



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

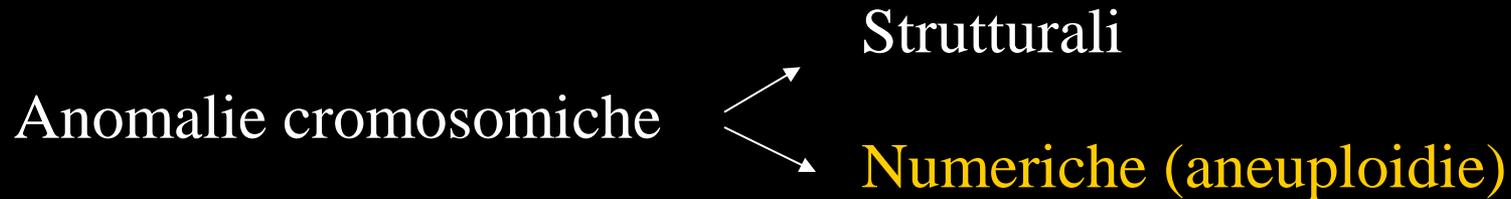
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN GINECOLOGIA ED OSTETRICIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE GINECOLOGICHE E DELLA RIPRODUZIONE UMANA

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA INDICAZIONI ED ESECUZIONE

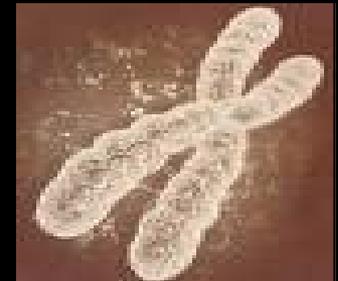


Cosmi Erich



La TECNICA DI ELEZIONE sarà scelta in base a

- settimana gestazionale
- probabilità di anomalie cromosomiche
- efficacia e sensibilità della tecnica



Tecnica di laboratorio più usata per la diagnosi prenatale di anomalie congenite

Solo a partire dalla coltura di **cellule con capacità replicative** si possono studiare i cromosomi nella loro forma e numero



L'osservazione e lo studio diretto dei cromosomi è possibile solo durante la divisione cellulare, in una fase detta **METAFASE**, Durante la quale si rende evidente un modello di **bande G** che identificano e differenziano le 23 coppie.



PROCEDIMENTI INVASIVI

INDICAZIONI PER LE INDAGINI CITOGENETICHE PER ANOMALIE CROMOSOMICHE FETALI

- Età materna uguale o superiore a 35 anni.
- Genitori con precedente figlio affetto da patologia cromosomica.
- Genitore portatore di riarrangiamento strutturale non associato ad effetto fenotipico.
- Genitore con aneuploidie dei cromosomi sessuali compatibili con la fertilità.
- Anomalie malformative evidenziate ecograficamente.
- Probabilità di 1/250 o maggiore che il feto sia affetto da Sindrome di Down (o alcune altre aneuploidie) sulla base dei parametri biochimici valutati su sangue materno o ecografici, attuati con specifici programmi regionali in centri individuati dalle singole Regioni e sottoposti a verifica continua della qualità.

(Circolare Bindi)

STUDIO DI MALATTIE MONOGENICHE O MENDELIANE

Mutazioni che interessano un solo gene e che si trasmettono seguendo i modelli di trasmissione mendeliana:

- autosomiche dominanti
- autosomiche recessive
- legate all'X



Solo se in presenza di un antecedente familiare o di un sospetto clinico

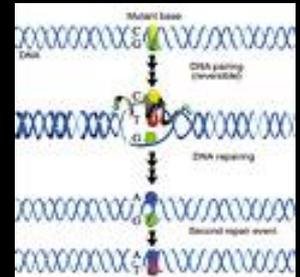
Laboratori di riferimento dedicati

STUDIO MOLECOLARE



Analisi diretta

Analisi indiretta



STUDIO BIOCHIMICO

Indagine riguardante malattie metaboliche dovute a mutazione di geni che sintetizzano proteine ed enzimi necessari a determinate vie metaboliche

Laboratori con esperienza

VILLOCENTESI

Procedimento invasivo ecoguidato di elezione
nel I trimestre per la diagnosi prenatale di
anomalie cromosomiche e altre malattie ereditarie

Utilizzata per la prima volta nel 1965 in China per la determinazione del sesso fetale.

- Nel 1968 si tentò il prelievo transcervicale in 12 pazienti con un ago di 6 mm di diametro.
(esitarono in aborto la metà delle pazienti) (Hahnemann-Mohr 1968)
- Nel 1973 si utilizzò un ago di 5 mm per la via transcervicale, con successiva morte di due
pazienti per sepsi. (Kullander e Saudahl 1973)
- Nel 1974 si arrivò all'utilizzo di un isteroscopio con diametro di 2,5 mm nel I trimestre
(elevata frequenza di rottura di membrana)

**Nel 1980 acquisì l'attuale sviluppo grazie alla diffusione dell'ecografia ecoguidata e di
adeguate strumentazioni**

VILLOCENTESI

Studi randomizzati hanno dimostrato che il rischio di aborto dopo CVS nel I trimestre è uguale a quello dell'amniocentesi nel II trimestre.

Se eseguita prima della 10[^] settimana si associa più frequentemente ad anomalie degli arti, micrognatia, microglossia (1,6% a 6-7 s.g. vs 0,1% a 8-9 sg)



Settimane preferibili: 11[^]-13[^]

Esistono due vie d'accesso: transcervicale
transaddominale

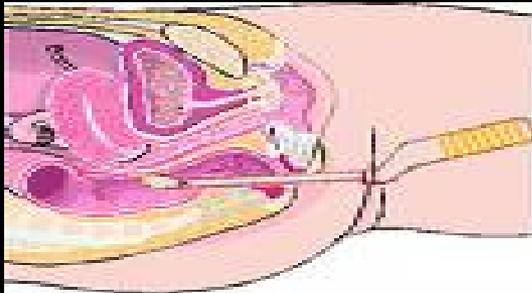


Localizzazione placenta
Localizzazione utero

Non esistono dati certi a favore dell'una o dell'altra, ma la transaddominale sembra la più utilizzata

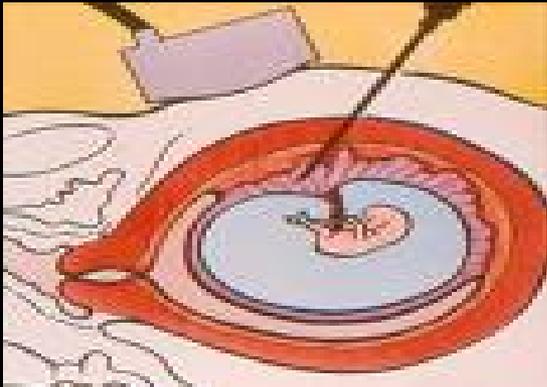
VILLOCENTESI

TRANSCERVICALE



→ Paziente in posizione ginecologica
Disinfezione del canale cervicale
Prelievo sotto guida ecografica
Introduzione della pinza fino alla placenta con successiva aspirazione
Non uso di eparina
Movimento di avanzamento e retrazione
Limite: 3 tentativi

TRANSADDOMINALE



→ Paziente in posizione supina
Disinfezione dell'addome
Utilizzo di terreno di coltura nella siringa eparinata
Prelievo sotto guida ecografica con entrata rapida (< dolore e < movimento uterino)
Introduzione di un ago da 20 G con successiva creazione del vuoto o uso di una guida da 18 G
Movimento di avanzamento e retrazione
Limite: 3 tentativi

Tasso di successo in gruppi esperti 95%

VILLOCENTESI

DIFFICOLTA'



Localizzazione della placenta
Dimensioni materne
Caratteristiche placentari

COMPLICANZE



Dolore nella sede di inserzione addominale
Spotting lieve e transitorio
Infezione (<1%)
Tasso di morte fetale circa dell'1%



Il rischio di morte per un feto a 10 s.g. senza che la madre si sottoponga ad alcun esame è circa del 2-3%; la villocentesi aggiunge a questo un 1-2% che diventa 3-6% in caso di CVS transcervicale

(Medical Research Council Working Party on the Evaluation of Chorion Villus sampling, 1994)

L'INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO dipende da:

- Risoluzione delle metafasi ottenute (n° di bande osservabili)



Rischio di non scorgere minime alterazioni strutturali

- Contaminazione materna

- **MOSAICISMO**



(presenza di più di una linea cellulare)



la 2^a linea cellulare appare in una sola coltura



Probabile alterazione del coltivo e non del feto



- Più linee cellulari interessate
- Probabile aberrazione fetale
- La rilevanza clinica dipende dalla percentuale di colture alterate
- Necessità di consulenza genetica

Table 1. Characteristics of Women Having Chorionic Villus Sampling Compared With Those Without an Invasive Procedure Seen Between 10 and 13.9 Weeks

	CVS (n=5,148)	No Procedure (n=4,803)	P
Maternal age (y)	37.3±3.5	32.3±6.4	<.001
Maternal age 35 y or older	4,739 (84)	2,697 (44)	<.001
Mean GA at ultrasound/CVS (wk)	11.1±0.9	12.1±1.0	<.001
Mean GA at delivery (wk)	37.9±5.3	37.3±5.7	<.001
Maternal race			
White	4,708 (91.5)	3,314 (69.0)	
African American	186 (3.6)	1,134 (23.6)	
Hispanic	27 (0.5)	63 (1.3)	<.001
Asian	160 (3.1)	211 (4.4)	
Other	67 (1.3)	67 (1.4)	
Smoking	504 (0.98)	500 (10)	.33
Alcohol	1,748 (33.9)	1,057 (22)	<.001
Abnormal first-trimester aneuploidy screen	229 (4.5)	33 (0.7)	<.001
Previous chromosomal abnormality	365 (7)	72 (1.5)	<.001
Previous SAB	2,065 (40.1)	1,681 (35)	<.001
Previous TAB	724 (14)	576 (12)	<.001
Chromosomal abnormalities	10 (0.2)	9 (0.2)	.38

CVS, chorionic villus sampling; GA, gestational age; SAB, spontaneous miscarriage; TAB, termination of pregnancy.

Data are mean±standard deviation or n (%).

Table 2. Timing of Fetal Loss or Delivery Gestational Age Between Chorionic Villus Sampling and Control Groups

	CVS (n=5,148)	No Procedure (n=4,803)	Risk Difference (%)	<i>P</i>
Loss less than 14 d from US/CVS	34 (0.7)	85 (1.8)	-0.9	<.01
Loss less than 30 d from US/CVS	64 (1.2)	111 (2.3)	-1.1	<.01
Loss less than 60 d from US/CVS	88 (1.7)	151 (3.1)	-1.4	<.01
Loss less than 20 wk from US/CVS	98 (1.9)	129 (2.7)	-0.8	<.01
Loss 20–24 wk from US/CVS	40 (0.8)	32 (0.7)	0.1	.07
Delivery 24–28 wk from US/CVS	17 (0.3)	35 (0.7)	-0.4	<.01
Delivery 28–32 wk from US/CVS	55 (1.1)	80 (1.7)	-0.6	.01

CVS, chorionic villus sampling; US, ultrasonography.

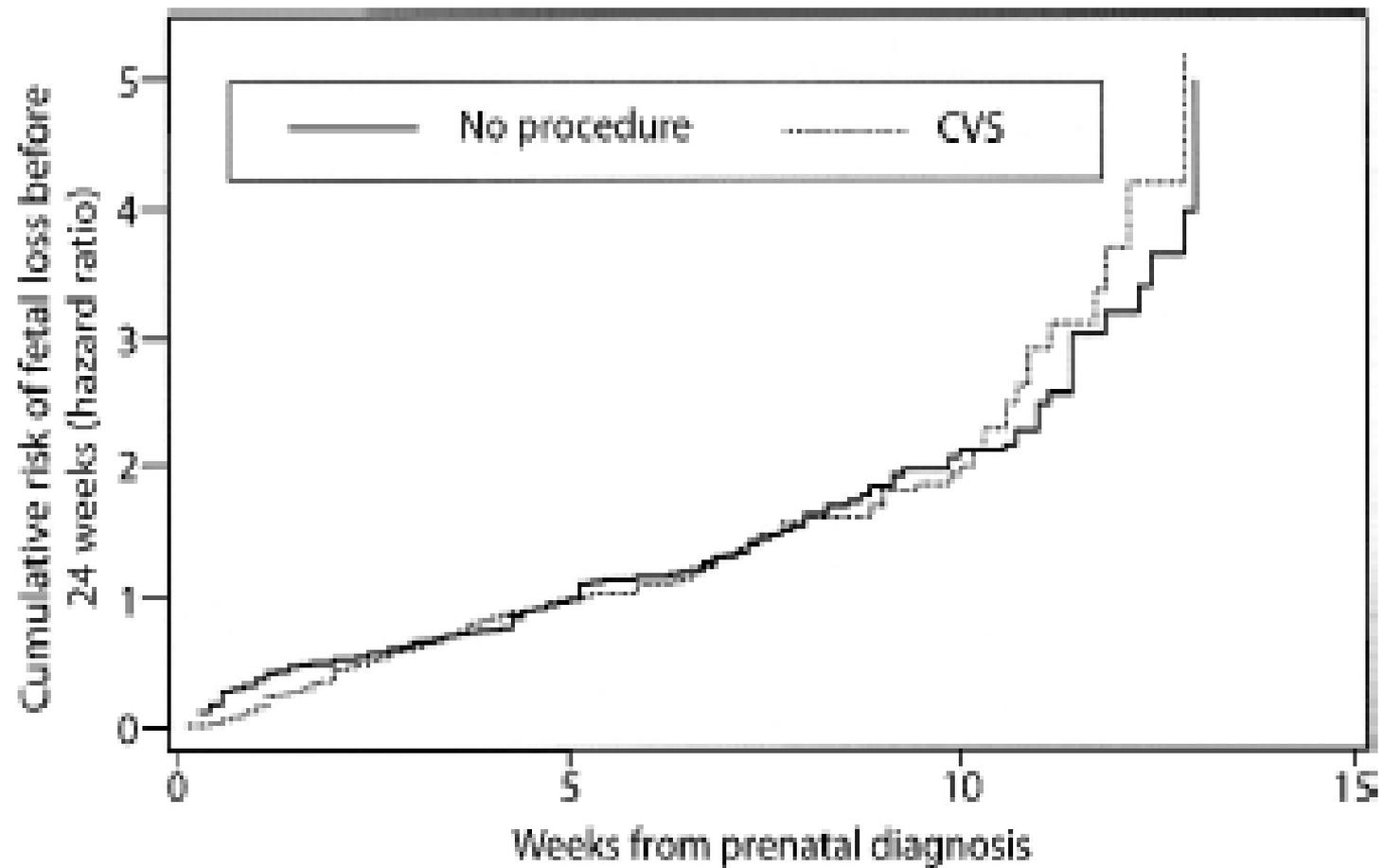
Data are n (%) unless otherwise specified.

Table 3. Stratified Analysis of Fetal Loss Rates (Delivery Before 24 Weeks) by Maternal Age, Gestational Age at, and Year of Ultrasonography or Chorionic Villus Sampling

Loss Less Than 24 wk	CVS (n=5,148)	No Procedure (n=4,803)	Risk Difference (%)	<i>P</i>
By maternal age (y)				
35 or older	121/4,531 (2.7)	103/2,114 (4.9)	-2.2	<.01
Younger than 35	17/617 (2.7)	46/2,689 (1.7)	1.0	.10
Gestational age at US/CVS (wk)				
Less than 10	14/307 (4.6)	5/85 (5.8)	-1.2	.77
10-10.9	52/2,154 (2.4)	40/775 (4.2)	-0.8	<.01
11-11.9	48/1,830 (2.6)	63/1,553 (4.1)	-1.5	.02
12-12.9	19/774 (2.5)	33/1,482 (2.2)	0.3	.77
13 or more	5/83 (6.0)	20/908 (2.2)	3.8	.05
Year of US/CVS				
1990-1994	62/2,512 (2.7)	42/993 (4.2)	-1.5	<.01
1995-1999	41/1,428 (2.8)	46/1,204 (3.8)	-1.0	.19
2000 or later	35/1,208 (2.9)	73/2,606 (2.8)	0.1	.92

CVS, chorionic villus sampling; US, ultrasonography.

Data are n/N (%) unless otherwise specified.



- ✓ Combinano tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo con tecniche di genetica molecolare applicata allo studio del DNA
- ✓ Consentono: la rilevazione rapida di anomalie numeriche
l'identificazione di distinte microanomalie

FISH (IBRIDAZIONE IN SITU)

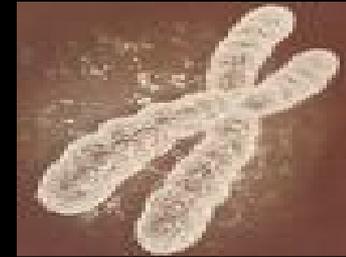
Si basa sul **principio della complementarità** tra una sequenza di basi di un tratto specifico di DNA con una sequenza di basi determinata e complementare sintetizzata in laboratorio e marcata con fluorocromo che ne consente l'identificazione con microscopio e fluorescenza



Non necessita di un coltivo in quanto si applica su cellule in interfase

FISH

Consente di identificare:



Alterazioni numeriche dei cromosomi analizzati



Si utilizza per le aneuploidie più frequenti



Trisomia 13
Trisomia 18
Trisomia 21
Anomalie sessuali



-Per evidenziare microdelezioni in caso di familiarità o riscontro suggestivo
-Piccole anomalie strutturali



Prader-Willi
DiGeorge (22q11)
Williams

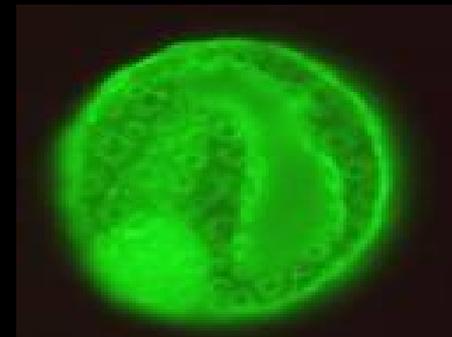
- Possibilità di risultato in 12-24 h
- 95% di affidabilità
- Va sempre eseguita successivamente un'indagine completa del cariotipo per evitare falsi negativi e il mancato riconoscimento di anomalie strutturali restanti

PCR quantitativa QF-PCR (studio si sequenze del DNA altamente polimorfiche)

CGH-microarray analysis

MLPA/Multiplex

Ligation dependent Probe Amplification



DIAGNOSI NON INVASIVA DI DIFETTI CROMOSOMICI

La valutazione citogenetica di cellule fetali derivate da sangue materno periferico dimostrò essere potenzialmente utilizzabile come test diagnostico non invasivo (Bianchi 2000)

Il target più appropriato sembrano essere i **globuli rossi nucleati fetali** per specifici antigeni (Adinolfi 1995)

La grossa difficoltà è legata al piccolo di cellule fetali (0 a 20 in 20 mL di sangue materno) e la loro bassa concentrazione (1 cellula fetale per 100.000-10 milioni di materne)



La proporzione può essere arricchita sino a 1 su 10-100 mediante **Magnetic Cell Sorting (MACS)** o **Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)** per reazione tra anticorpi marcati con fluorescenza con un marker specifico per la superficie delle cellule fetali

(Bianchi, '94,'97,'99)

DIAGNOSI NON INVASIVA DI DIFETTI CROMOSOMICI

Nonostante i limiti citati, numerosi sono gli studi condotti con successo in merito. (Cruz 1998)



Attualmente ricerca di DNA fetale libero nel plasma materno (dati discordanti in feti con trisomia 21)

Tutt'oggi non sembra ancora adatto per le tradizionali analisi citogenetiche quanto piuttosto per la valutazione del rischio di difetti cromosomici, con una sensibilità pari a quella degli screening su siero materno.

Partecipazione del Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana di Padova ad uno studio multicentrico che coinvolge i maggiori centri nazionali