



UNIVERSITA' DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dottorato in Fisiopatologia della Riproduzione e Sessuologia Clinica

Tesi di Dottorato:

**“DIAGNOSI PRENATALE, AMNIOCENTESI:
INDICAZIONI E RISCHI CORRELATI”**

Relatore:

Prof. Tommaso Simoncini

Candidato:

Dr.ssa Federica Pancetti

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1 INTRODUZIONE	
1.1 Diagnosi prenatale	pag. 3
1.2 Consulenza genetica	pag. 5
1.3 Diagnosi prenatale non invasiva	pag. 7
1.3.1 Translucenza nucale e bi-test	pag. 8
1.3.2 Ecografia	pag. 13
1.3.3 Tri-Test	pag. 14
1.4 Diagnosi prenatale invasiva	pag. 15
1.4.1 Indicazioni	pag. 15
1.4.2 Scelta della metodica	pag. 13
1.4.3 Tecniche di analisi	pag. 20
1.4.4 Funicolocentesi	pag. 20
1.4.4.1 Indicazione all'esame	pag. 20
1.4.4.2 Rischi e complicanze	pag. 20
1.4.4.3 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica	pag. 21
1.4.5 Villocentesi	pag. 22
1.4.5.1 Rischi e complicanze	pag. 23
1.4.5.2 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica	pag. 26
1.4.6 Amniocentesi	pag. 28
1.4.6.1 Rischi e complicanze	pag. 30
1.4.6.2 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica	pag. 34
2 SCOPO	pag. 36
3 MATERIALI E METODI	pag. 36
4 RISULTATI	pag. 39
5 DISCUSSIONE	pag. 45
6 CONCLUSIONE	pag. 50
7 BIBLIOGRAFIA	pag. 51

1. INTRODUZIONE

1.1 Diagnosi prenatale

Nell'ostetricia moderna la valutazione delle condizioni del feto a fini diagnostici, terapeutici e prognostici assume importanza sempre maggiore. Da tempo sono stati approntati numerosi metodi che consentono di esplorare, sia pure in modo parziale ed indiretto, molti aspetti morfologici e funzionali del feto. La diagnostica prenatale si pone come obiettivo principale quello di individuare il più precocemente possibile i problemi che possono interessare i feti dal punto di vista cromosomico, genetico, metabolico e infettivo.

Possiamo dividere le tecniche di diagnosi prenatale in due tipi: metodiche invasive e metodiche non invasive.

Fra le metodiche non invasive va ricordata in primis l'ecografia che permette nelle varie fasi di gravidanza una diagnostica fine ed accurata delle possibili alterazioni morfologiche e funzionali del feto. Si tratta tuttavia una diagnostica che può guidare il giudizio clinico ma che di per sé non permette una diagnosi di certezza, e tanto meno di tipo genomico.

A questa, si possono aggiungere le tecniche di purificazione del DNA fetale direttamente sul prelievo di sangue materno¹. Anche in questo caso, tuttavia, seppur permettano una diagnosi di certezza, si tratta di tecniche

non da tutti completamente accettate, molto costose e che richiedono comunque il ricorso a tecniche invasive per avere la conferma della diagnosi. Addirittura nell'ultimo "Position Statement" della Italian College of Fetal Maternal Medicine, è sconsigliato l'utilizzo di tali metodiche anche se espressamente richieste dalla madre in quanto non forniscono risultati clinicamente validati⁵³. In questo momento, dunque, le metodiche di riferimento considerate il gold standard per lo studio di cromosopatie sono la villocentesi e la amniocentesi.

Al di là del mero aspetto tecnico, tali metodiche devono seguire alcuni principi generali per un corretto programma diagnostico prenatale consistono in una serie di controlli :

- Dapprima devono essere identificate le coppie candidate, mediante il rilievo dei fattori di rischio extraostetrici: età materna, malattie ereditarie, consanguineità, precedente nascita di un figlio affetto, ecc;
- Occorre quindi giungere ad una definizione precisa della patologia attraverso la consulenza col genetista specialmente in caso di patologia multifattoriale con componente genetica;
- Infine, tra i metodi disponibili, è necessario scegliere quello più adatto in rapporto all'epoca gestazionale ed ottimale per il caso in questione.

1.2 Consulenza genetica

Anomalie genetiche di varia entità sono presenti, all'incirca, nel 3-5% delle gravidanze². Questo livello di rischio si accresce quando nella storia familiare vi siano chiare evidenze di malattie geneticamente trasmesse. E' importante far precedere qualsiasi test di screening od invasivo da una consulenza con un genetista medico. Le acquisizioni scientifiche degli ultimi decenni hanno dato un notevole incremento alla conoscenza delle basi biologiche di molte malattie ereditarie. In particolare, gli studi compiuti sul DNA hanno permesso di individuare i difetti molecolari di numerose malattie genetiche e di mettere a punto test genetici che consentono di effettuare diagnosi precise anche in epoca prenatale. Nonostante tutto, sono ancora molte le malattie genetiche di cui si conoscono le caratteristiche cliniche e le modalità di trasmissione, ma non il difetto molecolare. Ciò implica che, per queste patologie, non siano disponibili test genetici specifici. Esistono inoltre molte malattie genetiche di cui si conosce la modalità di trasmissione e il difetto molecolare ed è disponibile un test genetico, ma per le quali non esiste ancora una terapia efficace.

La consulenza genetica è quindi un processo informativo attraverso il quale i pazienti affetti da una malattia geneticamente determinata ricevono informazioni relative alle caratteristiche della malattia stessa, alle modalità

di trasmissione, al rischio di ricorrenza e alle possibili terapie, incluse le opzioni riproduttive.

La diagnosi precisa della malattia costituisce premessa fondamentale e necessaria per poter effettuare la consulenza genetica. Può essere esclusivamente clinica, ovvero basata sulla valutazione del medico specialista e su dati derivati da indagini strumentali, oppure può richiedere l'impiego di test genetici.

La consulenza genetica si articola in diverse fasi:

- Raccolta delle informazioni: viene effettuata tramite l'anamnesi personale e familiare. E' un momento fondamentale, in cui vengono raccolte tutte le informazioni necessarie, che possono aiutare lo specialista in genetica medica a far luce sulla reale origine genetica della malattia. Vengono annotate informazioni precise sui diversi componenti familiari, inclusi quelli deceduti, che si ritiene abbiano avuto la stessa malattia. A tal fine possono essere utili, oltre alle cartelle cliniche e alle varie documentazioni sanitarie, anche fotografie dei familiari deceduti.

- Ricostruzione dell'albero genealogico: è una ricostruzione grafica che consente di raccogliere le informazioni di carattere genetico della famiglia in esame. Deve essere estesa ad almeno tre generazioni: probando, genitori e nonni.

- Visite specialistiche: richieste dal genetista per confermare o escludere altri eventuali segni minimi della malattia sui componenti familiari.

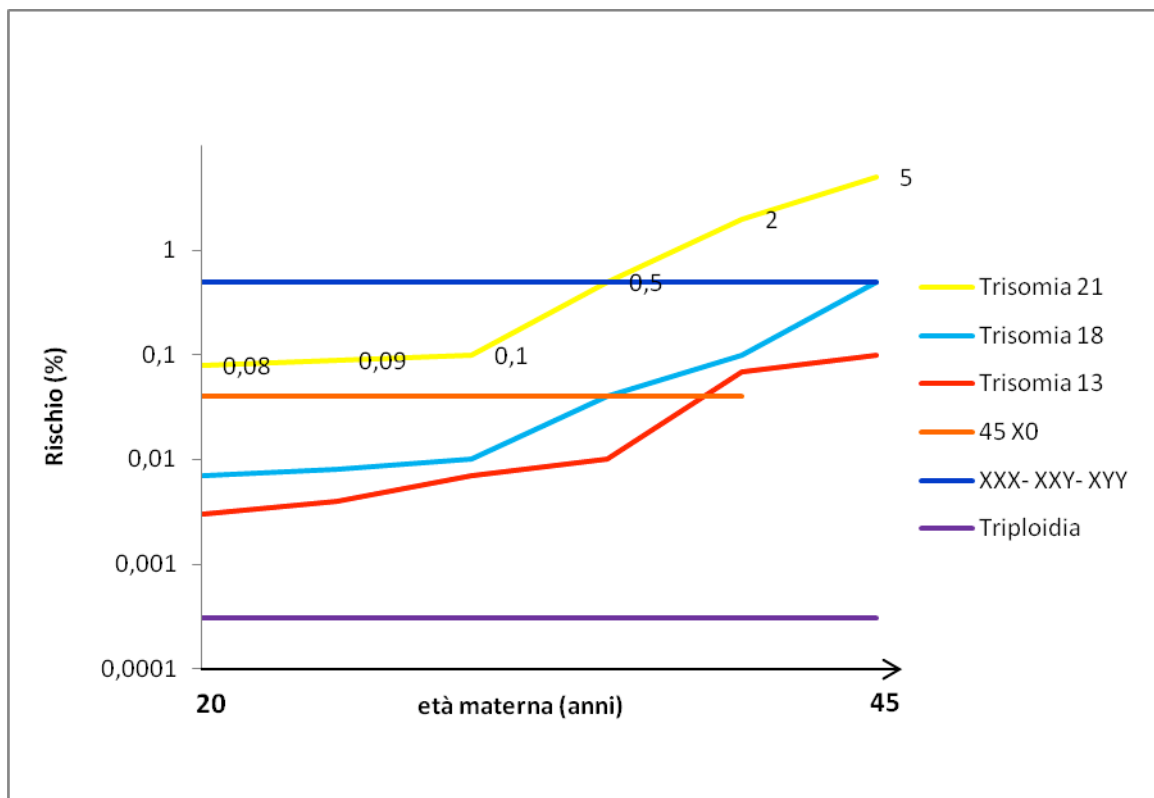
- Esami di laboratorio: comprendono test genetici quali l'analisi del DNA e/o dei cromosomi tramite cariotipo per quelle malattie genetiche in cui si conosce il difetto genetico ed esami strumentali.
- Calcolo del rischio genetico: è la possibilità che una condizione patologica a base genetica presente nel probando si verifichi nuovamente in altri membri appartenenti alla stessa famiglia. Il calcolo del rischio si basa sull'accertamento della modalità di trasmissione della malattia, sui dati strumentali e di laboratorio disponibili e sulla posizione del probando all'interno della famiglia. Il rischio genetico può essere fornito in termini probabilistici o con un valore percentuale.
- Comunicazione: è il momento in cui lo specialista in genetica medica comunica al probando o ai suoi familiari le informazioni ottenute e le possibili conseguenze. La consulenza non deve essere mai direttiva e quindi non deve influenzare le possibili decisioni del probando o della famiglia.

1.3 Diagnosi prenatale non invasiva

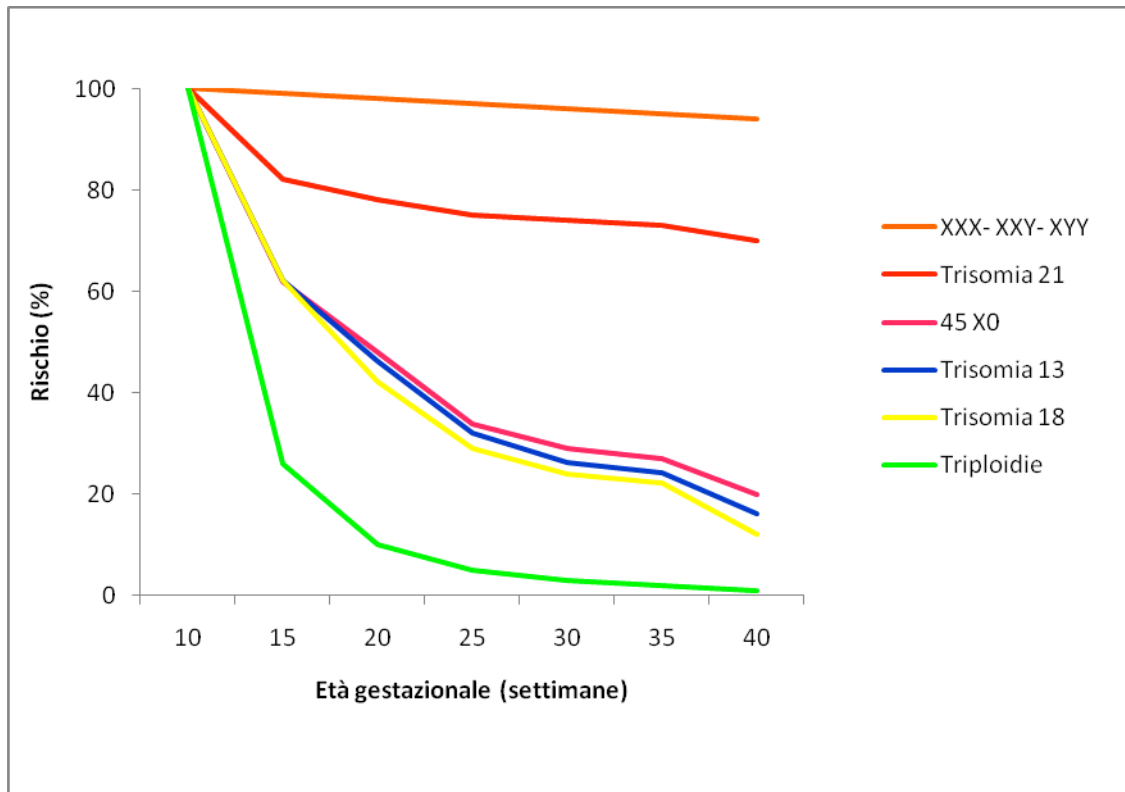
Viene definita non invasiva una tecnica che permette di analizzare il feto "dall'esterno", senza rischi di alterazioni o danni per la madre o per il nascituro. Le metodiche di diagnosi prenatale non invasive attualmente più in uso sono l'ecografia, il bi-test, la misurazione della translucenza nucale ed il tri-test.

1.3.1 TRANSLUCENZA NUCALE E BI-TEST

Il primo metodo di screening per la trisomia 21 è stato, all'inizio degli anni '70, l'osservazione dell'associazione con l'età materna, che ha portato a definire il gruppo delle gestanti a rischio, quello con età superiore a 35 anni, rappresentato dal 5% della popolazione totale di gravide³.



Con il progredire della gravidanza, circa il 30% di feti affetti da Sindrome di Down va incontro ad aborto spontaneo, per cui il rischio a termine di gravidanza è diverso rispetto a quello considerato nelle prime fasi della gestazione.



Alla fine degli anni '80, si sono affermati i primi metodi basati sul dosaggio plasmatico materno di alcuni fattori fetoplacentari. A 16-18 settimane, infatti, i valori medio plasmatici dell'A-fetoproteina, dell'estriolo e della gonadotropina corionica umana nel sangue materno, risultano significativamente diversi nelle gravidanze trisomiche rispetto a quelle normali, permettendo di identificare una percentuale di feti affetti compresa fra il 60 ed il 70%, con la stessa percentuale di falsi positivi (5%) rispetto alla sola età materna.

Gli anni '90 hanno visto abbassarsi l'epoca gestazionale dello screening a 11-14 settimane, con l'introduzione della misurazione dello spessore di fluido che si raccoglie dietro la nuca fetale, definito tecnicamente

“traslucenza nucale” che, in base all’età materna ed all’epoca di gravidanza, offre una detection rate del 70% per la Sindrome di Down. Recenti studi^{4 5} hanno proposto l’utilizzo combinato dell’età materna, della traslucenza nucale e del dosaggio di due proteine plasmatiche materne: la subunità libera della B- gonadotropina corionica umana (free-B-Hcg) e la proteina plasmatica-A associata alla gravidanza (PAPP-A). Il primo analita aumenta i suoi livelli plasmatici nelle gravidanze con feto affetto da Sindrome di Down, mentre il secondo diminuisce.

Associando questi valori alla traslucenza nucale, si ottiene, ad 11-14 settimane, un indice di identificazione dei feti affetti prossimo al 90%, in base all’età materna ed all’epoca gestazionale. Nel 2001⁶ è stato osservato che in circa il 60%-70% dei feti affetti dalla Sindrome di Down, non è presente l’osso nasale a 11-13 settimane (assente anche nel 5% delle gravidanze normali). Questo reperto, ha permesso di incrementare la capacità di riconoscere un feto affetto dalla Sindrome di Down, fino al 97% dei casi i un test di screening che lo associa alla misurazione della traslucenza nucale e la valutazione biochimica materna della free-B-Hcg e della PAPP-A.

Dal 2003⁷ sono in corso studi sulla valutazione dell’onda flussimetrica del dotto venoso, alterata in circa il 75% dei feti con difetti cromosomici, ma la riproducibilità di questo parametro è tuttora difficoltosa.

Gli studi più recenti⁸ stanno valutando la morfologia facciale fetale e nuovi

parametri, come la misurazione dell'osso mascellare, si stanno proponendo per determinare con più accuratezza i feti affetti da anomalie del cariotipo.

METODO DI SCREENING	SENSIBILITA'
Età materna (MA)	30 %
MA + biochimica materna a 15-18 settimane	50-70 %
MA + NT a 11-13 ⁺⁶ settimane	70-80 %
MA + NT + free B-hCG + PAPP-A a 11-13 ⁺⁶ sett.	85-90 %
MA + NT + osso nasale fetale (NB) a 11-13 ⁺⁶ sett.	90 %
MA + NT + NB + free B-hCG + PAPP-A a 11-13 ⁺⁶ sett.	95 %

Lo studio di screening più rappresentativo, è quello eseguito dalla Fetal Medicine Foundation in 43 paesi di tutto il mondo. In questo studio sono state esaminate 100.311 gravidanze con un follow-up di 96.127 casi: sono stati rilevati 326 casi di trisomia 21 e 325 di altre anomalie cromosomiche ad un'età gestazionale media di 12 settimane ed una età materna di 31 anni. La translucenza nucale risultò superiore al 95° percentile rispetto al CRL, in 234 (4,4%) delle gravidanze normali ed in 4210 (71,8%) di quelle con trisomia 21. Il rischio di sindrome Down in base all'età materna e all'epoca gestazionale fu superiore ad 1 su 300 in 268 (8,3%) delle gravidanze normali ed in 7097 (82,2%) in quelle con trisomia 21. Inoltre, tra le 325 anomalie cromosomiche repertate nello studio oltre alla sindrome

Down, in 229 (70,5%) di queste, la translucenza nucale è risultata essere superiore al 95° in base al CRL⁹. Numerosi studi hanno però evidenziato un aumento della translucenza nucale anche in molte anomalie fetali non cromosomiche ed in molte sindromi genetiche. Anche in questo caso, lo studio più grande è il sopraccitato progetto della Fetal Medicine Foundation nel quale sono state diagnosticate 4116 gravidanze con cariotipo normale e translucenza superiore al 95° percentile per il CRL in cui sono state identificate un' ampia varietà di anomalie strutturali e sindromi genetiche in 161 casi (3,9%), si è osservato inoltre, che la prevalenza delle anomalie aumentava con l'aumentare dello spessore della translucenza nucale¹⁰.

L'utilità del test di screening è stata recentemente documentata da un importante studio retrospettivo¹¹, concernente circa 6.000.000 di gravidanze nell'arco di 11 anni, in cui vengono messe a confronto l'efficacia e l'efficienza in aree geografiche in cui viene eseguito un test di screening biochimico ed ecografico e aree geografiche in cui non viene eseguito alcun tipo di screening; le due aree sono omogenee quanto alle indicazioni per la diagnosi prenatale per età materna. Nelle aree con programmi di screening l'efficacia è maggiore del 50% contro il 36% nelle aree senza programma di screening, mentre l'efficienza è rispettivamente pari a 1:60 e 1:88. Lo studio conclude che qualunque politica di screening biochimico e sonografico è più efficace ed efficiente di quella basata sulla

sola età materna. È comunque opportuno sottolineare che la diagnosi prenatale non invasiva, al momento attuale, costituisce uno strumento esclusivamente statistico¹² e viene richiesta da coloro che non intendano incorrere , in quella percentuale incompressibile di rischio di abortività (0.4-2%) che le tecniche invasive tuttora comportano¹³.

1.3.2 ECOGRAFIA

L'esame ecografico si basa sulla capacità dei tessuti di riflettere particolari onde sonore chiamate ultrasuoni e costituisce attualmente quell'esame che permette di avere un'immagine dell'interno dell'utero e del feto, essa non può sicuramente costituire un metodo di screening elettivo per la valutazione di un aumento del rischio per anomalie genetiche; diventa comunque utile, laddove i campanelli di allarme delle metodiche di prima istanza (bi-test, tri-test) dovessero aver fallito (falsi negativi) o nei casi in cui la gestante non avesse avuto il modo di sottoporvisi. La presenza di anomalie strutturali, come indicatori di aumentato rischio statistico per sindrome di Down o altre anomalie cromosomiche, soprattutto se presenti in associazione tra loro, costituisce una accettata indicazione alla diagnosi prenatale invasiva. Per la sua utilità e innocuità, l'esame ecografico è ormai praticato a scopo preventivo su tutte le gestanti e a diverse epoche della gravidanza.

1.3.3 TRI-TEST

Il tri-test si effettua preferibilmente tra la 15^a e la 17^a settimana di gravidanza, ed è un esame che si attua con tecnica combinata: ecografia fetale e dosaggio di tre ormoni materni (da cui il nome tri-test). L'ecografia si effettua per la sola rilevazione di parametri biometrici fetali come il diametro biparietale (BPD) utili a datare, con buona attendibilità, l'epoca gestazionale. L'esatta valutazione di quest'ultima diventa importante per la stretta correlazione esistente con le curve dei range di normalità delle tre sostanze che si vanno poi a dosare su siero di sangue materno con un semplice prelievo: l'alfa-feto-proteina (AFP), l'estriolo non coniugato (uE₃) e la gonadotropina corionica (hCG). La valutazione combinata di questi tre analiti e di altri parametri (età materna, peso, fumo etc.) consente di individuare le donne con rischio statistico aumentato di partorire un feto affetto da difetti di chiusura del tubo neurale (spina bifida), da trisomia 21, da trisomia 18 o da altre anomalie cromosomiche¹⁴. Con il tri-test si considera a rischio statistico aumentato per sindrome di Down, una donna la cui probabilità di avere un feto affetto sia superiore o uguale a 1/350 casi (è il rischio sovrapponibile a quello di una donna di 35 anni). Come si è già detto il rischio è correlato all'età materna: a 28 anni è circa di 1/1352, a 30 anni di 1/895, a 38 anni di 1/167¹⁵. La diagnosi può essere accertata solo attraverso l'indagine citogenetica fetale ed in questo caso è la coppia che

deve decidere se sottoporsi o meno a metodiche di diagnosi prenatale invasive in quanto il tri-test presenta una specificità del 82%, falsi negativi pari a 0,03% e falsi positivi pari a 8,5%^{16 17}.

1.4 Diagnosi prenatale invasiva

Si dice invasiva una tecnica di diagnosi prenatale che comporta la penetrazione nella cavità uterina. La diagnosi prenatale invasiva ha avuto inizio alla fine degli anni '60 con l'amniocentesi (prelievo di liquido amniotico), successivamente negli anni '80 furono messe a punto nuove tecniche, la villocentesi (prelievo dei villi coriali), e la funicolocentesi (prelievo di sangue fetale dal cordone ombelicale). Non si tratta di tecniche di analisi, ma di procedure di prelievo, che permettono di ottenere materiale di origine fetale: cellule, liquidi o tessuti biologici. Il campione verrà poi analizzato in laboratorio utilizzando a seconda dei casi tecniche biochimiche, citogenetiche o molecolari.

1.4.1 Indicazioni

Nel corso dei decenni queste tecniche sono state estremamente raffinate, sia per una maggiore preparazione del personale sia come conseguenza dei notevoli avanzamenti tecnologici, riducendo al minimo il rischio d'aborto successivo al prelievo. Purtroppo, però, tale rischio non è stato del tutto azzerato e attualmente è valutato attorno al 0,5-1% per l'amniocentesi,

1-2% per la villocentesi e 2-3% per la funicolocentesi¹⁸. A questo si deve aggiungere una quota di ulteriori perdite legate ad altre complicanze e gli errori diagnostici che sono stimabili in 1:200 casi per la villocentesi e 1:1000 per l'amniocentesi¹⁹. Per questo motivo e per il fatto che tali procedure sono estremamente costose, la diagnosi prenatale invasiva viene di solito riservata alle donne a più alto rischio di anomalie cromosomiche o malattie geniche, in particolare a donne che abbiano:

- età materna avanzata (>35 anni);
- precedente figlio affetto da anomalia cromosomica;
- genitore portatore di arrangiamento strutturale dei cromosomi;
- familiarità per malattie genetiche;
- diagnosi di sesso per malattia genetica legata al cromosoma X;
- anomalie strutturali del feto all'esame ecografico di routine;
- test di screening biochimico positivo.

È, comunque, opportuno dire che oggi in Inghilterra si sottopongono alla diagnosi prenatale invasiva 1:20 gestanti (5%)²⁰, in Italia 1:5 gravide (20%)²¹ e in abruzzo 1:15 gravide (6,7%)²².

1.4.2 Scelta della metodica

La scelta della metodica da utilizzare nel praticare la Diagnosi Prenatale si è storicamente basata sul calcolo costo/beneficio, dove il costo è rappresentato dal rischio di aborto ed il beneficio il risultato in termini di diagnosi. Attualmente si nota una progressiva riduzione del rischio di aborto ed un enorme incremento delle possibilità diagnostiche. Uno studio recente effettuato valutando le metodiche invasive eseguite in un arco di tempo compreso tra il 1998 ed il 2003²³, afferma che il tasso di abortività post-procedura è notevolmente diminuito rispetto ai precedenti 20 anni (1,93% vs 3,12%) e, prendendo in considerazione anche l'età gestazionale, l'età materna e le indicazioni alla procedura, non sono state trovate differenze nella percentuale di aborti post-villocentesi e post-amniocentesi. Comunque, in letteratura non esiste un consenso unanime nella scelta delle metodiche ed è consuetudine indirizzare alla villocentesi le gravidanze ad "alto rischio" di anomalie fetali ed all'amniocentesi quelle considerate a "basso rischio".

1.4.3 Tecniche di analisi

- Tecniche citogenetiche

Si tratta di indagini diagnostiche che permettono di stabilire il numero e le caratteristiche dei cromosomi di un individuo. Per la diagnosi

prenatale si analizzano i cromosomi delle cellule fetali prelevate dal liquido amniotico o dai villi coriali. I cromosomi possono essere analizzati al microscopio dopo avere subito particolari trattamenti che li rendono visibili. In conclusione diciamo che l'analisi citogenetica consente l'individuazione di aberrazioni cromosomiche, cioè anomalie nel numero e nella struttura dei cromosomi.

- Indagini biochimiche

Sono utilizzate per la diagnosi di errori congeniti del metabolismo, mediante determinazioni enzimatiche dirette o dopo coltura.

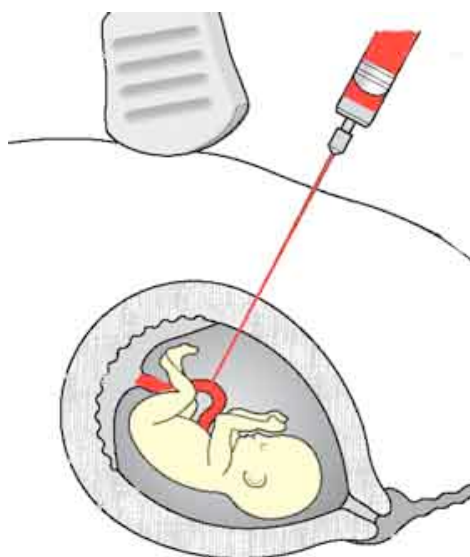
- Indagine molecolare

Si tratta di metodiche che studiando direttamente il DNA permettono di diagnosticare le alterazioni genetiche conosciute altrimenti invisibili all'esame citogenetico. La maggior parte delle alterazioni, infatti, è talmente piccola che non provoca alcuna modificazione visibile nella struttura dei cromosomi. Esistono oggi tecniche di biologia molecolare talmente sensibili da permettere l'analisi anche di campioni piccolissimi. La diagnosi molecolare di una malattia è possibile solo se si conoscono le alterazioni genetiche che la causano: si può così analizzare il DNA alla ricerca di queste alterazioni. A volte per la diagnosi è necessario analizzare anche altri componenti della famiglia, soprattutto se affetti dalla malattia.

1.4.4 FUNICOLOCENTESI

Normalmente la funicolocentesi si esegue a partire dal II trimestre di gravidanza e consiste nel prelievo di sangue fetale dal cordone ombelicale attraverso la puntura di uno dei vasi del funicolo, mediante l'uso dell'ultrasonografia. Il prelievo di sangue si esegue per via transaddominale utilizzando un ago singolo di calibro variabile da 20 a 22 gauge o un doppio ago, ago 22 gauge inserito in un ago "guida" da 20 gauge, per effettuare l'esame è necessario disporre di un ecografo real-time dotato di sonda transaddominale di almeno 3,5 MHz, inoltre può essere opportuno disporre di un *Coulter Counter* per analizzare immediatamente il campione di sangue prelevato e confermarne l'origine fetale.

Successivamente può essere opportuno effettuare il test di Kleinhauer-Betke, per rilevare l'eventuale presenza di contaminazione da parte del



sangue materno. La quantità di sangue prelevata di solito varia dai 2 ai 3,5 ml e la vena ombelicale nei pressi dell'inserzione placentare rappresenta la sede di elezione per effettuare un prelievo di sangue fetale a scopo diagnostico; se l'inserzione ombelicale non è raggiungibile per la

posizione della placenta e/o del feto, si può effettuare il prelievo da un'ansa libera del cordone ombelicale²⁴.

1.4.4.1 Indicazione all'esame

Le principali indicazioni alla funicolocentesi sono soprattutto la valutazione dei difetti congeniti dell'emostasi quali emofilia A e B e trombocitopenia alloimmune ma anche altre malattie ematologiche col vantaggio di poter ottenere dal sangue prelevato un cariotipo in tempi brevi, in quanto si mettono in coltura i linfociti e non i fibroblasti come avviene per l'amniocentesi. Inoltre con la funicolocentesi è possibile accertare l'eventuale anemia fetale dovuta alla presenza di anticorpi anti-Rh o effettuare una diagnosi certa di infezione fetale, attuando la funicolocentesi a partire dalla 22^a settimana in poi. La possibilità di puntura dei vasi ombelicali permette anche di effettuare trasfusioni fetali direttamente nella circolazione fetale, evitando la classica e più invasiva trasfusione endoperitoneale.

1.4.4.2 Rischi e complicanze

Le principali complicanze legate a questa metodica sono il rischio di aborto spontaneo che entro 2 settimane dall'esecuzione della procedura ed in gestanti a basso rischio, che è di circa il 2%, il sanguinamento della sede di puntura del cordone ombelicale correlato alle dimensioni dell'ago utilizzato

e la bradicardia fetale spesso dovuta alla puntura dell'arteria invece che della vena ed alla presenza di grave ritardo di crescita fetale (circonferenza addominale $<2,5^\circ$ o peso stimato $<10^\circ$) quest'ultimi due fattori sono associati ad una maggiore incidenza di perdita fetale²⁵.

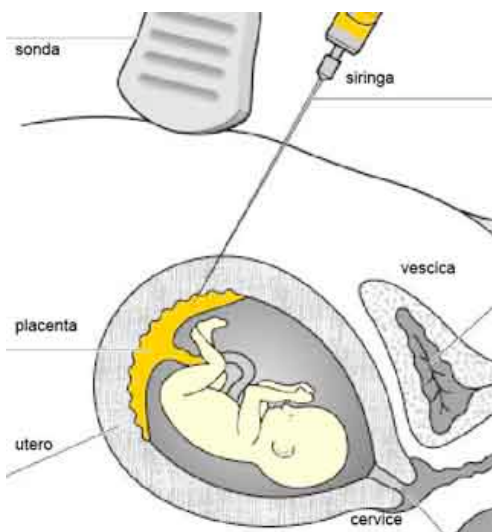
1.4.4.3 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica

Con la metodica di prelievo con ago singolo dall'inserzione placentare della vena ombelicale, si può ottenere il successo del prelievo nel 97% dei casi al primo tentativo (numero medio di tentativi 1,3), risultati analoghi si ottengono nei prelievi dalle anse libere del cordone (numero medio di tentativi 1,7). La tecnica con doppio ago sembra offrire minori probabilità di successo al primo tentativo (85%); inoltre, la contaminazione del campione ematico prelevato da parte di sangue materno risulta significativamente minore nei prelievi effettuati dalle anse libere del cordone ombelicale (2% vs 4%)²⁶. L'introduzione di metodi rapidi per la ricerca di aberrazioni cromosomiche ha notevolmente ridotto l'uso della cordonocentesi nelle gravidanze multiple. Questa riduzione è un dato auspicabile per l'alto tasso di complicanze. Infatti, la percentuale di perdita fetale post-procedura è pari a 8,2% ovvero circa 4 volte maggiore che nelle gravidanze singole²⁷.

1.4.5 VILLOCENTESI

Il prelievo dei villi coriali (CVS) è stato effettuato per la prima volta in Cina nel 1970 e consiste nel prelievo di un minuscolo frammento di tessuto dalla placenta. Il prelievo avviene per via transaddominale, utilizzando un ago singolo di calibro 20 gauge o meno frequentemente un doppio ago (ago 20 gauge inserito in un ago “guida” da 18 gauge). L’uso di un ago di calibro maggiore è associato ad una minore probabilità di successo del prelievo e ad un maggior rischio.

In alternativa, il prelievo può essere eseguito per via transcervicale mediante un catetere di polietilene con un mandrino di alluminio o una pinza da biopsia rigida, questa metodica è sicuramente controindicata in



caso di infezioni vaginali o cerviciti (es. da *N. gonorrhoeae*, Chlamydia, Herpes) e si tratta, comunque, di una tecnica più antica, oggi quasi completamente abbandonata. Per effettuare il prelievo dei villi coriali è necessario disporre di un ecografo real time dotato di una sonda transaddominale di almeno 3,5 MHz. Il

prelievo dei villi si esegue a partire dalla 10^a settimana di gravidanza fino alla 13^a, se si utilizza la metodica transcervicale, oppure può essere

eseguito fino a termine di gravidanza con la metodica transaddominale. Prima dell' esecuzione della procedura invasiva si esegue un esame ecografico per valutare il numero e la vitalità dell'embrione e per rilevarne la biometria, localizzare il *corion frondosum* e scegliere il punto più idoneo per l'inserzione dello strumento. Se il materiale prelevato è insufficiente si possono effettuare ulteriori tentativi di prelievo utilizzando un nuovo ago o catetere e comunque non è opportuno effettuare più di due tentativi perché i rischi di perdita fetale aumentano in maniera significativa²⁸.

1.4.5.1 Rischi e complicanze

Perdite fetali

Il rischio di aborto spontaneo tra la 16^a e la 20^a settimana di gestazione in donne con età avanzata, dopo che l'ecografia ha confermato una gravidanza vitale, è del 3-4% senza che la donna si sottoponga a procedura alcuna²⁹. La villocentesi aggiunge a questo rischio 1-2%, tale rischio, infine, raddoppia nella procedura transcervicale raggiungendo il 3-6%³⁰. Il rischio di perdita fetale dopo il prelievo dei villi coriali è correlato a diversi fattori, direttamente all'età materna avanzata, al numero di tentativi di prelievo, all'assetto citogenetico della placenta ed, inversamente, all'epoca di gravidanza in cui si esegue la procedura. Una revisione sistematica di studi controllati randomizzati (RCT)³¹ ha considerato le morti fetali in seguito a tecniche invasive di diagnosi prenatale confrontando:

- CVS transcervicale versus amniocentesi standard (5 studi): 14.5% versus 11%, rischio relativo (RR) 1.40, intervallo di confidenza al 95% (IC) 1.09-1.81
- CVS transaddominale versus amniocentesi standard (1 studio): 6.3% versus 7%, RR 0.90, IC 0.66-1.23)
- CVS con ogni tecnica versus amniocentesi standard (2 studi): 11% versus 8.2%, (RR) 1.43, IC 1.22-1.67

Non tutti gli studi hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra le due tecniche e l'adeguata preparazione dell'operatore sembra essere il fattore cruciale di questa discrepanza: gli operatori con una esperienza pari a <100 casi possono avere un tasso di perdite fetali post-procedurali 2-3 volte maggiore rispetto agli operatori con una esperienza di oltre 1000 casi. Una revisione sistematica del 2007³² ha preso in considerazione gli studi pubblicati dal 1995 riguardanti le complicanze legate al CVS eseguito per via transaddominale a 10-14 settimane di gravidanza, includendone 16, nessuno con gruppo di controllo. La percentuale di perdite fetali risultante dalla metanalisi degli studi è stata:

- entro 14 giorni dall'esecuzione: 0.7% (IC: 0.3-1.4%)
- entro la 24^a settimana di gravidanza: 1.3% (IC: 1.0-1.7%)
- totali 2% (IC: 1.4-2.6%)

Gli studi, essendo, comunque, privi di gruppo di controllo, non forniscono informazioni sul rischio di base e non permettono la stima del rischio aggiuntivo legato alla tecnica.

Malformazioni congenite

Numerosi studi hanno mostrato una associazione tra CVS e malformazione degli arti, con un incremento del rischio apparentemente correlato all'epoca di esecuzione dell'esame. Il rischio appare aumentato in caso di CVS eseguito prima della 10^a settimana di gestazione (1.6% a 6-7 settimane, 0.1% a 8-9 settimane) ma non solo, anche la gravità del difetto è correlata all'epoca gestazionale, essendo più probabili i difetti prossimali in epoche più precoci. Questo dato è in accordo con la sequenza embriogenetica dello sviluppo degli arti che si conclude effettivamente a 10 settimane di gestazione³³. Per questi motivi l'esecuzione del prelievo dei villi coriali non è consigliata prima della 10^a settimana di gestazione. Resta da stabilire se il CVS eseguito dopo 70 giorni di gestazione sia potenzialmente associato a difetti minori, come l'accorciamento della falange distale o l'ipoplasia ungueale. Il registro sponsorizzato dall' OMS, che ha raccolto 200.000 casi di CVS eseguiti dopo la 10^a settimana di gestazione, ha evidenziato che la villocentesi non è associata ad un rischio aumentato di anomalie fetali³⁴.

Altre complicanze

Le perdite ematiche vaginali sono relativamente frequenti dopo i prelievi di villi per via transcervicale e rare dopo quelli per via transaddominale e comunque non modificano l'outcome fetale. Le complicanze settiche sono rare così come la rottura delle membrane. Non vi sono dati significativi sulla possibile trasmissione di infezioni virali da madre infetta a feto attribuibili all'esecuzione del prelievo. Il prelievo dei villi coriali nelle gravidanze multiple deve essere eseguito dopo lo studio ecografico preliminare della corionicità, della posizione dei feti e delle rispettive placentate ed infine, dell'inserzione del cordone. Esso comporta un rischio di perdita fetale del 2-4% mentre il tasso di contaminazione tra i gemelli migliora con la maggiore esperienza degli operatori, tuttavia si stima che il rischio di dover ripetere il prelievo per un risultato incerto è di circa 2-3%³⁵.

1.4.5.2 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica

Dalla revisione sistematica di studi controllati randomizzati³⁶ si ricava che, utilizzando le procedure di prelievo transaddominale, si può ottenere il successo del prelievo nel 98% dei casi al primo tentativo, e nel 99,8% con due tentativi e nella maggior parte dei casi (97%) si ottiene una congrua quantità di villi coriali (>10 mg). In circa 0,5-1% dei casi si può verificare il fallimento dell'esame citogenetico, spesso a causa della scarsità del

materiale prelevato ed in questi casi, non si può ottenere un risultato se non ripetendo il prelievo diagnostico. Risultati falsi positivi dell'esame sono descritti nell'1% dei casi circa, quasi sempre per la presenza di mosaicismi placentari (90%) e raramente per aneuploidie non a mosaico. I risultati falsi negativi dell'esame sono da considerarsi rarissimi (1 su 3000) se si usa la sola tecnica diretta, mentre, se ad essa si aggiunge quella colturale, i risultati falsi negativi sono da considerarsi eccezionali (1 su 20.000). In generale diciamo comunque che rispetto all'amniocentesi, il CVS risulta associato ad un numero maggiore di insuccessi nel prelievo o nell'esecuzione della tecnica, e ad un numero più elevato di falsi positivi e falsi negativi.

1.4.6 AMNIOCENTESI

L'amniocentesi è una procedura che consente il prelievo transaddominale liquido amniotico dalla cavità uterina.

L'esame del liquido amniotico serve a valutare il cariotipo, cioè l'assetto cromosomico fetale, al fine di valutarne la normalità o al contrario la presenza di anomalie. Il liquido amniotico, infatti, contiene cellule fetali desquamate che vengono isolate mediante centrifugazione e sebbene tali cellule derivino da siti diversi (dall'amnion, dalla cute, dal tratto gastrointestinale e dall'apparato genitourinario) sono tutte di origine fetale.

Una buona parte di queste cellule desquamate è morta o sta morendo, ma in genere è possibile ottenere un numero di cellule vitali sufficienti per permettere la coltura cellulare. Le cellule sono poste in provette o piatti di plastica contenenti un medium nutriente; la temperatura, il pH e le condizioni ambientali della coltura sono modificate e controllate mediante particolari incubatori. Dopo un certo periodo di tempo le cellule vive attecchiscono ed iniziano a moltiplicarsi per divisione cellulare. Studiando le cellule in adeguata fase di crescita è possibile eseguire l'analisi cromosomica, diagnosticare difetti enzimatici e isolare il DNA. E' inoltre possibile conservare le cellule staminali presenti nel liquido amniotico, a beneficio del nascituro o dei soggetti compatibili. Il periodo ideale per eseguire l'amniocentesi è quello tra la 15^a e la 18^a settimana, quando

l'amnios ha raggiunto dimensioni sufficienti perché la pratica non costituisca un rischio per il feto, infatti, le amniocentesi precoci, cioè quelle effettuate dalla 10^a alla 14^a settimana di gestazione, presentano maggiori difficoltà di esecuzione, un maggior rischio di aborto e di fallimento della coltura cellulare, rispetto alle amniocentesi tradizionali. Esiste uno studio randomizzato prospettico multicentrico canadese³⁷ che ha comparato l'amniocentesi precoce con quella standard, evidenziando: 7,6% vs 5,95% (p=0,012) di perdite fetali post procedura, parto-pretermine e morti neonatali; 1,3% vs 0,1% (p=0,0001) per quanto riguarda la presenza di piede equino; 3,7% vs 1,5% (p=0,0007) di perdita di liquido amniotico dopo la procedura; 1,8% vs 0,2% (p<0,0001) di fallimento dell'esame citogenetico con necessità di ulteriori tecniche invasive.

L'amniocentesi viene effettuata con l'utilizzo di un ago singolo di 20-22 gauge e sotto guida ecografica continua; prima di praticare il prelievo è



opportuno eseguire un esame ecografico per valutare il numero, la vitalità e le posizioni del feto, rilevarne la biometria, valutare la quantità del liquido amniotico, localizzare la placenta e scegliere il punto più idoneo per l'inserzione dell'ago. La quantità di liquido amniotico prelevato di

solito varia a seconda dell'età gestazionale in cui viene eseguito l'esame e comunque non eccede i 20 ml; è opportuno, inoltre, eliminare la prima parte del campione che potrebbe contenere cellule non fetali e falsare l'interpretazione dei risultati³⁸.

1.4.6.1 Rischi e complicanze

Perdite fetali

Il rischio di aborto spontaneo tra la 16^a e la 20^a settimana di gestazione in donne con età avanzata, dopo che l'ecografia ha confermato una gravidanza vitale, senza che la donna si sottoponga a procedura alcuna è del 3-4%³⁹ a tale dato l'amniocentesi aggiunge un rischio di circa 1%, infatti, considerando il censimento della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) del 2004, in Italia, si può stimare che, in base al numero di amniocentesi, che ammontano a più di 100.000 ogni anno, le perdite di bambini non portatori di patologia cromosomica sono più di 1000⁴⁰. Questi risultati concordano con la letteratura mondiale, infatti, una revisione sistematica del 2007⁴¹ ha preso in considerazione gli studi pubblicati dal 1995 sulle complicanze legate all'amniocentesi eseguita sotto guida ecografica tra 14 e 24 settimane di gravidanza. Nella revisione sono stati inclusi 29 studi, di cui solo 5 con gruppo di controllo (nessuno randomizzato). La percentuale di perdite fetali risultante dalla metanalisi degli studi è stata:

- entro 14 giorni dall'esecuzione: 0.6% (intervallo di confidenza al 95%, IC: 0.5-0.7%)
- entro la 24^a settimana di gravidanza: 0.9% (IC: 0.6-1.3%)
- totali 1.9% (IC: 1.4-2.5%)

Infine, il rischio di perdita fetale aumenta sensibilmente in presenza di fattori di rischio come una precedente abortività (fino al 7%), presenza di emorragie genitali nel corso della gravidanza (fino al 6%), presenza di sangue nel liquido amniotico (fino al 15%) ed alfa-fetoproteina sierica >2MoM (fino al 20%). L'unico studio controllato randomizzato Europeo è uno studio danese⁴² del 1986 che ha valutato le perdite fetali dopo esecuzione di amniocentesi ed ha coinvolto 4606 donne a basso rischio (<35 anni). In tale studio la percentuale di morti fetali si è mostrata superiore nel gruppo di donne sottoposte ad amniocentesi (1.7%) rispetto al gruppo di controllo (0.7%), con un rischio relativo (RR) di 2.3 per il primo gruppo. Attualmente le tecniche a disposizione sono migliorate (guida ecografica continua, utilizzo di aghi più sottili da 20-22 gauge) e questa percentuale risulta essere sovrastimata.

Perdita di liquido amniotico

La perdita di liquido amniotico dopo amniocentesi del secondo trimestre avviene in 0.8-2% dei casi, con un rischio aggiuntivo di 1% e un RR di 3.9

(IC: 1.9-7.8) rispetto alle gravide non sottoposte ad esame. Rispetto alle rotture spontanee delle membrane, quella dopo amniocentesi ha un decorso più benigno e la perdita di liquido si risolve in pochi giorni nella maggior parte dei casi⁴³.

Altre complicanze

La perforazione della placenta durante l'esecuzione dell'esame non aumenta il rischio di perdite fetali, tuttavia è consuetudine cercare di evitare la puntura transplacentare per eseguire il prelievo del liquido, essa può essere praticata qualora rappresenti la via migliore di accesso ad una idonea tasca di liquido amniotico, purché realizzata lontano dall'inserzione del cordone ombelicale. Inoltre, l'amniocentesi, come tutte le indagini invasive materno-fetali, presenta il rischio di trasmettere al feto malattie infettive in senso madre-feto (rischio stimato 0.5-1.5 ogni 1000 esami effettuati), per questo motivo si deve, in linea di principio, evitare di eseguire esami invasivi in presenza di infezione materna in atto. Altrettanto recentemente si va sempre più focalizzando l'attenzione sulla responsabilità di alcuni agenti infettivi nel determinare la rottura precoce delle membrane (PROM). È ovvio pertanto che se andremo ad eseguire l'amniocentesi in un soggetto già portatore dell'infezione, anche se asintomatica, aumenteremo sensibilmente il rischio di amniosite e la conseguente rottura delle membrane. Infine, un'altra complicanza dell'amniocentesi potrebbe essere

il sanguinamento vaginale che si riscontra nel 2-3% dei casi e si risolve quasi sempre spontaneamente. Nelle gravidanze gemellari è necessario effettuare la valutazione preliminare della corionicità prima di effettuare il prelievo. Tra le diverse tecniche descritte la più diffusa e meno rischiosa consiste nell'attuazione di due procedure consecutive, introduzione di due distinti aghi in modo sequenziale e con guida ecografica. Errori diagnostici con questa tecnica sono riportati a circa 3,5%, l'istillazione di coloranti non trova attualmente più indicazione e, inoltre, andrebbe abbandonata la tecnica che prevede l'uso di un singolo ago introdotto nel primo sacco e poi nel secondo sacco attraverso il setto interamniotico. I problemi correlati a questa tecnica sono l'elevata percentuale di fallimento del passaggio transmembrana per un effetto tenda e di contaminazione del secondo prelievo con il contenuto del primo sacco. Nelle gravidanze gemellari monocoriali, se la diagnosi è certa, si può effettuare il campionamento di un unico sacco, in assenza di anomalie morfologiche in entrambi i feti. In caso di anomalie ecografiche di uno o entrambi i gemelli è consigliabile eseguire il prelievo in entrambe le sacche per escludere i rari casi di mosaicismo. Per quanto riguarda il rischio di aborto e di parto prematuro non vi sono evidenze che dimostrino un maggior rischio rispetto al background risk³⁷.

1.4.6.2 Successo del prelievo e accuratezza diagnostica

Utilizzando la procedura di prelievo sotto controllo ecografico continuo si può ottenere il successo del prelievo nel 98% dei casi al primo tentativo e fino al 99,8% nei centri di maggiore esperienza. In circa lo 0,2% dei casi si può verificare il fallimento dell'esame citogenetico, a causa della presenza di sangue nel liquido amniotico ma in generale gli errori diagnostici (risultati falsi negativi) sono molto rari (1 su 5000) e fra le possibili cause di errore si individuano la presenza di mosaicismi non riconosciuti, riarrangiamenti cromosomici di piccola entità e la contaminazione da parte di cellule materne⁴⁴. Dai risultati conseguiti in più di 30 anni di applicazione dell'amniocentesi, in cui la frequenza della sindrome di Down era valutata in 1:500-800 nati vivi⁴⁵, si evince che questa patologia non è diminuita in modo significativo poiché l'attuale prevalenza è stimata in circa 1:1000 nati vivi⁴⁶, senza dimenticare che le trisomie 21 diagnosticate mediante amniocentesi sono 1 ogni 100-200 analisi⁴⁷. Questo dato è confermato, anche, da uno studio italiano effettuato nelle province di Chieti e Pescara⁴⁸ da cui risulta che su 3319 amniocentesi effettuate su gravide con età > 35 anni sono stati diagnosticati 30 feti con sindrome di Down (1:150 analisi). Inoltre si è osservato che l'applicazione sistematica dell'amniocentesi in donne con età ≥ 35 anni ha avuto l'effetto di diminuire la frequenza della trisomia 21. Infatti, un'indagine relativa a 40272 nati

nelle suddette province nel periodo 2000-2006, ha consentito di diagnosticare 78 feti con trisomia 21 (1:516 nati), di cui 30 in donne con età ≥ 35 anni che si erano sottoposte ad amniocentesi (40%), riducendo così la prevalenza della sindrome nelle due province a 1:719 nati vivi.

2. SCOPO

Con il presente lavoro si è eseguito uno studio di tipo retrospettivo analitico che ha avuto lo scopo di individuare le caratteristiche epidemiologiche della popolazione che accede nel nostro Centro e l'incidenza di perdite fetali legate alle l'amniocentesi. Inoltre l'elevato numero di pazienti considerato ci permette di analizzare come un'eventuale terapia antibiotica di copertura possa influenzare o meno tale incidenza. I nostri dati sono stati poi confrontati con quelli della letteratura mondiale.

3. MATERIALI E METODI

Ai fini dello studio sono state prese in esame 2080 cartelle cliniche delle pazienti che si sono sottoposte ad amniocentesi, presso il Dipartimento Materno - infantile dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, dall'anno 2009 al 2012, e le cartelle del Laboratorio di Citogenetica e Genetica molecolare del suddetto istituto. Tra queste erano presenti 34 gravidanze gemellari, per un numero complessivo di 2114 amniocentesi. Il follow-up è stato eseguito mediante indagine telefonica a 4 e 12 settimane dall'amniocentesi e successiva consultazione degli archivi della Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana.

In maniera randomizzata (in base al numero di prenotazione: pari con terapia di supporto, dispari senza) le pazienti sono state suddivise in due gruppi: il primo ha ricevuto una copertura antibiotica con Amoxicillina

1gr., assunta dal giorno precedente l'esame per 5 giorni successivi 2 volte al giorno per un totale giornaliero di 2 gr .

Le restanti pazienti non hanno ricevuto alcuna terapia. E' da segnalare che le pazienti allergiche alle penicilline o antibiotici in generale, venivano automaticamente inserite nel gruppo non trattato- controllo.

Le pazienti, informate preventivamente sulla possibilità random, di ricevere o meno la terapia antibiotica potevano inoltre decidere di aderire spontaneamente ad uno o all'altro gruppo.

Il prelievo del campione di liquido amniotico è avvenuto mediante l'esecuzione di un'amniocentesi standard effettuata tra la 16^a e la 18^a settimana di gestazione. Prima dell'esecuzione del prelievo è stato eseguito un esame ecografico per valutare la vitalità, il numero e la posizione del feto, rilevarne la biometria, valutare la quantità del liquido amniotico, localizzare la placenta e scegliere il punto più idoneo per l'inserzione dell'ago. È stata eseguita, quindi, un'accurata disinfezione della cute addominale e utilizzato un involucro sterile per la sonda ecografica. Il prelievo di liquido amniotico è avvenuto per via transaddominale, utilizzando un ago di calibro 20 gauge, sotto controllo ecografico continuo. Il liquido amniotico è stato inviato al laboratorio di citogenetica e biologia molecolare, sterilmente, all'interno di provette da 10 ml.

Arrivato in laboratorio, il campione è stato centrifugato per 30 minuti a 1200 giri, e successivamente, aspirato sottocappa, gran parte del sovranatante, mentre il pellet ottenuto dalla centrifugazione è stato sospeso nuovamente nel liquido residuo e seminato in appositi vetrini con il terreno di coltura (chang medium). I vetrini sono stati messi all'interno di un termostato a CO₂ e lasciati in coltura per una settimana, al termine della quale è stato sostituito il terreno di coltura.

Il giorno successivo è stata controllata al microscopio, a contrasto di fase, la maturazione cellulare per verificare se i cloni avevano raggiunto una crescita adeguata, al termine della quale il campione è stato processato e sono stati ottenuti preparati cromosomici che, dopo opportuna colorazione con tecniche di bandeggio classiche, sono stati letti al microscopio con sistema di acquisizione di immagini. Dopo circa 13 giorni tutte le fasi erano terminate ed avevamo ottenuto la mappa cromosomica completa.

4. RISULTATI

Nella popolazione in oggetto nello studio (numero totale di 2114 amniocentesi), l'età media delle pazienti era di 35,1 anni \pm 1.2 per il gruppo controllo e 36,1 anni \pm 1.4 per il gruppo trattato, con un aumento medio del peso gestazionale di circa rispettivamente di 9.1 kg \pm 2.1 e di 10.4 kg \pm 1.8 per i due gruppi. Tutte le gravidanze erano insorte spontaneamente e nel 75.99% per il gruppo controllo e 73.55 % per il gruppo trattato, si trattava della prima gravidanza. Il numero di gravidanze gemellari (bigemini) si attestava in entrambi i gruppi al di sotto del 2%. Il 69.03 % si è sottoposta ad amniocentesi su indicazione materna o medica mentre il 30.93% su espressa richiesta materna (Tab.1).

	Controllo (1112 pz)	Trattata (968 pz)
Età Materna	35,1 anni \pm 1.2	36,1 anni \pm 1.4
Aumento di peso gestazionale	9.1 kg \pm 2.1	10.4 kg \pm 1.8
Primigravida	75.99% (845 pz)	73.55 % (712 pz)
Gravidanza bigemina	1.25 % (14 pz)	2.00% (20 pz)
Indicazione materna/medica	68.97. % (767 pz)	71,28 % (690 pz)

Indicazioni materne all'amniocentesi. Le pazienti che si sono sottoposte ad amniocentesi per indicazione materna/medica erano in totale 1457. L'indicazione legata all'età materna, cioè quelle donne con età \geq a 35 anni, era presente in 1268 pz (87.02. %) con un'età media di 37.4 anni (Fig. 1). Le altre indicazioni erano nello specifico:

- 54 esposizione rx (3.7%)
- 8 abortività ripetuta (0.54%)
- 59 anomalie fetali (4.01%)
- 12 precedente figlio portatore di anomalie fetali (0.82%)
- 28 test biochimico positivo (1.92%)
- 2 difetto genetico materno (0.13%)
- 26 cause paterne (1.78%)

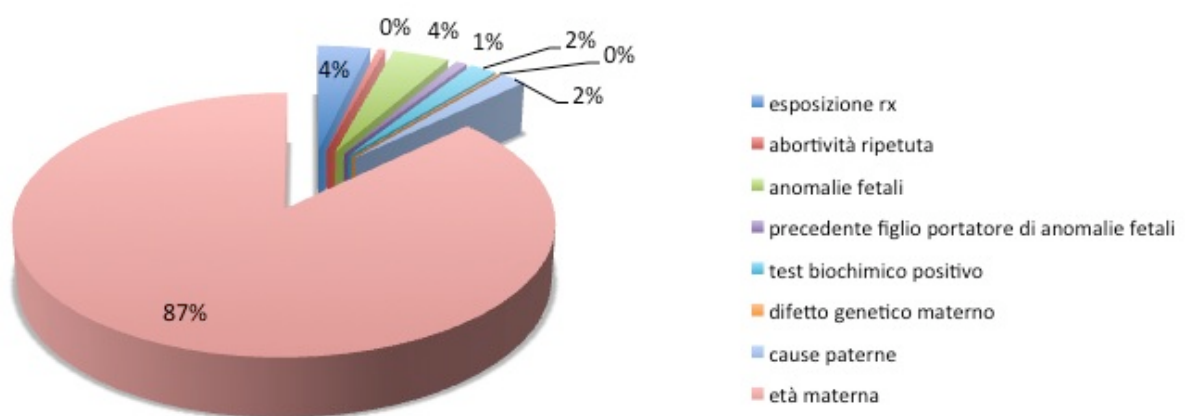


Fig. 1 Indicazioni mediche all'amniocentesi

Incidenza di alterazioni cromosomica nell'intera popolazione.

In totale nella popolazione presa in esame, abbiamo riscontrato che il cariotipo era patologico in 54 casi su 2114 amnioncentesi (2.56%); di cui 44 (2.09%) si erano sottoposte all'esame con indicazione materna e/o medica e 10 senza alcuna indicazione (0.47%) (fig.2).

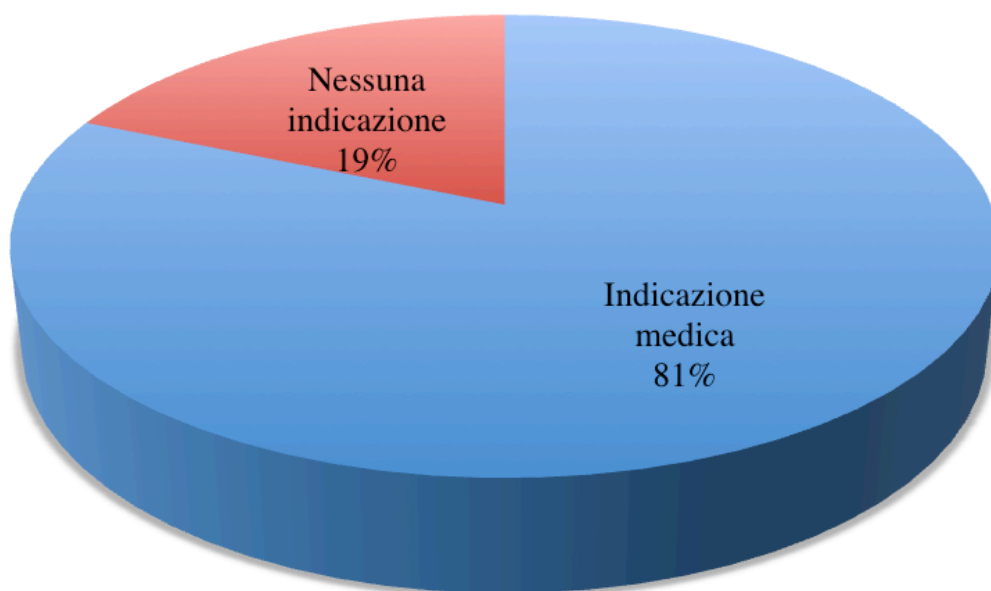


Fig.2 Incidenza cromosomopatie in base presenza o meno indicazione medica

Tuttavia, le pazienti che hanno presentato un cariotipo anomalo, l'indicazione principale rimane l'età materna con 22 casi (1.04%), (Fig. 3) e nelle pazienti che hanno effettuato l'esame senza nessuna indicazione e l'età media era 31.7 anni o inferiore non si è riscontrato nessun caso di trisomia 21 (0%).



Fig.3 Incidenza di cromosomopatie sulla base dell'età materna.

Nei 54 casi in cui è stata diagnostica una cromosomopatia le cause erano:

- 18 feti affetti da trisomia 21 (sindrome di Down);
- 6 feti affetti da trisomia 18;
- 4 feti affetti da trisomia 13;
- 8 feti affetti da sindrome di Klinefelter;
- 4 feti con traslocazione sbilanciata del cromosoma 12;
- 14 feti con alterazioni cromosomiche varie.

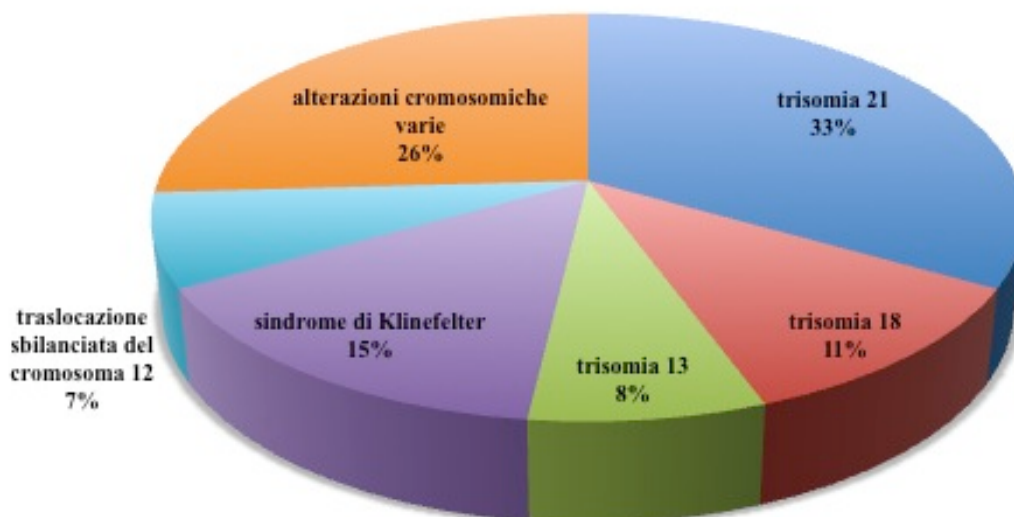


Fig.4 Incidenza delle cromosopatie

Outcomes sfavorevoli fra i due gruppi studiati

Sono stati presi in considerazione come outcomes sfavorevoli post-procedura gli aborti spontanei per pPROM.

E' emerso che:

7 pazienti su 2080 (0.33%) sono andate incontro ad aborto spontaneo per rottura intempestiva delle membrane tra la 17^a e la 18^a settimana di gestazione; di queste, 4 pazienti non avevano ricevuto alcuna terapia medica mentre 3 avevano ricevuto copertura antibiotica

In nessuno di questi 7 casi di perdite fetali post-esame il cariotipo è risultato patologico.

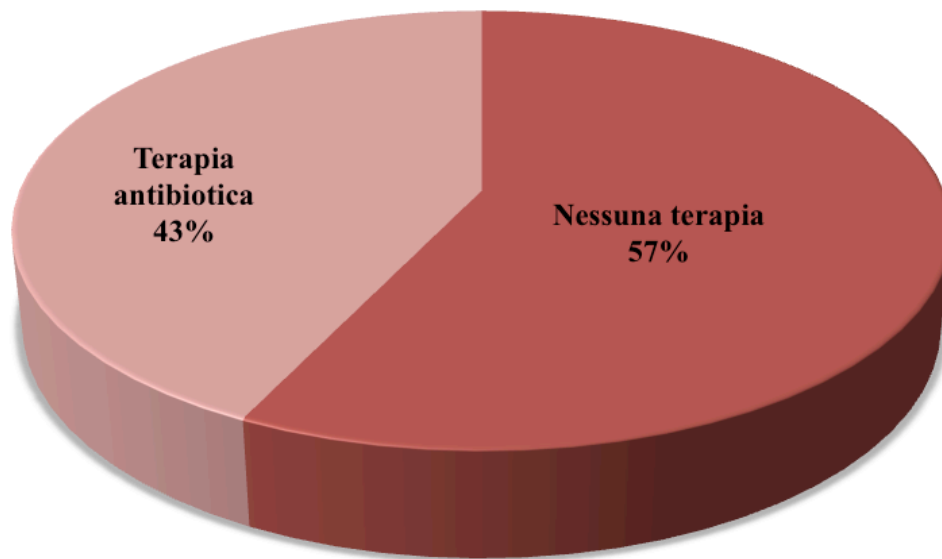


Fig. 5 Distribuzione delle pPROM tra le due popolazioni

5. DISCUSSIONE

L'indagine prenatale invasiva è ad oggi l'unico esame riconosciuto a livello internazionale per la diagnosi di certezza di cromosomopatie fetale in età endouterina. Nel nostro studio sono state considerate un totale di 2114 amniocentesi che sono state eseguite tra il 2009 ed il 2012. L'incidenza totale di anomalie cromosomiche è stata di 54 casi su 2114 (2.56%), tale percentuale risulta essere in accordo con i dati pubblicati dal Registro Toscano Difetti Congeniti secondo il quale tale percentuale è di circa 3-5%⁴⁹. Dal nostro studio è emerso che, l'incidenza di anomalie cromosomiche tra le pazienti che si sono sottoposte all'esame con indicazione materna e/o medica, era del 2.09% e quelle che avevano fatto l'esame senza indicazione era del 0.47%. Le popolazioni sono state messe a confronto mediante un test "Chi Quadrato" ed il p-value è risultato di 0.2 quindi non significativo; abbiamo successivamente confrontato le stesse popolazioni anche con un test "Chi Quadrato corretto secondo Yates" ed in questo caso il p-value è risultato 0.3 quindi non significativo. Possiamo, affermare che la differenza tra le donne che avevano eseguito l'esame su indicazione e quelle che invece si erano sottoposte per libera scelta, non è statisticamente significativa. Ciò avviene se consideriamo le anomalie cromosomiche in generale, e soprattutto quelle più frequenti che sono emerse nel nostro gruppo di studio, quali:

- 18 feti affetti da trisomia 21 (sindrome di Down);
- 6 feti affetti da trisomia 18;
- 4 feti affetti da trisomia 13;
- 8 feti affetti da sindrome di Klinefelter;
- 4 feti con traslocazione sbilanciata del cromosoma 12;
- 14 feti con alterazioni cromosomiche varie.

Analizzando invece i casi di trisomia 21 (sindrome di Down) è emerso che tale anomalia cromosomica si è verificata solo in quei casi in cui le pazienti che si erano sottoposte all'esame, presentavano come indicazione l'età materna.

Ciò trova accordo con quanto descritto in letteratura secondo cui l'incidenza della sindrome di Down aumenta significativamente con l'aumentare dell'età materna⁵⁰.

E' altresì importante rilevare che grazie agli esami di screening precoce, i casi di indicazione all'amniocentesi legati alla sola età materna si sono notevolmente ridotti e la stessa età materna \leq o $>$ di 35 anni, di per sé può non costituire un'indicazione assoluta ad eseguire diagnosi invasive. Nonostante queste premesse, va ricordato che sulla base dei nostri dati in quei casi in cui veniva eseguita l'amniocentesi per indicazione materna, l'età superiore a 35 anni costituiva di per sé una pregiudiziale per una

possibile positività a cromosomopatie. Infatti, in donne che hanno eseguito l'amniocentesi con età inferiore a 35 anni, non sono state riscontrate cromosomopatie.

Considerando infine, gli outcomes sfavorevoli post-procedura è emerso che 7 pazienti su 2080 (0.33%) sono andate incontro ad aborto spontaneo in seguito a rottura intempestiva delle membrane (tra la 17^a e la 18^a settimana di gravidanza). Nel nostro istituto la percentuale di perdita fetale post-amniocentesi è inferiore a quella descritta in letteratura, infatti, una revisione sistematica del 2007⁵¹ ha preso in considerazione gli studi pubblicati dal 1995 sulle complicanze legate all'amniocentesi eseguita sotto guida ecografica tra 14 e 24 settimane di gravidanza. Nella revisione sono stati inclusi 29 studi, di cui solo 5 con gruppo di controllo e la percentuale di perdite fetali risultante dalla metanalisi degli studi è stata dello 0.6% entro 14 giorni dall'esecuzione.

Dall'analisi dei dati da noi raccolti è emerso inoltre che, su 7 casi di perdita fetale, in seguito a rottura prematura delle membrane, il cariotipo non era patologico in nessun caso. Nella nostra casistica l'incidenza d'aborto post amniocentesi (0.33%), è inferiore all'incidenza riferita alla popolazione generale (0.5-1%) negli studi internazionali. Questo non ci deve indurre a errate conclusioni. Ad oggi infatti non sono disponibili dati

reali sull'incidenza di aborto spontaneo nella nostra popolazione a 20-22 sett periodo in cui sarebbe possibile verificare gli effetti dell'amniocentesi.

Questa differenza può trovare diverse giustificazioni; la più verosimile è che probabilmente nella nostra popolazione l'incidenza di aborto spontaneo è realmente più basso. Altra ipotesi più suggestiva ma da verificare con eventuali studi da condurre su più ampia scala, è il fatto che donne che si sottopongono all'esame invasivo sono monitorizzate con molta più attenzione ed esse stesse risultano più sensibili a sintomi e segni che permettono la diagnosi più precoce di minaccia di aborto.

Con un numero di outcome avversi, la verifica sul possibile ruolo protettivo di una copertura antibiotica contro il verificarsi di eventi avversi quali la rottura prematura delle membrane pPROM, risulta quindi impossibile. Il valore limitato (0.3%) anche se costituisce certamente un motivo di vanto per il nostro Centro, rappresenta in sé un grosso limite per una valutazione statistica. Nel 2009 Giorladino⁵² pubblicò un interessante lavoro su oltre 36000 amniocentesi dove asseriva che la copertura antibiotica poteva costituire un utile presidio per ridurre i casi di pPROM post-amniocentesi. In realtà questa stessa pubblicazione è stata da più gruppi fortemente contestata e ad oggi non esistono delle linee internazionali che suggeriscano un comportamento da seguire univoco. Il nostro studio, dato il numero limitato di eventi avversi, con valori non statisticamente accettabili, non può costituire un utile supporto per la decisione clinica di

una copertura antibiotica o meno seppur anche nel nostro caso le pazienti che hanno usufruito della copertura antibiotica hanno avuto una minor incidenza di pPROM.

6. CONCLUSIONI

Nella Diagnostica Prenatale e in Medicina fetale, in caso in cui vi siano chiare indicazioni, è sicuramente opportuno riconsiderare la reale pericolosità di una metodica invasiva quale l'amniocentesi soprattutto in centri di 3° livello come il nostro dove anche l'esperienza pluriennale degli operatori gioca un ruolo importante. È da tener presente, che nonostante nella nostra popolazione l'incidenza sia più bassa rispetto a quella riportata in letteratura, l'amniocentesi non è scevra da rischi. Quindi deve rappresentare, oggi, un metodo valido per la diagnosi di anomalie cromosomiche e/o genetiche solo quando vi è chiara necessità, infatti è emerso che nel 97% dei casi presi in esame il cariotipo non era patologico.

Infine la copertura antibiotica pre-amniocentesi non risulta clinicamente dimostrato avere un effetto protettivo ma in linea teorica, seguendo le pubblicazioni già in letteratura ed il nostro studio, può costituire un utile supporto per la riduzione delle pPROM.

Concludendo possiamo affermare l'importanza di una corretta informazione e di un corretto counselling genetico pre-esame, con lo scopo di guidare la donna verso una scelta corretta, responsabile e consapevole limitando quindi l'accesso inappropriato alle procedure invasive, con un evidente risparmio in termini di salute e risorse.

7. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Bischoff FZ. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. 2005;
- ² R.T.D.C. , 2007;
- ³ Snijders RJM, Nicolaides KH, maternal age and gestation- specific risk for trisomy 21, *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;
- ⁴ Spenser K, Nicolaides KH, sceening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free b-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A, *ultrasound Obtet Gynecol* 1999;
- ⁵ Spenser K, Nicolaides KH, screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: a review of three years prospective experience, 2003;
- ⁶ Cicero S, Nicolaides KH, absence of nasal bone in fetuses whit trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation, an observational study, *lancet* 2001;
- ⁷ Borrell A, Martinez JM, ductus venosus assessment at the time of nuchal translucency measurement in the detection of fetal aneuploidy, *Prenat Diagn* 2003;
- ⁸ Cicero S, Nicolaides KH, maxillary length at 11-14 weeks of gestation in fetuses with trisomy 21, *ultrasound obstet gynecol* 2004;
- ⁹ Nicolaides KH, fetal nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities, 2004;
- ¹⁰ Michailidis GD, nuca translucency measurement and pregnancy outcome in karyotypically normal fetuses, 2001;
- ¹¹ Smith-Bindam R, prenatal screening for Down's syndrome in Englad and Wales and population-based birth outcomes, 2003;
- ¹² Simpson JL, Bischoff FZ. Cell-free fetal DNA in maternal blood: evolving clinical applications. 2004;

-
- ¹³ Caughey AB, Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. 2006;
- ¹⁴ Linee guida S.I.E.O.G., società italiana di ecografia ostetrica e ginecologica, edizione 2006;
- ¹⁵ Nicolaides KH, Sebire NJ, Down's syndrome screening with nuchal translucency, Lancet 1997;
- ¹⁶ Benn PA, prenatal diagnosis, 2001;
- ¹⁷ Perona M, un programma di screening prenatale per la trisomia 21, ligand assay, 2004;
- ¹⁸ Dugoff L, Hobbins J, Invasive procedures to evaluate the fetus, 2002;
- ¹⁹ Los FJ, Wildschut HI, The diagnostic performance of cytogenetic investigation in amniotic fluid cells and chorionic villus, 2001;
- ²⁰ Hultén MA, rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders, 2003;
- ²¹ Nicolini U, The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. Hum Reprod Update 2004;
- ²² Franchi P, Palka G, nuovi orizzonti della diagnosi prenatale l'esperienza nella regione Abruzzo, Riv it Ost Gin 2007;
- ²³ Aron B, chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss, 2006;
- ²⁴ Linee guida S.I.Di.P., società italiana di piagnosi prenatale e Medicina materno-fetale, edizione 2006;
- ²⁵ Papp C, chorionic villus sampling and amniocentesis: invasive procedures and their risks in current prenatal diagnostic practice, 2004;
- ²⁶ Ludomirsky A, intrauterine fetal blood sampling a multicentric registry: evaluation of 7462 procedures between 1987 and 1991, 1993;

-
- ²⁷ Weisz B, Rodech CH, invasive diagnostic procedures in twin pregnancies; 2005
- ²⁸ Linee guida S.I.Di.P., società italiana di piagnosi prenatale e Medicina materno-fetale, edizione 2006;
- ²⁹ Tavole ISTAT, dimissione dagli istituti di cura per aborto spontaneo in Italia, 2005;
- ³⁰ Silver RH, a comparison of trnscervical and transabdominal chorionic villus sampling loss rates in 900 cases from a single center, 1995
- ³¹ Evans MI, Invasive prenatal diagnostic procedures, 2005;
- ³² Mujeznovic F, procedure related complication of amniocentesis and chorionic villous sampling, 2007;
- ³³ Papp C, chorionic villus sampling and amniocentesis: invasive procedures and their risks in current prenatal diagnostic practice, 2004;
- ³⁴ WHO/PAHO consultation on CVS, evaluation of chorionic villussampling safety, prenat diagn 2000;
- ³⁵ Weisz B, Rodech CH, invasive diagnostic procedures in twin pregnancies; 2005
- ³⁶ Royal college of obstetricians and gyaecologists, amniocentesis and chorionic villus sampling, guidelines 2005;
- ³⁷ The Canadian Early and Midtrimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group, Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis, lancet 1999;
- ³⁸ Linee guida S.I.Di.P., società italiana di piagnosi prenatale e Medicina materno-fetale, edizione 2006;
- ³⁹ Tavole ISTAT, dimissione dagli istituti di cura per aborto spontaneo in Italia, 2005;
- ⁴⁰ Censimento SIGU 2004, strutture di Genetica Medica in Italia;

-
- ⁴¹ Mujeznovic F, procedure related complication of amniocentesis and chorionic villous sampling, 2007;
- ⁴² Tabor A, Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 genetic amniocentesis in low-risk women, lancet 1986;
- ⁴³ Tabor A, Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 genetic amniocentesis in low-risk women, lancet 1986;
- ⁴⁴ Papp C, chorionic villus sampling and amniocentesis: invasive procedures and their risks in current prenatal diagnostic practice, 2004;
- ⁴⁵ Palka G, relazione tra età materna e frequenza della sindrome di Down, 1987;
- ⁴⁶ Roizen NT, Down's sindrome, lancet 2003;
- ⁴⁷ Nicolaidis I, screening for chromosomal defects, ultrasound obstet gynecol 2003;
- ⁴⁸ Franchi P, Palka G, nuovi orizzonti della diagnosi prenatale l'esperienza nella regione Abruzzo, Riv it Ost Gin 2007;
- ⁴⁹ R.T.D.C 2007;
- ⁵⁰ Nicolaidis I, screening for chromosomal defects, ultrasound obstet gynecol 2003;
- ⁵¹ Mujeznovic F, procedure related complication of amniocentesis and chorionic villous sampling, 2007;
- ⁵² Giorlandino C, Antibiotic prophylaxis before second-trimester genetic amniocentesis (APGA): a single-centre open randomised controlled trial, Prenat Diagn. 2009 Jun;29(6):606-12.
- ⁵³ Position Statement from the Italian College of Fetal Maternal Medicine Non-invasive prenatal testing (NIPT) by maternal plasma DNA sequencing. J Prenat Med. 2013 Apr-Jun; 7(2): 19–20.