

FORTUNATO VESCE

**DIAGNOSI PRENATALE:  
STATO DELL'ARTE**

FERRARA, 21 MARZO 2014

- Rischio correlato alla diagnosi prenatale
  - Ipotesi patogenetiche
- Possibili terapie per ridurre il rischio di aborto

# **MISTERO DELL'ABORTIVITÀ IATROGENICA**

<b>Metodica utilizzata</b>	<b>Rischio aggiuntivo di aborto o morte iu. fetale</b>
<b>Amniocentesi</b>	<b>0.4 – 0.9 %</b>
<b>Biopsia placentare tardiva</b>	<b>0.44 %</b>
<b>Villocentesi</b>	<b>0.99 %</b>
<b>Cordocentesi</b>	<b>0.75 %</b>

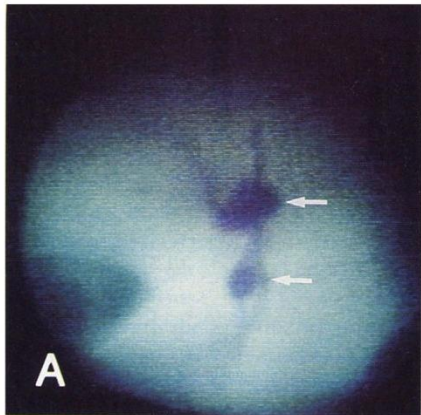
*(Bettelheim D et al. Complication rates of invasive intrauterine procedures in a centre for prenatal diagnosis and therapy. Ultraschall Med. 2002).*

<b>Metodica utilizzata</b>	<b>Percentuale di aborto (totale!)</b>
<b>Villocentesi transcervicale</b>	<b>10,9 %</b>
<b>Villocentesi transaddominale</b>	<b>6,3 %</b>
<b>Amniocentesi</b>	<b>6,4 %</b>

*(Smidt-Jensen SL et al. Randomized comparison of transabdominal, transcervical chorionic villi sampling and amniocentesis. Ugeskr Laeger. 1993).*

<b>Villocentesi transcervicale</b>	<b>7,7% (rischio aggiuntivo)</b>
<b>Villocentesi transaddominale</b>	<b>3,7% (rischio aggiuntivo)</b>

*(Smidt-Jensen SL et al. Randomized comparison of transabdominal, transcervical chorionic villi sampling and amniocentesis. Ugeskr Laeger. 1993).*



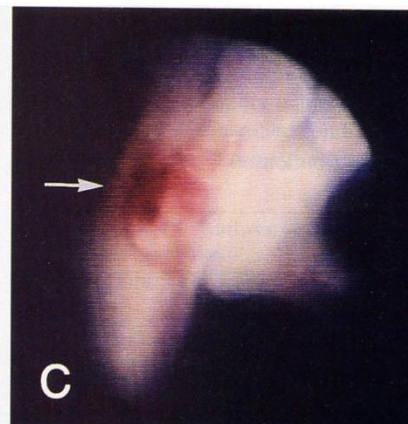
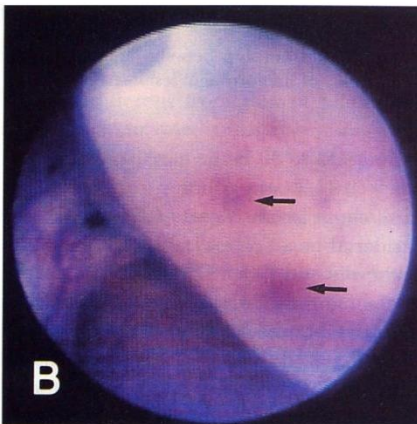
**Quintero RA. et al.  
Embryoscopic demonstration of  
hemorrhagic lesions on the human  
embryo after placental trauma. Am J  
Obstet Gynecol 1993 Mar;168:756-9.**

**Lesioni emorragiche dopo CVS:**

**A - lungo i vasi della fronte  
dell'embrione**

**B – sull'eminenza malare sinistra**

**C – sul dorso del piede sinistro**

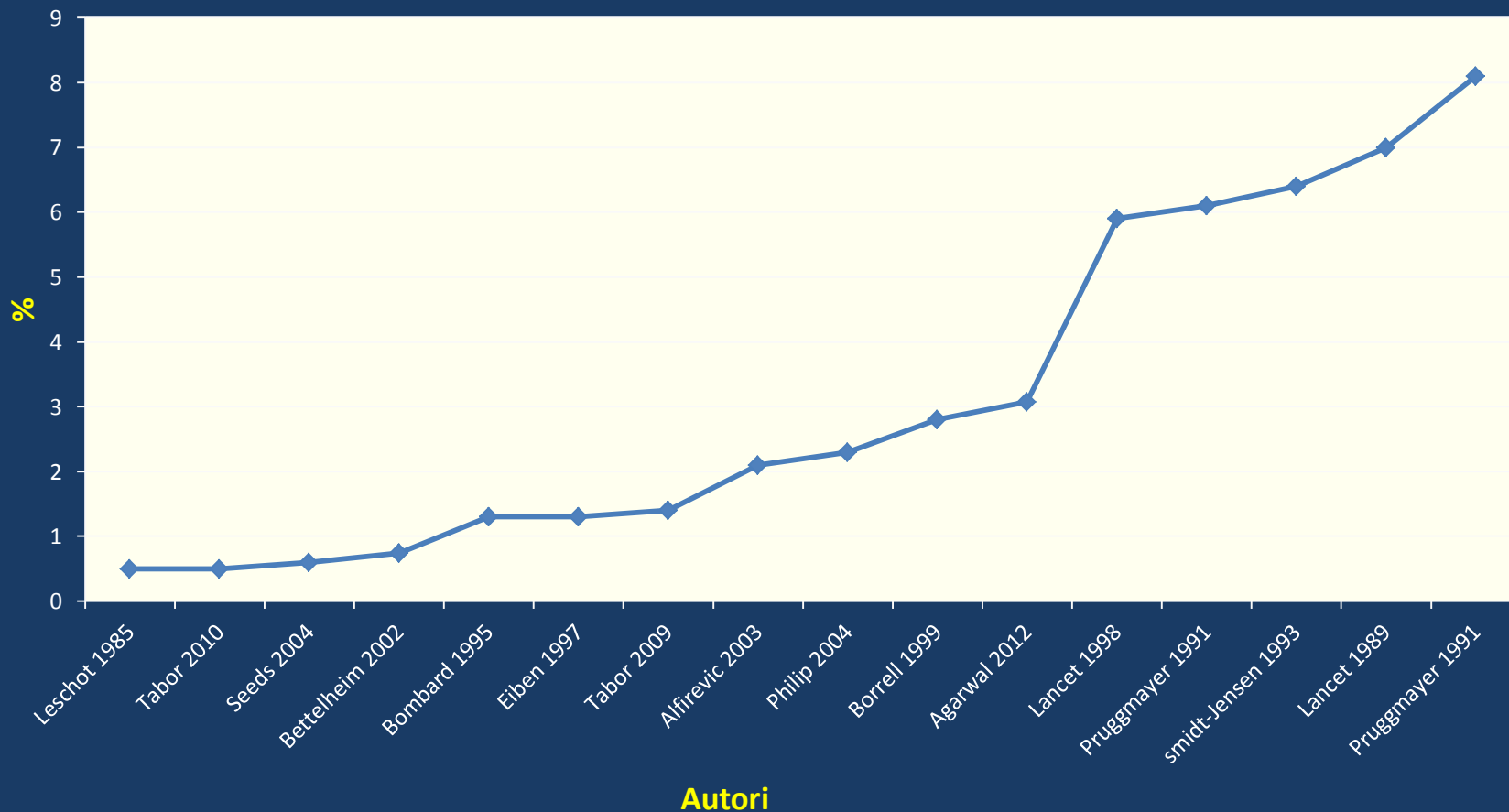


## Amniocentesi Abortività

<b>Leschot 1985</b>	<b>0,5%</b>
<b>Tabor 2010</b>	<b>0,5-1%</b>
<b>Seeds 2004</b>	<b>0,6%</b>
<b>Bettelheim 2002</b>	<b>0,74%</b>
<b>Bombard 1995</b>	<b>1,3%</b>
<b>Eiben 1997</b>	<b>1,3%</b>
<b>Tabor 2009</b>	<b>1,4%</b>
<b>Alfirevic 2003</b>	<b>2,1%</b>
<b>Philip 2004</b>	<b>2,3%</b>
<b>Borrell 1999</b>	<b>2,8%</b>
<b>Agarwal 2012</b>	<b>3,07%</b>
<b>Lancet 1998</b>	<b>5,9%</b>
<b>Pruggmayer 1991 (20 sett.)</b>	<b>6,1%</b>
<b>smidt-Jensen 1993</b>	<b>6,4%</b>
<b>Lancet 1989</b>	<b>7%</b>
<b>Pruggmayer1991 (28 sett.)</b>	<b>8,1%</b>



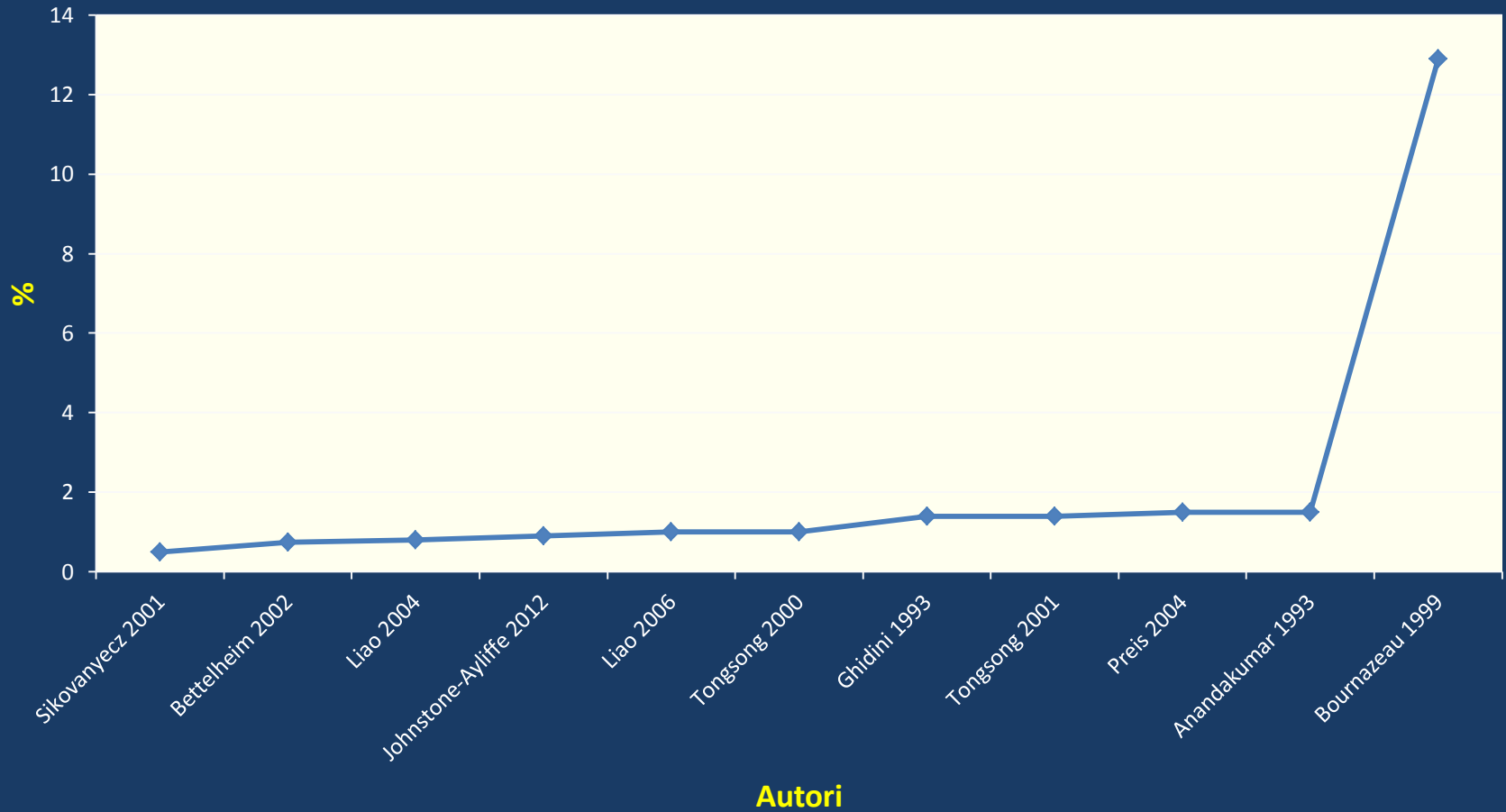
# Rischio di aborto correlato ad AMNIOCENTESI



## Cordocentesi

<b>Sikovanyecz 2001</b>	<b>0,5%</b>
<b>Bettelheim 2002</b>	<b>0,75%</b>
<b>Liao 2004</b>	<b>0,8%</b>
<b>Johnstone-Ayliff 2012</b>	<b>0,9%</b>
<b>Liao 2006</b>	<b>1%</b>
<b>Tongsong 2000</b>	<b>1%</b>
<b>Ghidini 1993</b>	<b>1,4%</b>
<b>Tongsong 2001</b>	<b>1,4%</b>
<b>Preis 2004</b>	<b>1,5%</b>
<b>Bournazeau 1999</b>	<b>12,9%</b>
<b>Anandakumar 1993</b>	<b>1,5%</b>

# Rischio di aborto correlato a CORDOCENTESI



<b>Amniocentesi vs controlli (rischio aggiuntivo aborto)</b>	<b>RR</b>
<b>2.1.% vs 1.3 %</b>	<b>1.02</b>
<b>Amniocentesi precoce vs amniocentesi (rischio aggiuntivo pregnancy loss)</b>	<b>RR</b>
<b>7.6 % vs 5.9 %</b>	<b>1.29</b>
<b>Villocentesi transcervicale vs amniocentesi (<i>rischio aggiuntivo pregnancy loss</i>)</b>	<b>RR</b>
<b>14.5% vs 11%</b>	<b>1.40</b>

*(Alfirevic Z et al. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database Syst Rev. 2003).*

# IPOSTESI PATOGENETICHE

- Stimolo meccanico
- Stimolo proinfiammatorio
- Risultato operatore dipendente?



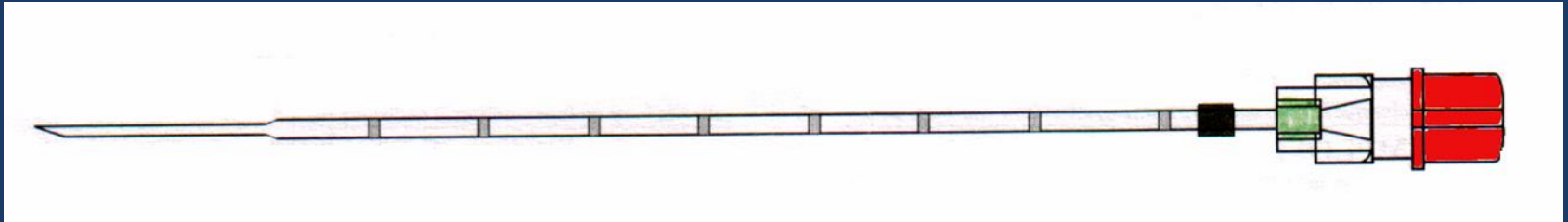
**Gli operatori esperti hanno una minore incidenza di complicanze.**

*(Tabor A. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. Fetal Diagn Ther. 2010).*

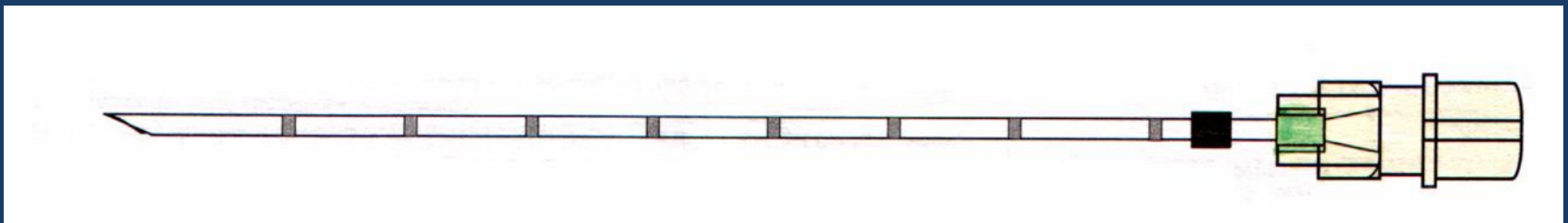
## PREVENZIONE DELL'ABORTO

- TECNICA
- TERAPIA

# AGO VARIATO 22-24 Gauge



# AGO 22 Gauge



# AMPICILLINA

Inibisce il rilascio di IL-6 dalle cellule amniotiche, sia in vitro che in donne sottoposte ad amniocentesi.

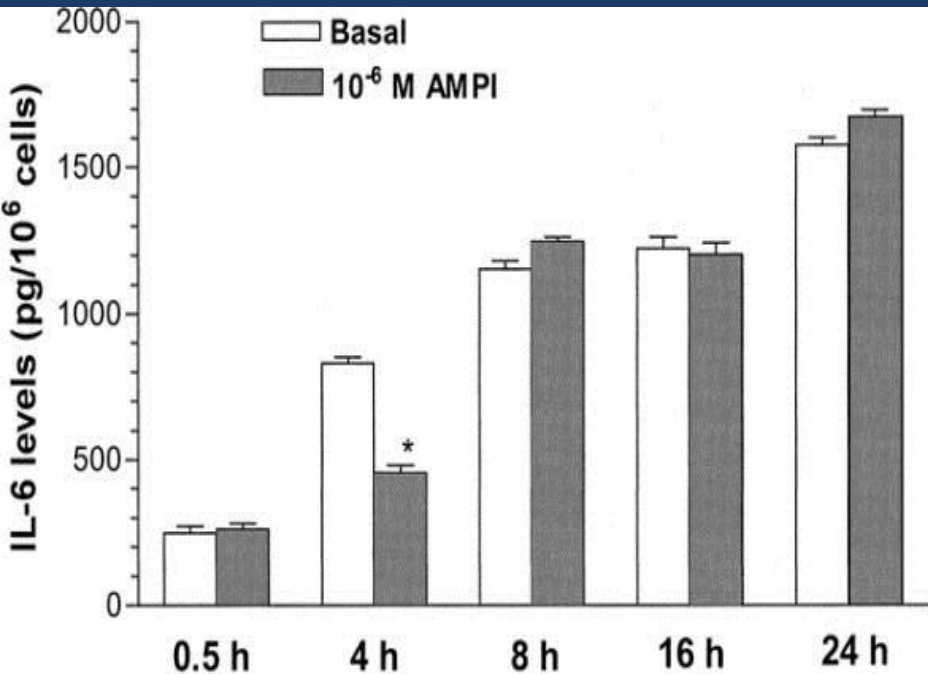
*(Vesce F et al. Inhibition of Amniotic Interleukin-6 and Prostaglandin E<sub>2</sub> Release by Ampicillin. Am J Obstet Gynecol. 2004).*

Inibisce direttamente il rilascio di PGE dai tessuti Gestazionali IN VITRO E IN VIVO

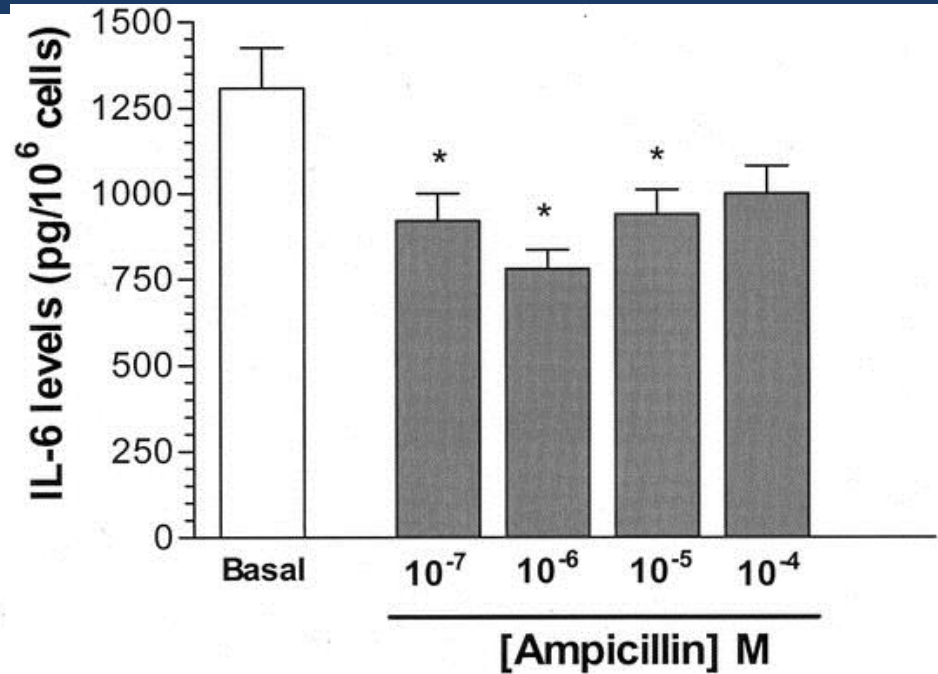
*(Vesce F et al. Inhibition of amniotic prostaglandin E release by Ampicillin. Obstet Gynecol. 1998).*



# Inhibition of amniotic interleukin-6 and prostaglandin E2 release by ampicillin.

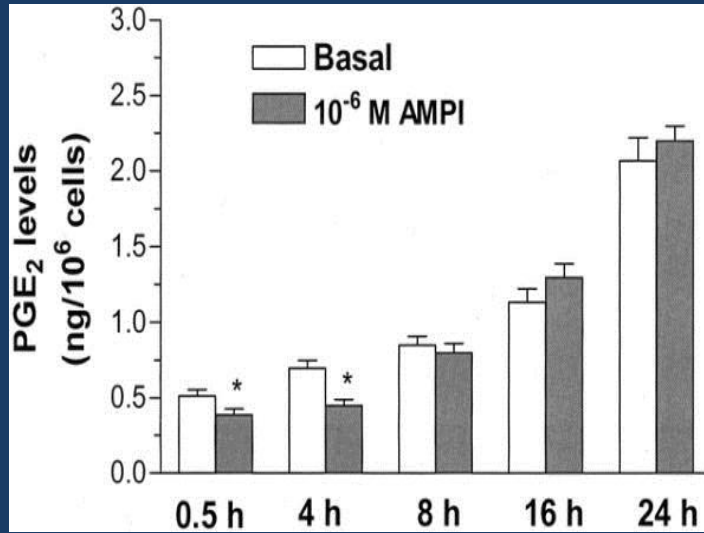


Time course of interleukin-6 (IL-6) release from Wistar Institute Susan Hayflick cells in the absence (white bars) and the presence (gray bars) of 10<sup>-6</sup> M ampicillin (AMPI). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of 3 independent experiments performed on different cell cultures.

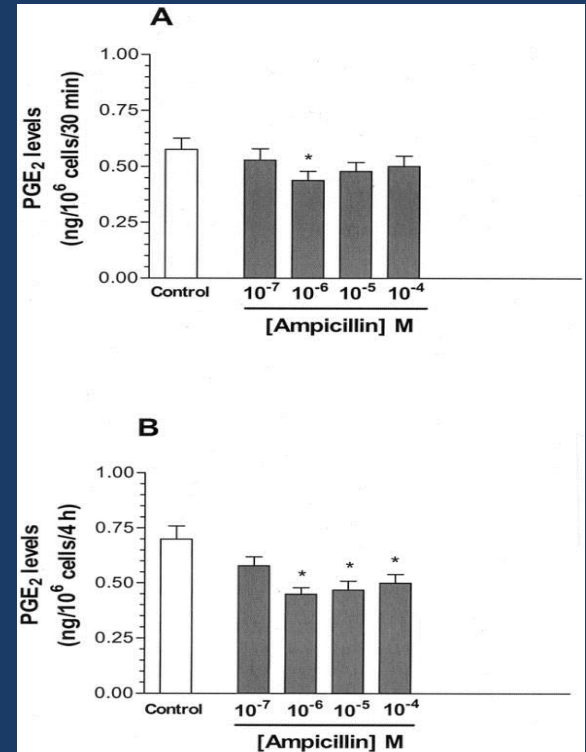


Effect of increasing concentrations of ampicillin on interleukin-6 (IL-6) release from Wistar Institute Susan Hayflick cells after 4 hours of incubation. Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of 4 independent experiments performed on different cell cultures.

# Inhibition of amniotic interleukin-6 and prostaglandin E2 release by ampicillin.



Time course of prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) output from Wistar Institute Susan Hayflick cells, in the absence (white bars) and the presence (gray bars) of 10<sup>-6</sup> M ampicillin (AMPI). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of 3 independent experiments performed on different cell cultures.

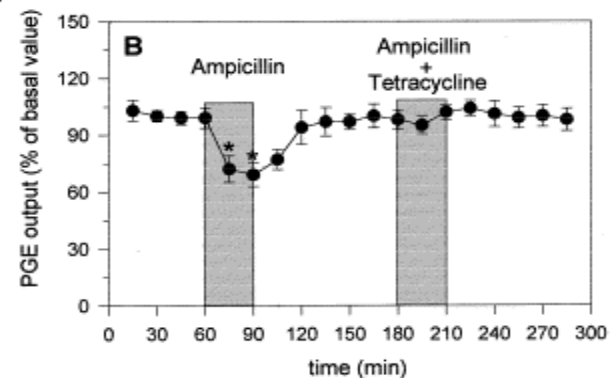
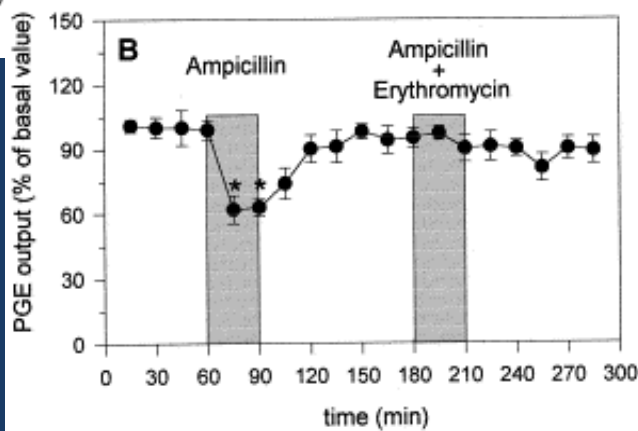
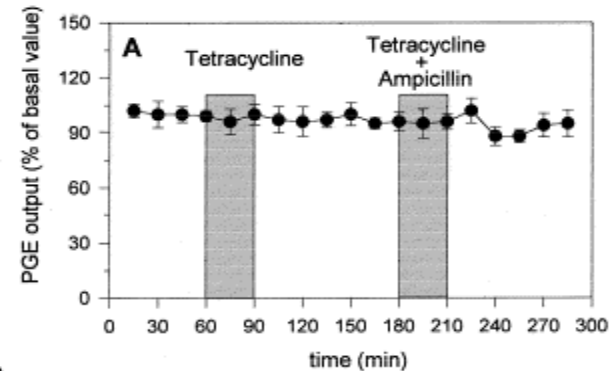
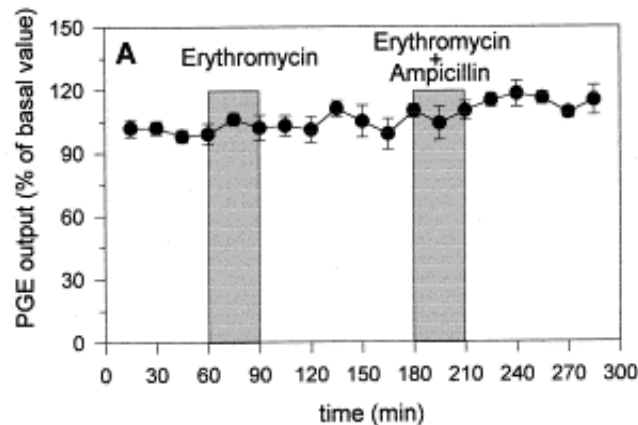
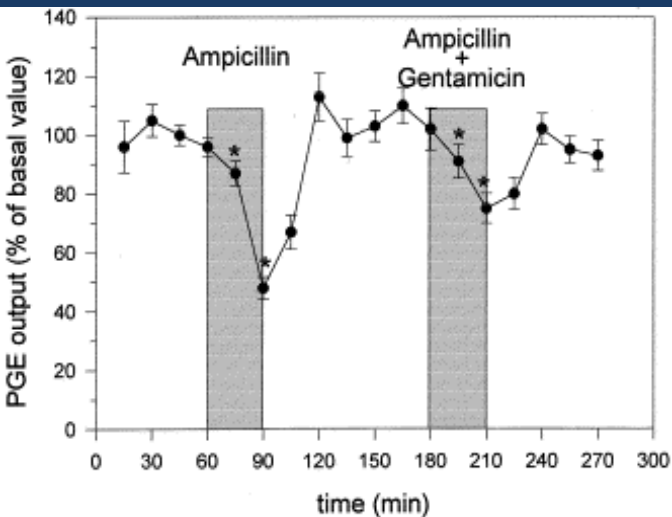


Effect of increasing concentrations of ampicillin on the prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) output from Wistar Institute Susan Hayflick cells at 30 minutes (A) and at 4 hours (B). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of 4 independent experiments performed on different cell cultures.

Vesce F et al.

Effect of different classes of antibiotics on amniotic prostaglandin E release.

Obstet Gynecol 1999.



*Vesce F et al.*  
*Effect of different classes of antibiotics on*  
*amniotic prostaglandin E release.*  
*Obstet Gynecol 1999*

- **Ceftriaxone e Gentamicina inibiscono il rilascio della PGE sebbene siano meno efficaci dell'ampicillina.**
- **Tetraciclina e eritromicina non inibiscono il rilascio di PGE.**
- **Ampicillina e ceftriaxone esercitano un effetto additivo.**
- **Gentamicina ed Eritrocina annullano l'effetto inibitorio dell'ampicillina.**

Giorlandino C., et al Prenatal Diagnosis 2009 Jun;29(6):606-12.  
**Antibiotic prophylaxis before second-trimester genetic amniocentesis (APGA): a single-centre open randomised controlled trial.**

34,923 women were enrolled, 21,991 were assigned to treatment group and 12,932 were assigned to the control group.

Azithromycin, 500 mg per day, 3 days before amniocentesis.

Abortion rate related to the amniocentesis: **7/21 219 (0.03%)** in the intervention group, and **36/12 529 (0.28%)** in controls ( $p = 0.0019$ ).

The rate of preterm premature rupture of membranes was **14/21 219 vs. 140/12 529 (1.12%)** ( $p = 0.001$ ).

SE L'INFIAMMAZIONE HA UN  
RUOLO PATOGENETICO  
PREMINENTE  
ESISTONO  
TERAPIE ALTERNATIVE AGLI  
ANTIBIOTICI  
ANTI PG E ANTI IL?

Gynecol Obstet Invest 2011;71(1):1-10.

Anticytokine therapy in preterm labor: current knowledge and future perspectives.

Sado T., et al

**Bikunin** suppressed the increase in plasma and amniotic fluid concentrations of IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and local prostaglandin production after the LPS dosing [42,43].

# *Anti-IL-6 Antibody*

- **tocilizumab** (anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody) **inhibits IL-6-induced MMP-2 and MMP-9 secretions from human amnion cells in pPROM [34]**. No animal models were reported in the literature.



# LATTOFERRINA

Glicoproteina endogena chelante il ferro, appartenente alla famiglia delle Transferrine.

Possiede proprietà:

- Anti-infiammatorie
- Anti-microbiche
- Immunomodulatorie

# ATTUALI IMPIEGHI IN GRAVIDANZA

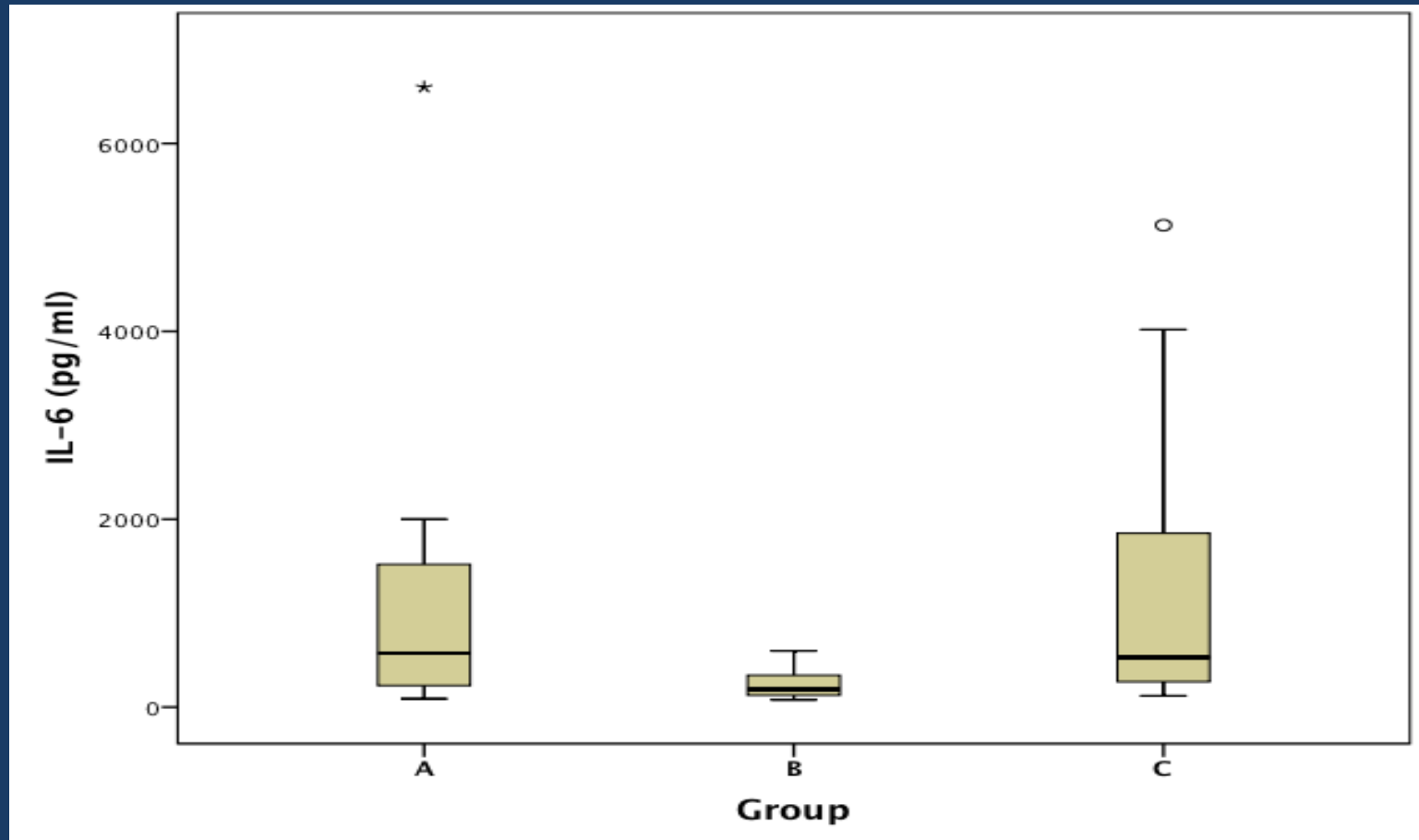
- Integratore di ferro per sindromi anemiche
- Trattamento e prevenzione delle infezioni vaginali
- Coadiuvante nell'infertilità

Studio condotto su 60 pazienti alla 16° settimana di gestazione sottoposte ad amniocentesi, trattate con 300 mg di Lf intravaginale.

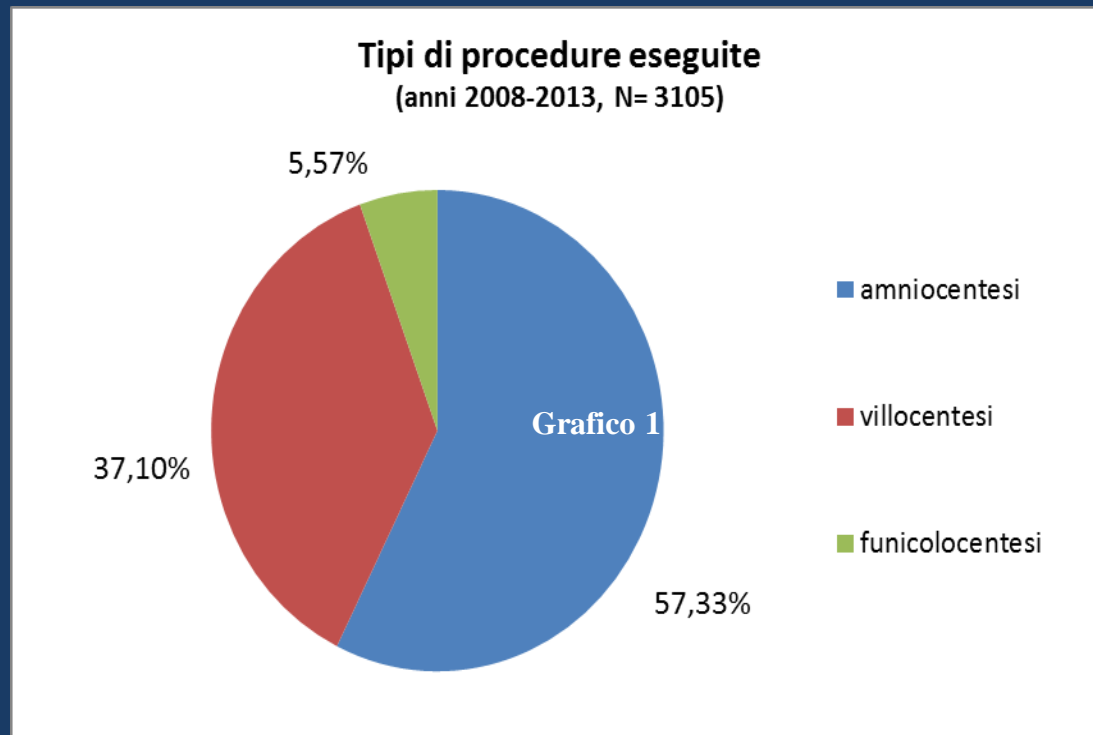
3 gruppi:

- Gruppo A pazienti non trattate
- Gruppo B pazienti trattate 4 h prima dell'amniocentesi
- Gruppo C pazienti trattate 12 h prima dell'amniocentesi.

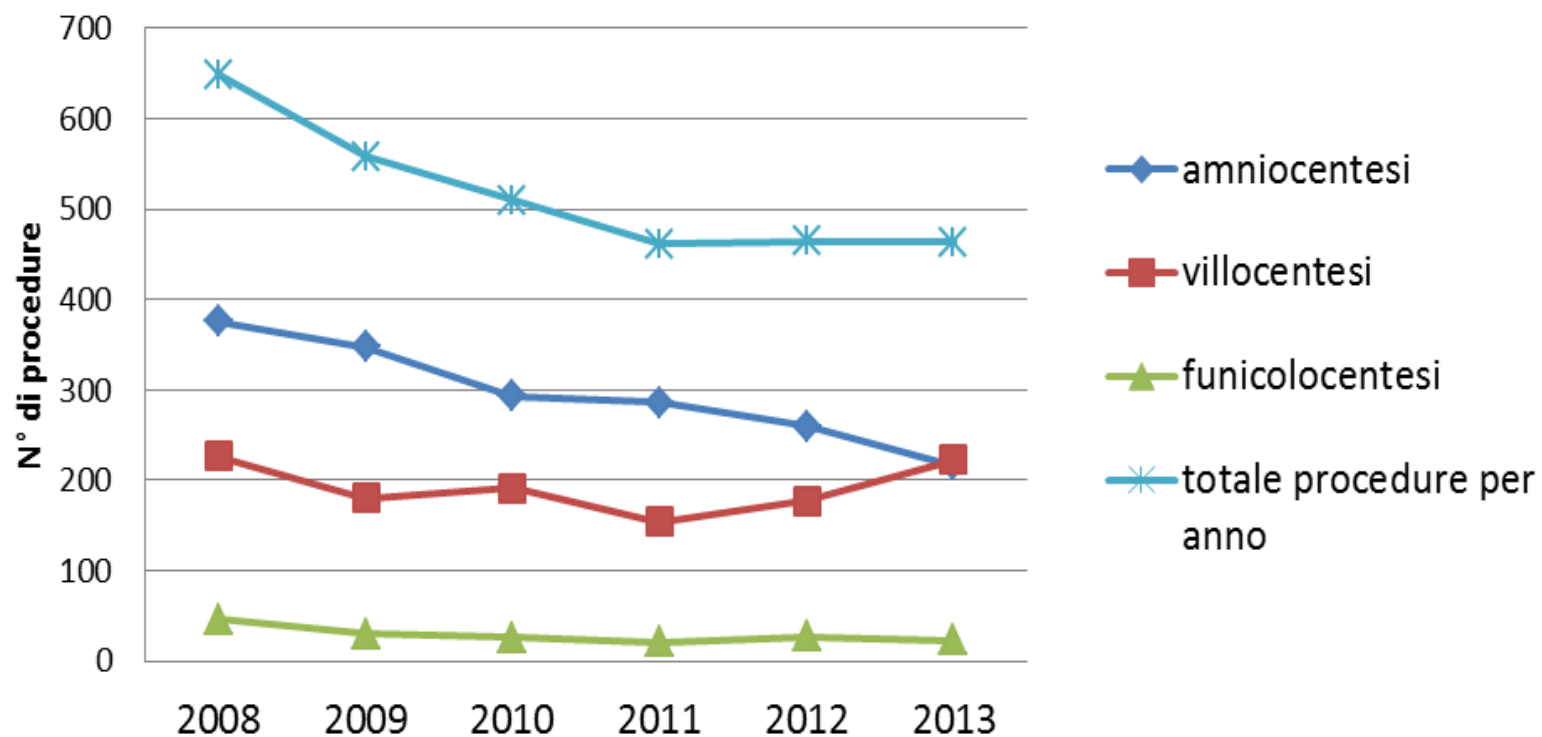
# Rappresentazione grafica della distribuzione dei valori medi di IL-6 nei tre gruppi



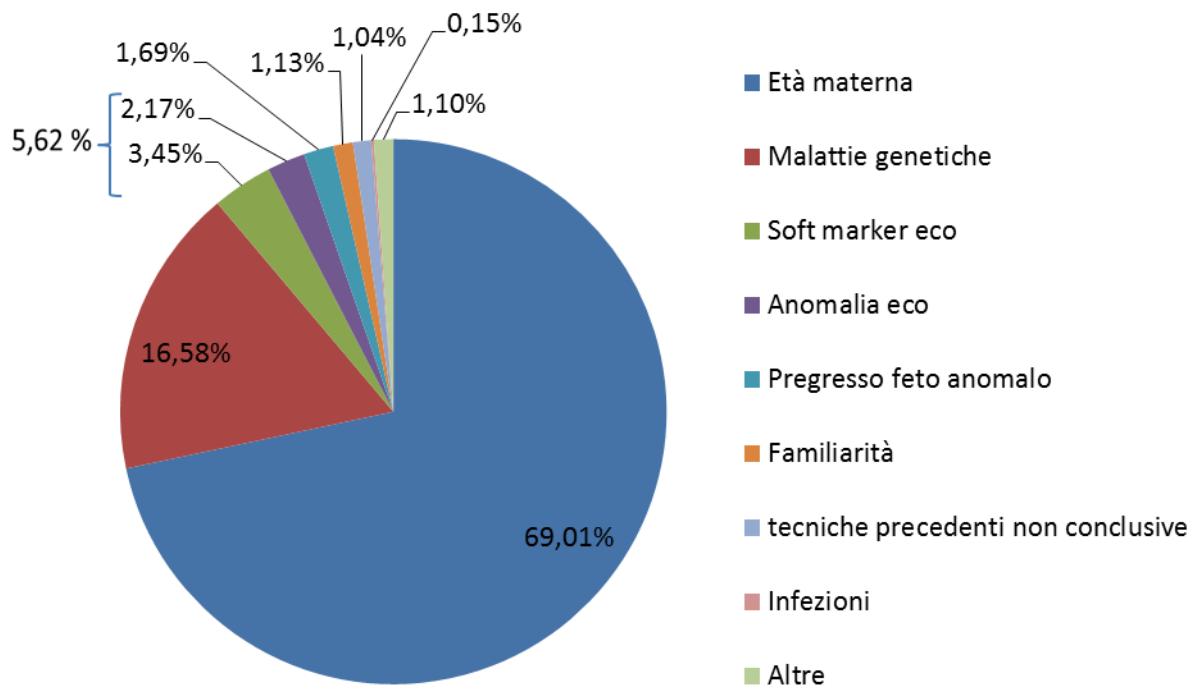
Dal 2008 al 2013, Arcispedale S. Anna di Ferrara 3105 prelievi, di cui 1780 amniocentesi (57,33% ); 1152 villocentesi (37,10%) e 173 funicolocentesi (5,57%) (grafico 1).



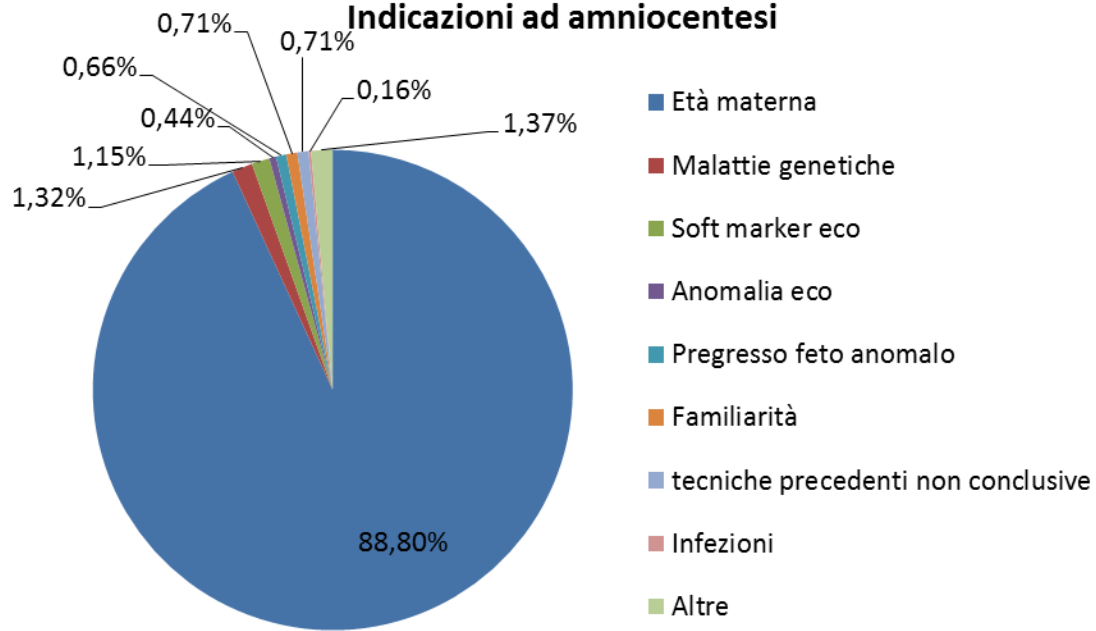
## Andamento del n° dei singoli tipi di procedure eseguite negli anni 2008 - 2013



## Indicazioni alla diagnosi prenatale invasiva

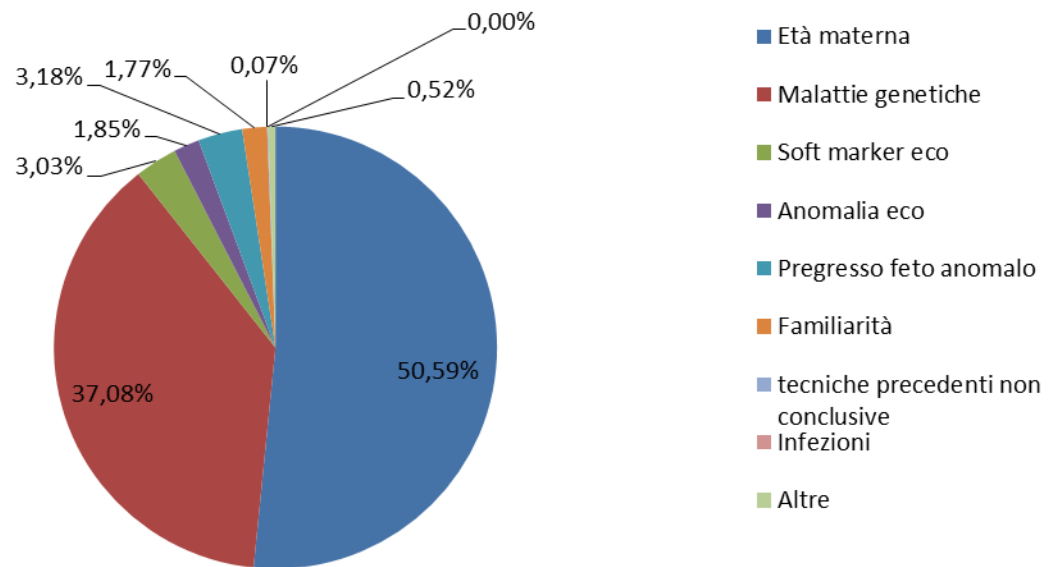


### Indicazioni ad amniocentesi

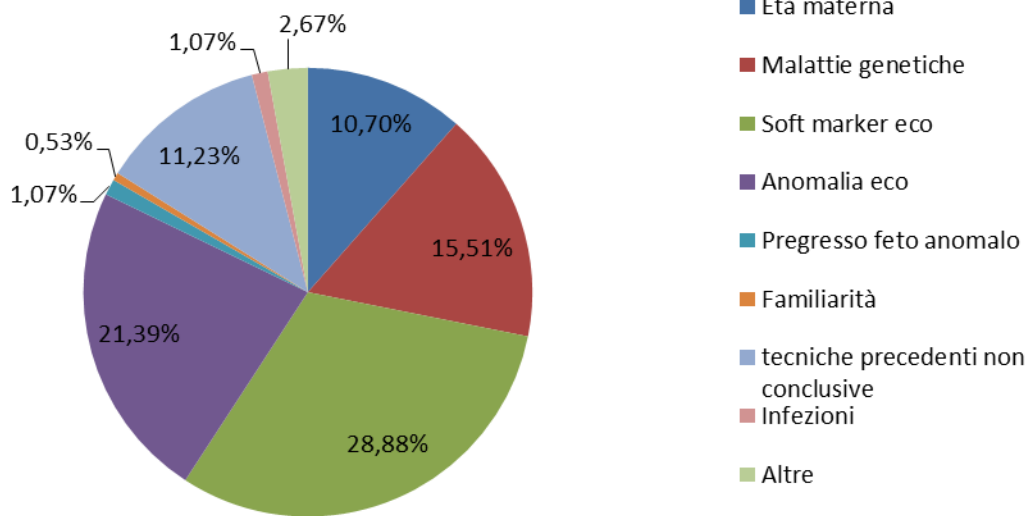




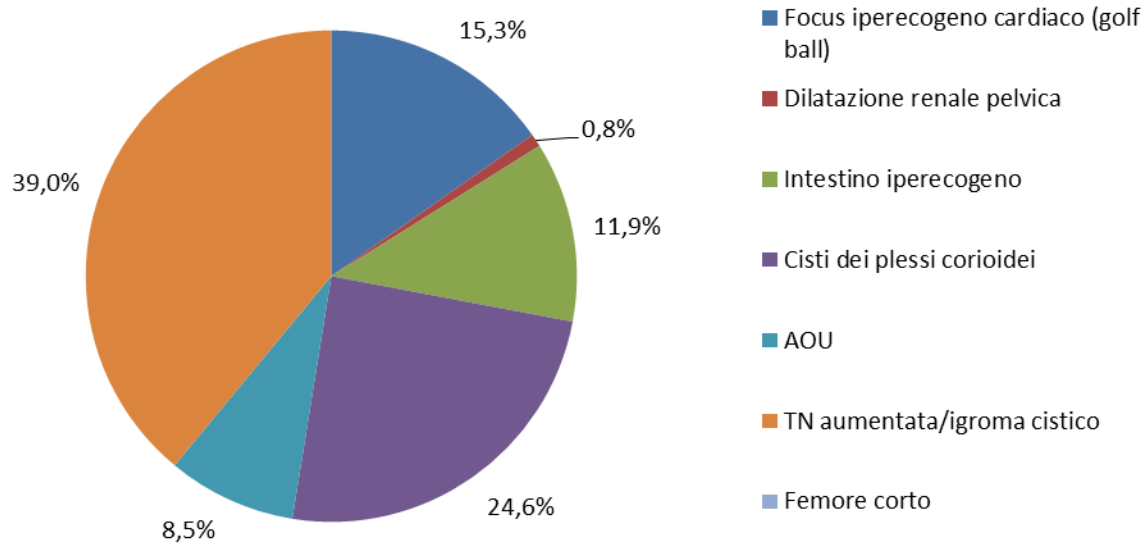
## Indicazioni a Villocentesi



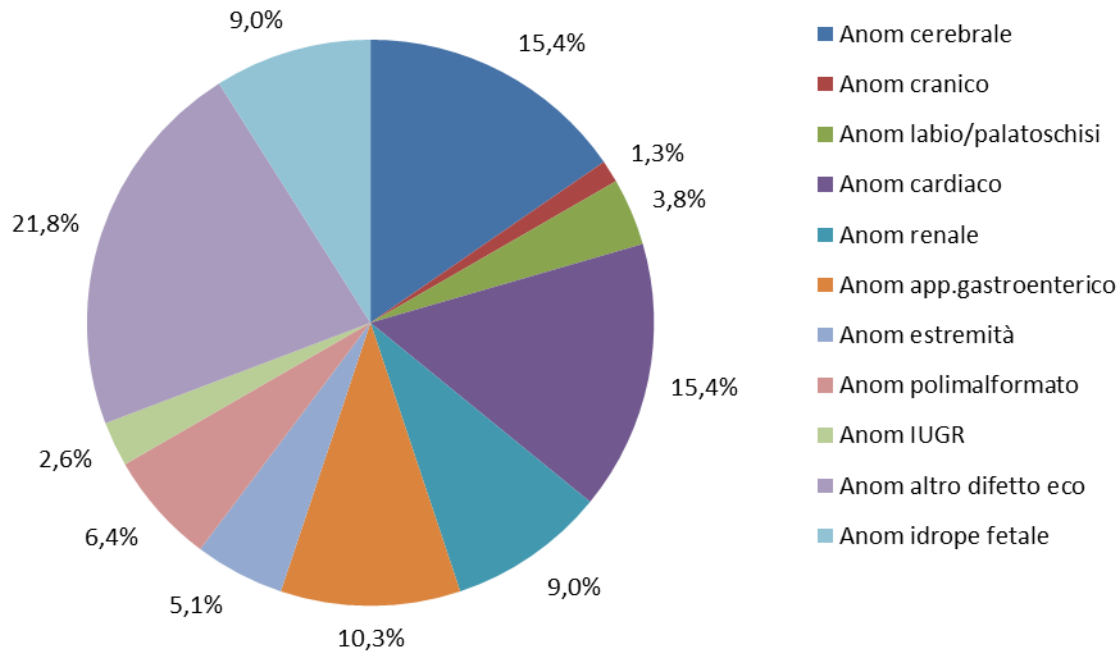
### Indicazioni a Funicolocentesi



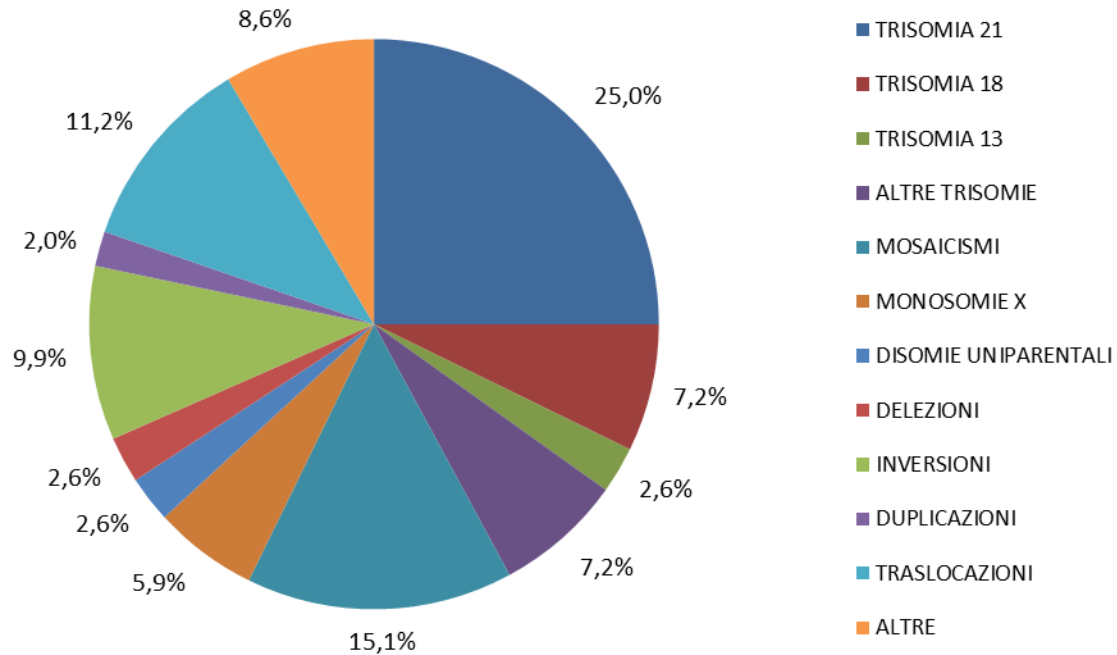
### Soft markers riscontrati motivo di invio a diagnosi prenatale



## Anomalie ecografiche (differenti da soft markers) motivo di invio a diagnosi prenatale



### Analisi dei cariotipi patologici (N=152): tipi di aneuploidie riscontrate



## Tipi di aberrazioni cromosomiche riscontrate

	AMNIO	VILLO	FUNICOLO	Totale tecniche
TRISOMIA 21	11	25	2	38
TRISOMIA 18	5	4	2	11
TRISOMIA 13	0	4	0	4
ALTRE TRISOMIE	3	8	0	11
MOSAICISMI	6	13	4	23
MONOSOMIE X	1	8	0	9
DISOMIE UNIPARENTALI	0	4	0	4
DELEZIONI	1	1	2	4
INVERSIONI	6	9	0	15
DUPLICAZIONI	1	1	1	3
TRASLOCAZIONI	4	10	3	17
ALTRE	4	9	0	13
<b>Totale anomalie scoperte con le singole tecniche</b>	42 (27.6 %)	96 (63.1 %)	14 (9,2 %)	152

Tabella 10

**Abortività legata alle procedure di diagnosi prenatale  
riscontrata negli anni 2012-2013**

	Spontanea a 7 gg	Spontanea a 7 gg sui soli feti sani	Spontanea a distanza	Spontanea a distanza sui soli feti sani
<b>Amniocentesi</b>	0.63% (3/477)	0.63% (3/477)	0.84% (4/477)	0.84% (4/477)
<b>Villocentesi</b>	1.5% (6/400)	1% (4/400)	2.25% (9/400)	1% (4/400)
<b>Funicolocentesi</b>	0% (0/50)	0% (0/50)	0% (0/50)	0% (0/50)

**GRAZIE !**







Anni '70

Sono state isolate **cellule fetali**  
**nel sangue materno.**

**SVANTAGGI:**

- Rare
- Persistono per anni

*(Ji Hyaе Lim et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using cell-free fetal DNA in maternal blood. Obstet Gynecol Sci. 2013).*



1997

È stata dimostrata l'esistenza di **molecole di DNA fetali cell-free nel plasma materno.**

Tali molecole costituiscono una fonte di materiale genetico fetale ottenuto in sicurezza da un prelievo ematico materno e forniscono un'opportunità per la diagnosi prenatale non invasiva.

*(Chiu RW et al. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research, Clin Chem Lab Med. 2013).*

## Indicazioni per l'uso del cf-DNA fetale per la diagnosi di aneuploidie fetali

- Età materna  $\geq 35$  aa;
- Reperti ecografici che indicano un rischio elevato di aneuploidie;
- Anamnesi personale o familiare di aneuploidia;
- Test di screening positivo di aneuploidie;
- Traslocazione robertsoniana bilanciata dei genitori con rischio aumentato di Trisomia 13 o 21.

La diagnosi prenatale non invasiva non è stata sufficientemente validata in donne con basso rischio di avere aneuploidia fetale.

*(Errol R. Norwitz et al. Noninvasive Prenatal Testing: The future Is Now. Obstet Gynecol. 2013).*

Analisi del cf-DNA nel sangue materno raccolto nel 1° trimestre.

### APPROCCI:

- Massively parallel shotgun sequencing (MPS)
- Targeted Sequencing

*(Errol R. Norwitz et al. Noninvasive Prenatal Testing: The future is now. Obstet Gynecol. 2013).*

### VANTAGGI:

- NON INVASIVA (non costituisce un rischio per la madre e il feto)
- può essere eseguita nel PRIMO TRIMESTRE
- Più economica

*(CF Wright et al. The use of DNA free-cell fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Human Reproduction Update. 2008).*

Il test non invasivo per il riscontro trisomia 21 è una metodica sicura ed accurata per la diagnosi prenatale.

Esso può essere utilizzato per le donne con screening sierologico ad alto rischio.

I casi positivi dovrebbero essere sottoposti ad amniocentesi ed analisi del cariotipo per la conferma della diagnosi.

*(Wang SJ et al. Value of detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma in the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2012).*

Il dosaggio relativo del cromosoma 21 era elevato nel plasma di donne il cui feto risultava affetto da **Trisomia 21**.

Tale aumento è proporzionale alla concentrazione del DNA fetale.

*(Ji Hyaе Lim et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using cell-free fetal DNA in maternal blood. Obstet Gynecol. 2013. )*

L'analisi del cf-DNA nel sangue materno può essere utilizzata, oltre che per la **diagnosi prenatale**, per:

- stabilire il **GENOTIPO Rh** del feto;
- identificare l'**iperplasia surrenalica congenita**;
- Identificare il  **sesso del nascituro**.

### **Obiettivi futuri:**

- Identificare **MICRODELEZIONI/MICRODUPLICAZIONI**
- Identificare disordini di singolo gene
- Identificare stato di portatore di mutazioni ereditarie per via paterna.

*(Errol R. Norwitz et al. Noninvasive Prenatal Testing: The future Is Now. Obstet Gynecol. 2013).*



## Requisiti minimi

### Screening PRIMO TRIMESTRE

↳ dovrebbe avere una Detection Rate del 75% con non più del 3% di falsi positivi.

### Screening SECONDO SEMESTRE

↳ dovrebbe avere una Detection Rate del 75% con non più del 5% di falsi positivi.

*(Chitayat D et al. Prenatal screening for fetal aneuploidy in singleton pregnancies. J Obstet Gynaecol Can. 2011).*

La celocentesi transaddominale può fornire DNA fetale per l'analisi attraverso la QF-PCR.



La coltura e la array-based comparative genomic hybridization (a-CGH) non hanno dato i risultati attesi.

*(Pietropolli A et al. Transabdominal coelocentesis as early source of fetal DNA for chromosomal and molecular diagnosis. J Matern Fetal Neonatal Med. 2013).*

Il rischio di natimortalità non era significativamente aumentato dopo amniocentesi in gravidanza gemellare.

*(Kidd SA et al. A cohort study of pregnancy outcome after amniocentesis in twin pregnancy. Paediatr Perinat Epidemiol. 1997).*

La villocentesi è una metodica accurata per la diagnosi prenatale nella gravidanza gemellare che non determina un aumento della frequenza di aborto.

*(De Catte L et al. Outcome of twin gestations after first trimester chorionic villus sampling. Obstet Gynecol. 2000).*

# DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA

Età materna

## Screening primo trimestre

- Misurazione della Translucenza Nucale
- Marcatori sierici: pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A), human chorionic gonadotrophin (hCG).

## Screening secondo trimestre

Marcatori sierici:  $\alpha$ fetoproteina, hCG, estriolo non coniugato, inibina A.

*(Deborah A Driscoll et al. First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy. 2008).*

# AMNIOCENTESI PRECOCE

Data l'elevata frequenza di aborto spontaneo nella fase iniziale della gravidanza, indipendentemente dalla diagnosi prenatale invasiva, l'amniocentesi precoce potrebbe essere considerata un'alternativa sicura alla villocentesi e all'amniocentesi standard.

*(Eiben B et al. On the complication risk of early amniocentesis versus standard amniocentesis. Fetal Diagn Ther. 1997).*

L'amniocentesi precoce comporta un rischio maggiore di aborto rispetto all'amniocentesi standard e alla villocentesi.

*(Tabor A. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. Fetal Diagn Ther. 2010).*

Il rischio di complicanze dovute a cordocentesi diagnostica e terapeutica è di circa il 1,5%.

*(Preis K et al. The risk of complications of diagnostic and therapeutic cordocentesis. Ginekol Pol. 2004).*

## Villocentesi transaddominale

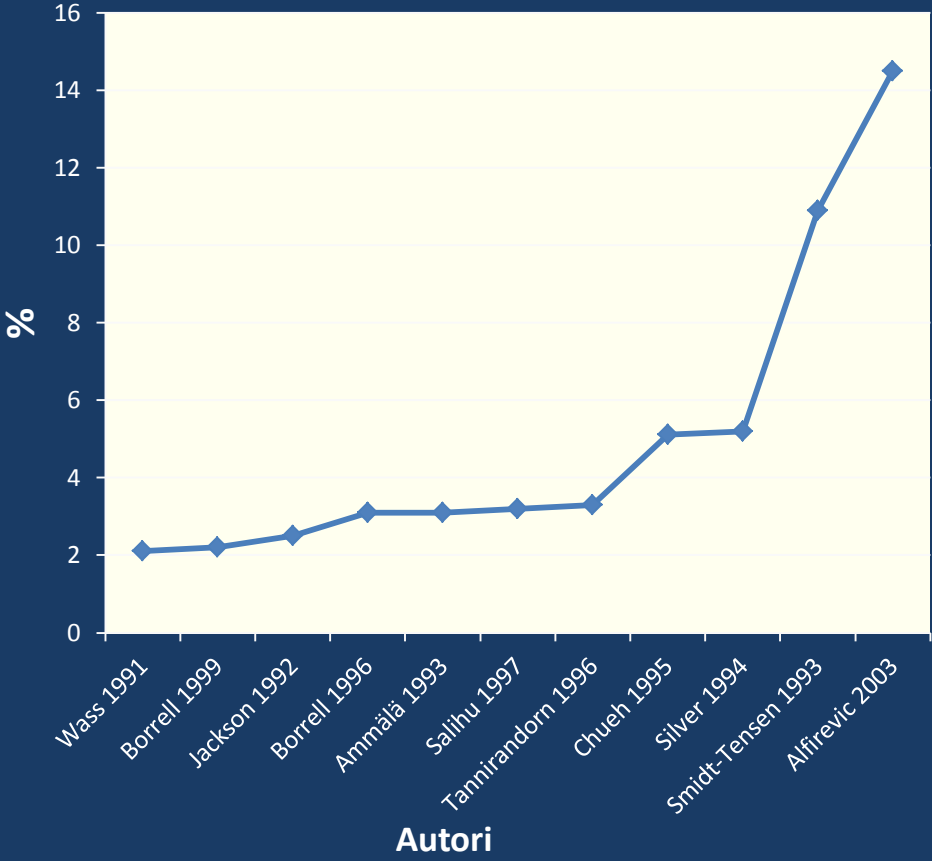
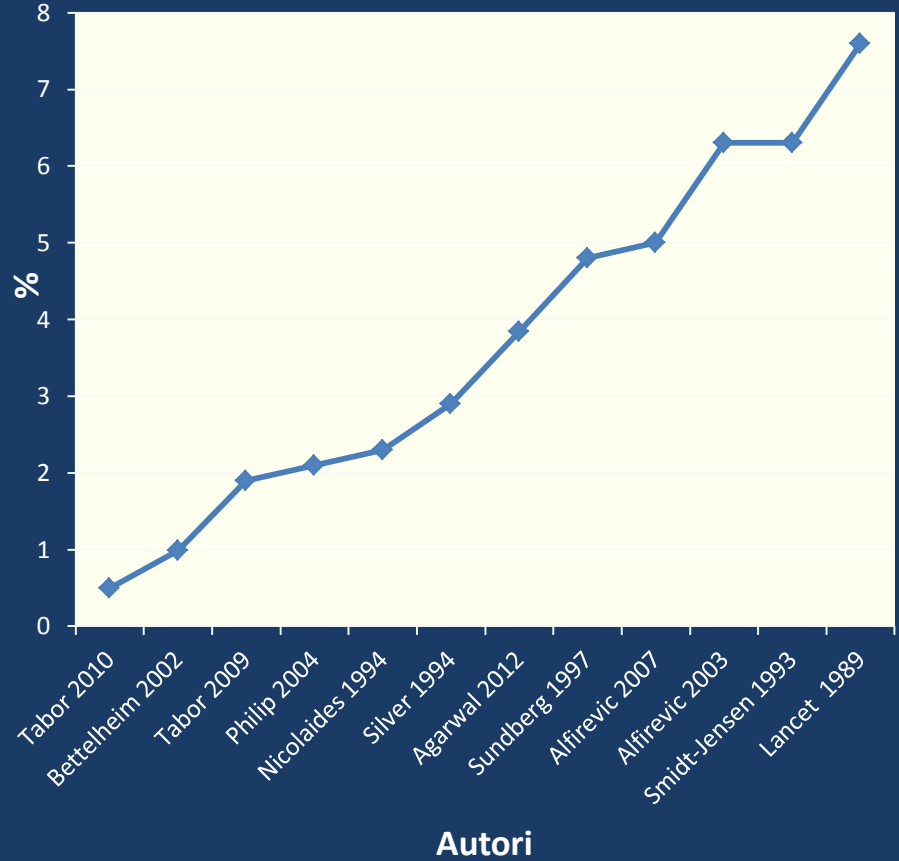
Tabor 2010	0,5%
Bettelheim 2002	0,99%
Tabor 2009	1,9%
Philip 2004	2,1%
Nicolaides 1994	2,3%
Silver 1994	2,9%
Agarwal 2012	3,84%
Sundberg 1997	4,8%
Alfirevic 2007	5%
Alfirevic 2003	6,3%
Smidt-Jensen 1993	6,3%
Lancet 1989	7,6%

## Villocentesi transcervicale

Wass 1991	2,1%
Borrell 1999	2,2%
Jackson 1992	2,5%
Borrell 1996	3,1%
Ammälä 1993	3,1%
Salihu 1997	3,2%
Tannirandorn1996	3,3%
Chueh 1995	5,12%
Silver 1994	5,2%
Smidt-Tensen 1993	10,9%
Alfirevic 2003	14,5%

# Rischio correlato a VILLOCENTESI

## Villocentesi transcervicale





# PROGESTERONE

Il trattamento con Progesterone non previene il parto pretermine nella gravidanza gemellare

*( Rode L et al. Prevention of preterm delivery in twin gestations: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial on the effect of vaginal micronized progesterone. Ultrasound Obstet Gynecol. 2011).*

L'uso del 17 $\alpha$  progesterone riduce l'incidenza del parto pretermine e del basso peso alla nascita.

*(Sanchez-Ramos L et al. Progestational agents to prevent preterm birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. Obstet Gynecol. 2005).*