 6 à 7%, et ils ont augmenté dans la semaine 13. Les marqueurs avec un faible taux de faux positifs stimulent l'emploi du tamisage néonatal.

Conclusions: la combinaison de marqueurs biochimiques (fraction libre de β -hGC et PAPP-A) et sonographiques est recommandée dans le premier trimestre de la grossesse, par son faible taux de faux positifs. La protéine A plasmatische liée à la grossesse comme marqueur unique peut être utilisée entre les semaines 9 et 11 de la grossesse, et les résultats faux positifs doivent être soumis à étude avec marqueurs combinés.

Mots-clés: protéine A plasmatische liée à la grossesse, PAPP-A, premier trimestre, marqueurs biochimiques.

RESUMO

Antecedentes: Um dos principais objetivos do diagnóstico pré-natal é detectar a síndrome de Down. A combinação de marcadores bioquímicos e ultra-sonográficos são eficazes. A utilização de somente um marcador não demonstrou a mesma eficiência, mas também não foi avaliado o suficiente.

Objetivo: Mostrar os resultados da proteína A plasmática associada à gravidez no primeiro trimestre, como marcador único.

Materiais e Métodos: Estudo prospectivo, transversal e aleatório no qual se avaliaram 400 pacientes com o marcador bioquímico proteína A plasmática associada com a gravidez durante o primeiro trimestre de gestação.

Resultados: O marcador detectou um (0,3%) caso verdadeiro positivo, 28 (7,0%) falsos positivos e 371 (92,8%) verdadeiros negativo; não foram registrados falsos negativos. Entre as 9^a e 11^a semanas a taxa de falsos positivos flutuou de 5,5 a 6,7%, e na 13^a semanas aumentou até 18,2%. A proteína A plasmática associada com a gravidez teve especificidade de 95,1% (9^a a 12^a semanas) e idade materna de 82,2%.

Discussão: Nos marcadores para o diagnóstico pré-natal um 5% de falsos positivos foram considerados parâmetros aceitáveis. A proteína A plasmática associada com a gravidez é pouco discriminatória durante a 10^a semanas de gestação. Da 9^a a 11^a semanas de gestação os falsos positivos variaram de 6 a 7%, e se elevaram na 13^a semanas. Os marcadores com baixa taxa de falsos positivos estimulam a utilização de tamizaje neonatal.

Conclusões: A combinação de marcadores bioquímicos (fração livre de β -hGC e PAPP-A) e ultra-sonográficos recomenda-se no primeiro trimestre da gestação, por sua baixa de falsos positivos. A proteína A plasmática associada com a gravidez como marcador único, pode ser utilizada entre as 9^a e 11^a semanas de gravidez e os resultados falsos positivos devem se submeter a exames com marcadores combinados.

Palavras-chave: proteína A plasmática associada a gestação, PAPP-A, primeiro trimestre, marcadores bioquímicos.

El diagnóstico prenatal incluye todas las actividades dirigidas a detectar algún defecto congénito: anomalías del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular expresadas al nacimiento, aunque se manifieste tardíamente de forma externa o interna, familiar o esporádica, heredada o no, única o múltiple.¹

* Ginecobstetra, Centro Médico del Noroeste.

** Ginecobstetra, Hospital Integral de la Mujer.

*** Ginecobstetra, Hospital Ignacio Chávez.

**** Anestesiólogo, Hospital General del Estado.

Correspondencia: Dr. Roberto Salazar López. Torre Médica CIMA, Vado del Río, Hermosillo, Sonora, México. CP. 83078. Tel.: (01-6622)171767. E-mail: drsalazar@hotmail.com

Recibido: julio, 2008. Aceptado: agosto, 2008.

Este artículo debe citarse como: Salazar LR, Ibarra GAL, Iduma MM, Leyva BR. Evaluación de la proteína A plasmática asociada al embarazo como marcador único en el primer trimestre. Ginecol Obstet Mex 2008;76(10):576-81.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

La trisomía 21 o síndrome de Down es uno de los objetivos prioritarios en el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales, pues es la aneuploidía más frecuente en los recién nacidos.¹

Desde el punto de vista histórico, la edad materna (35 años o más) es un factor de riesgo de tener un hijo con síndrome de Down. En estas mujeres se ha proporcionado el diagnóstico genético por amniocentesis o biopsia de las vellosidades coriónicas.^{2,3}

En el decenio pasado se desarrollaron diferentes estrategias para el tamizaje del síndrome de Down (marcadores bioquímicos y ecográficos) que, junto con la edad materna, conducen a su detección y cuya tasa de falsos positivos es baja.³

Los marcadores bioquímicos en suero materno, como la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) y la fracción β de gonadotropina coriónica humana libre (β -hCG libre), son efectivos para el tamizaje durante el primer trimestre.¹⁻³

La concentración promedio de β -hCG libre, en mujeres embarazadas con feto con síndrome de Down, aumenta a 1.98 múltiplos de la mediana durante el primer trimestre, y la de PAPP-A, una glucoproteína semejante a la hCG producida por el trofoblasto, disminuye en casi 0.43 múltiplos de la mediana.³

Cuando sólo se utiliza PAPP-A la sensibilidad es de 40%, lo que indica baja tasa de detección, con 5% de falsos positivos. La mejor estrategia consiste en la integración de los resultados de diferentes marcadores determinados en el primer trimestre del embarazo, específicamente entre las semanas 10 y 13.^{4,5}

La utilización de un solo marcador durante el primer trimestre se discute en otros estudios; su utilidad es dudosa y se requieren más investigaciones para valorar su eficacia y la edad óptima de aplicación.⁵

El propósito de este estudio es mostrar los resultados de la PAPP-A como marcador único durante el primer trimestre del embarazo.

PACIENTES Y MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y al azar en 400 mujeres atendidas en la Clínica del Noroeste de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México, a quienes se realizó diagnóstico prenatal entre septiembre de 2001 y septiembre de 2005. Se seleccionaron mujeres embarazadas de 9 a 13 semanas y se excluyeron las que tenían embarazos múltiples, diagnóstico de enfermedades concomitantes y antecedentes de embarazo con síndrome de Down.

Las mujeres que acudieron a control prenatal entre las semanas 9 a 13 de embarazo (determinado por el primer día de la última menstruación) fueron invitadas a participar en el estudio, después de recibir una explicación verbal. En estas visitas se les practicó un ultrasonido para corroborar la edad gestacional por longitudcefalococcígea o diámetro biparietal cuando fue posible. Se determinó la translucencia nucal y la osificación del hueso nasal.⁶

Los casos con resultados anormales fueron objeto, en el segundo trimestre, de doble, triple o cuádruple examen con marcadores bioquímicos para seleccionar a las idóneas para amniocentesis, con base en el riesgo estimado.

Las pacientes seleccionadas con marcador único ($n = 28$) se sometieron a tamizaje del segundo trimestre, y sólo tres fueron susceptibles a la amniocentesis (una tenía feto con síndrome de Down); no hubo intervención médica temprana

en el primer trimestre, según la PAPP-A o translucencia nucal.

El procedimiento para determinar la PAPP-A en el suero materno se realizó con quimioluminiscencia inmunométrica; los resultados de este análisis se expresaron en mUI/mL y para estimar los puntos de corte se convirtieron a múltiplos de la mediana por semana de gestación. En general, las concentraciones de PAPP-A estuvieron por debajo de 0.43 múltiplos de la mediana en embarazos afectados.³ La obtención de estos múltiplos se consiguió al dividir el valor bioquímico del marcador de cada paciente (mUI/mL) entre la mediana de regresión de todos los casos por semana de gestación.⁵

En el cuadro 1 se muestran los puntos de corte expresados en múltiplos de la mediana para cada edad gestacional; estas concentraciones se utilizaron para definir el resultado positivo y diferenciarlo del negativo. En este estudio se utilizó la PAPP-A como marcador único, en el que sólo se especificó su concentración. El punto de corte de la décima semana fue el mismo que para la novena.⁵

Cuadro 1. Valores de la PAPP-A (mUI/mL) utilizados como puntos de corte para cada edad gestacional. El valor de la semana 10 se extrapoló a la semana 9¹¹

Edad gestacional (semanas)	Punto de corte (múltiplos de la mediana)
9	0.42
10	0.42
11	0.38
12	0.44
13	0.60

Los resultados de la PAPP-A se muestran por semana de gestación; los valores bioquímicos se analizaron con estadística descriptiva y en múltiplos de la mediana y se compararon los valores entre cada semana de gestación.

Los resultados del tamizaje con el marcador PAPP-A de las 400 pacientes se clasificaron en una tabla de contingencia de 2 x 2, en la que cada uno se definió como:

- Falso positivo: embarazo normal con resultado positivo en el marcador
- Falso negativo: embarazo anormal con resultado negativo
- Verdadero positivo: embarazo anormal con resultado positivo

- Verdadero negativo: embarazo normal con resultado negativo

En lo que a edad materna respecta, se aplicó la misma metodología para definir a las pacientes con riesgo de síndrome de Down, con punto de corte en 38 años.

Los casos con concentraciones anormales de PAPP-A por debajo del punto de corte se aislaron para describirlos. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistics v.6, cuyos resultados se expresaron con estadística descriptiva. También se usaron frecuencias simples para las variables nominales, y medianas, medias y desviación estándar para las numéricas. Se estimaron los valores de eficacia: sensibilidad, especificidad y tasa de falsos positivos. Para comparar los valores de la PAPP-A se utilizó la prueba de la *t* de Student para muestras independientes. La significación estadística se definió con una *p* menor de 0.05.

RESULTADOS

El promedio de edad de las pacientes fue de 31.9 ± 5.3 años (límites en 19 y 43 años); 18% tuvo 38 años o más y 37.5% entre 31 y 36 años. Su peso promedio fue de 68.3 ± 11 kg (máximo 105 kg).

Entre las pacientes 27.5% cursaba la novena semana de embarazo, 21% la décima segunda, 20% la décima, 16.5% la décima tercera y 15% la undécima.

En la novena semana la PAPP-A se encontró entre 0.17 a 2.10 mUI/mL (0.73 ± 0.42 mUI/mL), mientras que en la décima tercera fue de 0.12 a 4.90 mUI/mL (2.5 ± 1.10 mUI/mL; cuadro 2).

Las medianas de la PAPP-A fluctuaron entre 0.59 y 2.35 mUI/mL en las semanas 9 a 13 (figura 1). Los valores de dicho marcador fueron de 0.29 a 3.59 múltiplos de la mediana (1.24 ± 0.72) en la semana nueve, y para la semana 13 disminuyeron de 0.05 a 2.09 (1.06 ± 0.47).

Cuadro 2. Valores de la PAPP-A por edad gestacional

Edad gestacional (semanas)	PAPP-A (mUI/mL)			PAPP-A (múltiplos de la mediana)	
	Media	DE	Mediana	Media	DE
9	0.73	± 0.42	0.59	1.24	± 0.72
10	1.02	± 0.79	0.79	1.30	± 1.01
11	1.72	± 1.05	1.30	1.33	± 0.81
12	1.56	± 0.67	1.30	1.20	± 0.51
13	2.50	± 1.10	2.35	1.06	± 0.47

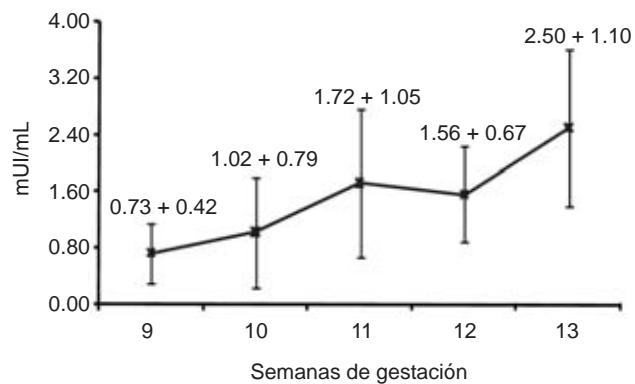


Figura 1. Distribución de valores bioquímicos para la PAPP-A por edad gestacional (mUI/mL). Se muestran la media en la línea continua ± desviación estándar en barras.

Al comparar los valores bioquímicos por semanas de gestación se encontraron diferencias significativas entre las semanas 9 y 10 (cuadro 3), y 10 y 11 (*p* < 0.05). Durante las semanas 11 y 12 las concentraciones de la PAPP-A se mantuvieron entre 1.72 y 1.56 mUI/mL, y en la semana 13 aumentaron a 2.5 mUI/mL.

Con los resultados de la PAPP-A se detectó un (0.3%) caso verdadero positivo, 28 (7%) falsos positivos y 371 (92.8%) verdaderos negativos para el síndrome de Down; no hubo casos falsos negativos.

La frecuencia de falsos positivos entre las semanas 9 a 11 fue de 5.5 y 6.7%, en la semana 12 sólo hubo 1.2% y en la 13 aumentó a 18.2%. El marcador PAPP-A tuvo promedio de especificidad de 95.1% (semanas 9 a 12) y la edad materna de 82.2%.

El valor de la PAPP-A, expresado en múltiplos de la mediana por semana, disminuyó en los embarazos con riesgo de síndrome de Down (*n* = 29: 28 falsos positivos y un verdadero positivo) y aumentó en los valores bioquímicos (cuadro 5).

Cuadro 3. Comparación de la PAPP-A por semana de gestación (mUI/mL)

Valores de la PAPP-A por semana de gestación (mUI/mL)											
Edad gestacional (semanas)			Media		DE		Media		DE		
									t	p	
9	vs	10	0.73	±	0.42		1.02	±	0.79	- 3.330	0.001
10	vs	11	1.02	±	0.79		1.72	±	1.05	- 4.480	0.0001
11	vs	12	1.72	±	1.05		1.56	±	0.67	1.090	0.28
12	vs	13	1.56	±	0.67		2.50	±	1.10	- 6.410	0.0001

Cuadro 4. Resultados del marcador PAPP-A de la tabla de contingencia de 2 x 2 en 400 casos (resultados del diagnóstico)

Edad gestacional (semanas)	Punto de corte (MoM)	Falsos positivos	Falsos negativos	Verdaderos negativos	Verdaderos positivos	Especificidad	n
9	0.42	6	5.5%	-	-	104	94.5%
10	0.42	5	6.3%	-	-	74	92.5%
11	0.38	4	6.7%	-	-	56	93.3%
12	0.44	1	1.2%	-	-	83	98.8%
13	0.60	12	18.2%	-	-	54	81.8%
Total	28	7.0%	-	371	92.8%	1	0.3%
							400

MoM. múltiplos de la medida

Cuadro 5. Valores de la PAPP-A en embarazos con riesgo de síndrome de Down

Semanas de gestación	Expresados en mUI/mL			Expresados en múltiplos de la mediana			
	Media	DE	Media	DE	n		
9	0.20	±	0.02	0.33	±	0.04	6
10	0.18	±	0.08	0.23	±	0.00	6
11	0.38	±	0.05	0.29	±	0.04	4
12	0.40	±	-	0.31	±	-	1
13	0.90	±	0.35	0.38	±	0.15	12

La figura 2 muestra el promedio de valores anormales de la PAPP-A por semana de gestación. La amplia variabilidad (barras de errores) se debe al tamaño reducido de las muestras, con amplio rango de distribución.

DISCUSIÓN

Diversos estudios (series grandes) demuestran la efectividad de los marcadores sonográficos y bioquímicos en la detección del síndrome de Down durante el primer trimestre del embarazo.^{2,3,5}

Algunos centros utilizan marcadores dobles (β -hCG libre y TN) o triples (β -hCG libre, TN y PAPP-A) en el tamizaje de aneuploidías.⁵

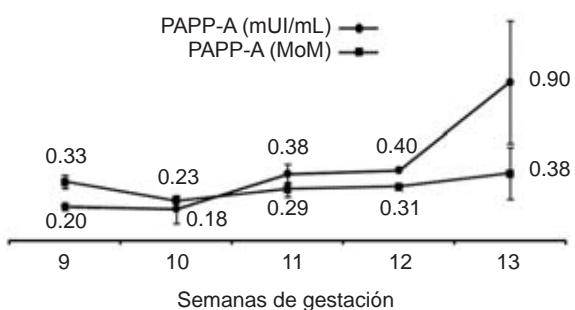


Figura 2. Valores de la PAPP-A en embarazos con riesgo de síndrome de Down, obtenidos en embarazos con concentraciones anormales de PAPP-A ($n = 29$).

En el estudio SURUSS, conocido como proyecto multicéntrico, se observó que durante la décima semana del embarazo la hCG y la inhibina-A fueron progresivamente más discriminatorias en los casos afectados, y la PAPP-A menos. La información de la capacidad discriminatoria de la PAPP-A después de la semana 10 de embarazo aún es escasa.⁵

La decisión de ofrecer un diagnóstico prenatal con marcadores bioquímicos tiene por objeto disminuir la práctica de procedimientos invasores. Este estudio muestra los resultados del marcador PAPP-A en suero materno para el tamizaje de las alteraciones cromosómicas.^{7,9}

Al utilizar la edad materna (35 años o más) como punto de corte para el riesgo de síndrome de Down 5 a 7% de los casos tendrá tamizaje positivo, y si en ellas se practicara amniocentesis sólo uno de 85 procedimientos representará un resultado anormal.¹⁰

El tamizaje bioquímico sugiere que los resultados falsos positivos simplemente indicarán riesgo y requerirán pruebas confirmatorias. En la bibliografía se acepta 5% de falsos positivos; en este estudio fluctuaron entre 6 y 7% durante las semanas 9 a 11 de embarazo.^{4,5,8,9}

La tasa de abortos espontáneos es mayor a menor edad gestacional. Esto se debe a que los embriones con amniocentesis fallecen durante las primeras semanas del embarazo. Entre todas las pacientes del estudio, seis casos representaron abortos tardíos, cuyas concentraciones anormales de PAPP-A estuvieron entre 0.1 y 0.25 mUI/mL (promedio de 0.18 mUI/mL), dos de éstas mayores de 38 años de edad.⁸

La baja tasa de falsos positivos promueve la utilización del tamizaje porque representa una estrategia eficaz para el diagnóstico prenatal y, además, no hubo casos falsos negativos.^{3,8}

CONCLUSIONES

La combinación de los marcadores β -hGC libre, PAPP-A y sonográficos es confiable para establecer el diagnóstico

prenatal durante el primer trimestre del embarazo. La PAPP-A, como marcador único en el primer trimestre del embarazo, es efectiva en las semanas 9 a 11; después de este periodo aumenta considerablemente la tasa de falsos positivos. El análisis de falsos positivos en casos individuales debe combinarse con marcadores bioquímicos o biofísicos, además de considerar la edad materna, para disminuir la tasa de dichos resultados. Se requieren más estudios para entender la utilidad de la PAPP-A como marcador único.

REFERENCIAS

1. Parga M, Martínez M, Idoeta M, Sánchez-Pastor M. Diagnóstico prenatal y cribado de cromosomopatías. *Med Fam Ginecol Obstet* 2001;11:590-8.
2. Snijders R, Sebire N, Cuckle H, Nicolaides KH. Maternal age and gestational-age specific risks for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther* 1995;10:356-67.
3. ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007;109:217-27.
4. Andrade E, Guzmán M. Diagnóstico prenatal en el primer trimestre, ¿a quién y cómo? *Ginecol Obstet Méx* 2002;70(12):607-12.
5. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, et al. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS). *Health Technol Assess* 2003;7:1-77.
6. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:231-7.
7. Krantz DA, Larsen JW, Buchanan D, Macri JN. First-trimester Down syndrome screening: free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:612-6.
8. Wenstrom KD. Aneuploidy screening: the changing scene. *Obstet Gynecol* 2003;101:840-2.
9. Salinas P, Valdés R, Carmona G. Screening genético antenatal para la detección de aneuploidías. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2003;68:529-35.
10. Dragan A. Advanced maternal age and prenatal diagnosis: It's time for individual assessment of genetic risk. *Isr Med Assoc J* 2005;7:99-102.