



Questo documento è stato tradotto dall'inglese all'italiano da Francesca Conway, MD - Università degli Studi di Roma Tor Vergata-(Italia)

Linee Guida ISUOG: la diagnosi prenatale invasiva

Comitato per gli Standard Clinici

La Società Internazionale di Ecografia Ostetrica e Ginecologica (ISUOG) è un'organizzazione scientifica che incoraggia la diffusione di una pratica clinica corretta, dell'insegnamento e della ricerca nella diagnostica per immagini nell'ambito della salute della donna. Il Comitato per gli Standard Clinici ISUOG (CSC) ha tra i suoi compiti quello di sviluppare Linee Guida e Documenti di Consenso, sotto forma di raccomandazioni didattiche che forniscano agli operatori sanitari un approccio alla diagnostica per immagini basato su di un consenso internazionale. Tali raccomandazioni rappresentano ciò che ISUOG considera la miglior pratica clinica al momento della pubblicazione delle Linee Guida. Sebbene ISUOG si adoperi con ogni mezzo per assicurarsi che le Linee Guida siano estremamente accurate al momento della pubblicazione, la Società ed i suoi dipendenti e membri declinano ogni responsabilità per le possibili conseguenze dovute a dati, opinioni o dichiarazioni inaccurate o ambigue emesse dal CSC. Le Linee Guida, infatti, non intendono stabilire uno standard legale di cura poiché l'interpretazione dell'evidenza su cui esse poggiano potrebbe essere influenzata da circostanze individuali e risorse disponibili in quel dato momento. Le linee guida approvate possono essere distribuite liberamente con il permesso di ISUOG (info@isuog.org).

INTRODUZIONE

Lo scopo di questo documento è descrivere gli aspetti principali delle procedure fetali invasive per la diagnosi prenatale. Alla luce della letteratura attualmente disponibile saranno prese in esame problematiche tecniche, indicazioni cliniche, capacità diagnostiche e possibili complicanze.

In questa era dominata da esami del DNA fetale libero circolante (cffDNA) il numero di procedure diagnostiche invasive si sta riducendo in maniera drammatica, con notevole impatto sulla pratica clinica.

Queste linee guida riassumono le attuali conoscenze riguardanti le tempistiche, le modalità e le indicazioni all'espletamento delle procedure invasive per diagnosi prenatale. Dettagli sui gradi di raccomandazione e sui livelli di evidenza sono forniti nell'Appendice 1.

AMNIOCENTESI

-L'amniocentesi va praticata a partire dalla 15 settimana + 0 giorni di gestazione (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: A**).

-Va usato un ago da 20/22G inserito per via transaddominale sotto costante sorveglianza ecografica (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

-Va evitato il passaggio dell'ago a livello dell'inserzione placentare del cordone ombelicale; qualora tecnicamente possibile, si consiglia di evitare del tutto il passaggio transplacentare dell'ago, soprattutto in pazienti Rh negative (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: C**).

-Si ha un aumentata frequenza di contaminazione del campione con materiale cellulare di origine materna qualora il liquido amniotico risulti ematico ed anche quando l'operatore è poco esperto. Per minimizzare la contaminazione cellulare materna si consiglia di scartare i primi due mL di liquido amniotico aspirati (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: C**).

L'amniocentesi consiste nell'aspirazione per via transaddominale di liquido amniotico dalla cavità uterina. Tale procedura viene praticata già dal 1870 [1].

Tecnica

Si inserisce un ago da 20/22 G per via transaddominale sotto costante sorveglianza ecografica [2-5]. L'ago deve essere introdotto in modo deciso, per evitare di sollevare la membrana amniotica [3] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1-**). Un piccolo studio clinico randomizzato (n=200) ha messo a confronto l'utilizzo di aghi da 20G e da 22G, dimostrando che il tasso di sanguinamento intrauterino risultava simile tra i due gruppi (4/100 ed 8/100) ma anche che l'uso di un ago di maggiore calibro (20 G) consentiva più rapida raccolta del liquido [6] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Uno studio retrospettivo (n=793) ha riportato tassi di perdita fetale simili con aghi da 20 G (1.57%), 21 G (1.47%) e 22 G (1.61%) [7]. L'effetto del passaggio transplacentare dell'ago è stato studiato in coorti retrospettive. I tassi di perdita fetale sono risultati simili sia in caso di approccio transplacentare, sia in caso di passaggio attraverso le sole membrane, tuttavia il passaggio dell'ago per via transplacentare si associa ad un maggior tasso di aspirato ematico [8-11]. Si raccomanda di evitare che l'ago faccia il suo ingresso in cavità amniotica al livello del punto di inserzione placentare del cordone ombelicale e, qualora tecnicamente possibile, si consiglia di evitare del tutto il passaggio transplacentare dell'ago, soprattutto in pazienti Rh negative [2-7,12] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1+**). Quando l'ago ha raggiunto la cavità amniotica, si sfilava il mandrino e si procede all'aspirazione di 15-30 mL di liquido (a seconda delle indicazioni). L'aspirazione del liquido può essere eseguita dall'operatore stesso o da un assistente oppure utilizzando un sistema d'aspirazione automatico [3,13]. In alcuni casi è possibile trovare del materiale cellulare materno all'interno dei campioni di liquido amniotico ed in alcuni articoli meno recenti vengono riportati tassi di contaminazione con cellule materne superiori al 20% del totale in un campione su due, e fino al 50% negli aspirati ematici [14]. Uno studio retrospettivo condotto su 150 campioni di liquido amniotico ha dimostrato che i fattori associati ad alto tasso di contaminazione sono: il passaggio transplacentare dell'ago (6.0% vs 1.0%), il doppio passaggio dell'ago (27.5% vs 2.0%) ed infine l'inesperienza dell'operatore [15]. La frequenza della contaminazione da cellule materne risulta essere molto inferiore (0.35%) in una più recente serie di 6332 campioni di liquido amniotico [16]. Per minimizzare la contaminazione del campione con cellule materne si raccomanda di scartare i primi 2 mL di liquido amniotico [17] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**).

Epoca gestazionale

Vari studi clinici randomizzati condotti nel corso degli anni novanta hanno messo a confronto la sicurezza e l'affidabilità diagnostica dell'amniocentesi precoce (<14 settimane + 0 giorni) rispetto all'amniocentesi condotta in epoche più avanzate di gestazione (> 15 settimane + 0 giorni). Un primo studio clinico (n=695) non ha evidenziato differenze tra i tassi di perdita fetale nel confronto tra l'amniocentesi precoce e quella condotta in epoche più avanzate (7.8% e 7.4%) e tra i tassi di difetti fetali congeniti (2.4% e 2.6%) [18,19]. Tuttavia uno studio clinico randomizzato multicentrico di dimensioni molto ampie ha dimostrato che l'amniocentesi precoce (condotta a partire dalle 11 settimane + 0 giorni alle 12 settimane + 6 giorni) si associa ad un tasso significativamente maggiore di perdita fetale (7.6% e 5.9%) di anomalie fetali quali il piede torto congenito (1.3% e 0.1%) e di perdita di liquido amniotico post-procedurale (3.5% e 1.7%) rispetto all'amniocentesi effettuata in epoche più avanzate di gestazione (a partire dalle 15 settimane + 0 giorni alle 16 settimane + 6 giorni) [20,21]. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza del celoma extra-embryonale nel primo trimestre o alla ridotta quantità di liquido amniotico. Per tali motivi le maggiori istituzioni scientifiche raccomandano di effettuare l'amniocentesi esclusivamente a partire dalle 15 settimane + 0 giorni [2,7,22] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:1+**).

Aspetti laboratoristici

Il fallimento della coltura di amniociti avviene nello 0.1% dei casi. Il rischio di fallimento colturale è aumentato in presenza di campioni di liquido amniotico ematico e nelle amniocentesi tardive [17]. Nello 0.25% delle procedure vi è riscontro di mosaicismi delle cellule amniotiche [17]. In questi casi si raccomanda un counselling genetico ed in alcuni casi si rende necessario il prelievo di un campione di sangue fetale per escludere un vero e proprio mosaicismo [17]. Il rischio di fallimento colturale degli amniociti è aumentato anche in prelievi effettuati in epoca gestazionale avanzata. In uno studio retrospettivo condotto su campioni di liquido amniotico prelevati oltre le 28 settimane di gestazione il tasso di fallimento colturale riscontrato è stato del 9.7% [23] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Complicazioni

-Il rischio aggiuntivo di perdita fetale in donne che si sottopongono ad amniocentesi rispetto ai controlli varia tra lo 0.1 e l'1%. Gli studi più recenti riportano dati che si avvicinano al limite inferiore di questo intervallo. (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

-Il rischio di rottura delle membrane post-amniocentesi è dell'1-2%; tuttavia in questi casi la prognosi può essere più favorevole rispetto ai casi di rottura spontanea pre-termine e prematura delle membrane (pPROM) (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

-Danni fetali e complicazioni materne gravi sono eventi estremamente rari (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: D**).

-L'esperienza dell'operatore e la sua conoscenza della procedura riducono fortemente il rischio di perdita fetale post-amniocentesi. Il rischio di perdita fetale è aumentato nei casi in cui vengono effettuati più tentativi di passaggio dell'ago, nei casi di liquido amniotico ematico ed infine in presenza di anomalie fetali, mentre l'effetto di altri fattori di rischio è meno consistente (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: C**).

Perdita fetale

La maggior parte dei dati inerenti alle perdite fetali secondarie ad amniocentesi derivano da studi di natura osservazionale. Esiste un solo trial clinico randomizzato danese, che risale al 1986, condotto su 4606 gestanti con gravidanza a basso rischio, randomizzate ad effettuare amniocentesi oppure alla semplice condotta d'attesa. Il tasso di perdita fetale riscontrato nel gruppo sottoposto ad amniocentesi è risultato essere dell'1.7% e dello 0.7% nel gruppo di controllo, con un rischio netto correlato alla procedura dell'1.0% [12] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1+**). Numerosi studi osservazionali condotti in seguito hanno riscontrato tassi di rischio maggiori o inferiori ed una recente meta-analisi ha calcolato che il rischio ponderato e combinato di aborto post-amniocentesi è pari allo 0.11% (95 % CI, da -0.04 a 0.26%) [24] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Una revisione danese del 2016 che ha preso in analisi 147987 procedure invasive ha riportato un tasso di aborto pari allo 0.56% entro 28 giorni dalla procedura ed un rischio di morte fetale in utero dello 0.09% entro 42 giorni dalla procedura [25] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Perdita di liquido amniotico

Il rischio di perdita di liquido amniotico in seguito ad amniocentesi rimane aumentato fino alla ventiquattresima settimana di gestazione. L'incidenza di perdita di liquido post-procedura varia tra l'1 ed il 2% [17,19,26]. Tuttavia, nelle gestanti che perdono liquido in seguito ad amniocentesi, si osserva spesso la richiusura delle membrane, con tassi di perdita perinatale decisamente inferiori rispetto a gravidanze con rottura spontanea delle membrane alla stessa epoca gestazionale [27] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Corionamniosite

Il rischio di corionamniosite ed infezione endouterina a seguito dell'amniocentesi è molto basso (<0.1%) [17].

Lesioni fetali da ago

La possibilità che avvengano lesioni da ago al feto è estremamente rara [17]. Episodi sporadici di ferita al feto sono stati segnalati in alcuni case report meno recenti, soprattutto in casi di procedure non eco-guidate. Tra le lesioni segnalate citiamo: lesioni oculari [28], ferite cutanee (cicatrici ed avvallamenti cutanei) [29,30], traumi tendinei [29], lesioni vascolari [31], lesioni cerebrali (inclusa la porencefalia) [32,33] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 3**).

Complicanze materne

Delle complicanze materne gravi secondarie all'amniocentesi, tra cui sepsi e decesso materno, sono state segnalate in un esiguo numero di casi [34-38]. Tali eventi possono verificarsi qualora, nel corso della procedura, si leda l'intestino. È possibile inoltre che le sonde ed il gel ecografico vengano colonizzati da batteri, ponendo il rischio di infezione materna [2] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:3**).

Fattori di rischio per complicanze

Sono stati documentati tassi di perdita fetale più bassi per operatori che effettuano oltre 100 procedure annuali [2] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). All'aumentare del numero di passaggi dell'ago (tre o più punture), aumenta il rischio di perdita fetale. Se si rendono necessari più di due passaggi dell'ago è possibile posticipare la procedura di 24 ore [3,22]. La presenza di anomalie fetali si associa di per sé ad un aumentato rischio di perdita fetale; tale rischio

incrementa ulteriormente in seguito ad amniocentesi [22]. In presenza di un campione di liquido amniotico ematico oppure dal colore alterato (es. marroncino) è ragionevole sospettare un sanguinamento intra-amniotico che si associa, in genere, ad un maggiore rischio di perdita fetale post-procedura. Il motivo potrebbe risiedere nell'associazione tra sanguinamento intra-amniotico e sottostanti disordini placentari [22,39] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). L'opinione di esperti suggerisce di rivalutare le competenze dell'operatore qualora il tasso di perdita fetale ecceda il valore di 4 su 100 amniocentesi consecutive [2,40] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Numerosi altri fattori di rischio sono stati chiamati in causa quali possibili responsabili di un aumento del rischio di perdita fetale a seguito di amniocentesi, sebbene il loro ruolo non sia stato del tutto provato. Tra questi citiamo: fibromi uterini, malformazioni mülleriane, separazione corionamniotica, ematoma sottocoriale, sanguinamento materno in atto o pregresso, BMI materno >40 kg/m², multiparità (>3 parti), infezione vaginale sintomatica, tre o più aborti (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+/2-**).

VILLOCENTESI

-La villocentesi o prelievo dei villi coriali (CVS chorionic villus sampling) deve essere effettuata a partire dalle 10 settimane + 0 giorni (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: A**).

-La villocentesi può essere effettuata per via transaddominale o per via transcervicale, a seconda delle preferenze e dell'esperienza dell'operatore oppure in base alla posizione placentare.

-Non esistono al momento attuale studi clinici randomizzati che confrontino il tasso di perdita fetale post-villocentesi con controlli. Tuttavia, alcuni studi osservazionali indicano un tasso di perdita fetale estremamente basso, variabile tra lo 0.2 ed il 2% (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

-Il rischio di aborto dopo villocentesi diminuisce all'aumentare dell'esperienza dell'operatore, mentre il rischio aumenta in caso di procedure che richiedono più tentativi oppure in feti di epoche gestazionali < 10 settimane (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

La villocentesi è un prelievo di cellule trofoblastiche dalla placenta. Tale procedura fu descritta per la prima volta in Cina verso la metà degli anni Settanta [43] ed introdotta nella pratica clinica agli inizi degli anni Ottanta [44].

Tecnica

Si inserisce l'ago nella placenta sotto costante guida ecografica. Solitamente è possibile inserire l'ago a mano libera oppure tramite un adattatore da biopsia. Attualmente non esistono dati che confrontino i livelli di sicurezza ed efficienza delle due metodiche, e la scelta tra le due metodiche viene fatta dall'operatore a seconda della sua esperienza e delle sue preferenze [2,45]. L'accesso alla placenta può avvenire sia per via transaddominale che per via transcervicale. Un trial clinico randomizzato condotto su 3873 donne con gravidanza singola (età gestazionale compresa tra le 7 e le 12 settimane, in larga parte > 10 settimane) ha mostrato tassi di perdita fetale (2.3% e 2.5%) e tassi di successo della villocentesi (95% e 94%) molto simili per entrambe le metodiche [46] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:1 +**).

Approccio transaddominale

È possibile somministrare un anestetico locale per effettuare la villocentesi per via transaddominale [2] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**). È possibile utilizzare un ago singolo da 17-20 G oppure un set di due aghi da 17/19 G esternamente e 19/20 G internamente [47] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1-**). Quando l'ago arriva al bersaglio all'interno della placenta, è necessario eseguire da 1 a 10 movimenti di inserimento e retrazione dell'ago, mantenendo al contempo il sistema di aspirazione mentre il materiale viene aspirato manualmente da un assistente oppure tramite un sistema di aspirazione automatico [3,45,48].

Approccio transcervicale

Vengono inserite per via transvaginale delle pinze da biopsia che passano attraverso il canale cervicale, fino a raggiungere l'area trofoblastica. È possibile anche utilizzare un catetere con mandrino in plastica o metallo ed una siringa per aspirare [3]. Un trial clinico randomizzato di 200 donne sottoposte a prelievo dei villi coriali tra le 10 e le 12 settimane ha posto a confronto queste due metodiche, riportando simili tassi di traumatismo placentare e di riuscita del prelievo (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1-**). Tuttavia, la metodica con pinze da biopsia viene solitamente preferita sia dagli operatori che dalle pazienti [49]. Dopo la procedura si consiglia di osservare il campione per confermare al suo interno la presenza di materiale. Ogni campione deve contenere almeno 5 mg di villi per essere diagnostico [3]. Il fallimento del prelievo avviene nel 2.5-4.8% delle procedure [2,45].

Epoca gestazionale

La villocentesi non dovrebbe essere effettuata prima delle 10 settimane + 0 giorni di gestazione, a causa dell'alto rischio di perdita fetale e di insorgenza di complicazioni [2,17]. Studi risalenti ai primi anni novanta hanno messo in luce un rischio aumentato, rispetto alla popolazione generale, di difetti degli arti ed ipoplasia mandibolare in feti sottoposti a villocentesi prima delle 10 settimane di gestazione. Tuttavia non esiste sufficiente evidenza per confermare o meno un rapporto di causalità tra la procedura e queste malformazioni. Arti e mandibola del feto sembrano essere particolarmente suscettibili ad alterazioni di tipo vascolare prima delle 10 settimane [3,50,51] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:3**).

Aspetti laboratoristici

Il fallimento della coltura di citotrofoblasti avviene in meno dello 0.5% dei casi in cui il campione sia inferiore ai 5 mg di villi coriali [49]. In alcuni di questi casi è possibile una contaminazione con cellule deciduali materne, tuttavia è possibile ridurre questa contaminazione separando le cellule deciduali ed il materiale ematico dai villi coriali tramite un microscopio da dissezione [51] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2-**). Viene riscontrato mosaicismo delle cellule placentari nell' 1% dei casi [17]. In questi casi si consiglia una consulenza genetica, e può esserci l'indicazione ad eseguire l'amniocentesi per differenziare un vero mosaicismo fetale da un mosaicismo confinato alla placenta [17].

Complicanze

Perdita fetale

Non esistono studi clinici randomizzati che mettano a confronto pazienti sottoposte a villocentesi con pazienti non sottoposte a tale procedura, per cui l'evidenza circa il rischio di aborto legato alla procedura deriva da studi di coorte retrospettivi. Il rischio di perdita fetale legato alla villocentesi è stimato attorno allo 0.2-2% [2,24]. Tale rischio risulta inferiore nei centri di riferimento per diagnosi prenatale e diminuisce anche in presenza di operatori esperti, variando tra 1/150 e 1/500 [2,53]. Uno studio retrospettivo derivante dal registro danese, condotto su 31355 pazienti sottoposte a villocentesi, ha riportato un tasso globale di perdita fetale dell'1.9% post-villocentesi e dell'1.4% post-amniocentesi; il tasso d'abortività era inversamente correlato al numero di procedure effettuate, risultando del 40% maggiore qualora la struttura effettuasse un numero di procedure annuali inferiori a 1500 [40] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2 ++**). Un aggiornamento del database di questo studio effettuato nel 2016 ha dimostrato un impatto quasi nullo della villocentesi sui tassi di perdita fetale (rischio di aborto 21 giorni post- villocentesi: 0.21%) [25] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA 2 +**). Tali risultati sono molto simili a quelli ottenuti da un grande studio retrospettivo che ha confrontato i tassi di aborto di 5243 donne sottoposte a villocentesi (2.7%) con quelli di 4917 controlli (3.3%) [54]. Secondo una recente meta-analisi il rischio di perdita fetale post-villocentesi non è significativamente aumentato rispetto a quello della popolazione non esposta (il rischio complessivo <24 settimane è dello 0.22% (IC 95%, da -0.71 a 1.16%)) [24]; questa stima ha preso in considerazione i risultati dello studio danese del 2016 [25] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:2 ++**). Uno studio retrospettivo basato su 1251 villocentesi eseguite per via transcervicale ha riportato un tasso di perdita fetale del 2.5%. Tassi di aborto molto simili sono stati riscontrati a seguito di uno studio clinico randomizzato di confronto tra villocentesi transcervicale e transaddominale (2.5% e 2.3%) [46] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1+**). Uno studio randomizzato di confronto tra villocentesi transaddominale e amniocentesi del secondo trimestre non ha trovato alcuna differenza statisticamente significativa nel tasso totale di perdita fetale tra le due metodiche (6.3% e 7%; rischio relativo (RR) 0.90 (IC 95%, 0.66-1.23)) [56] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1-**). Tuttavia una meta-analisi che ha preso in considerazione 4 trial randomizzati ha dimostrato un maggior tasso globale di perdita fetale (RR 1.40 (IC 95%, 1.09-1.81)) e di aborto spontaneo (RR, 1.50 (95% CI, 1.07-2.11)) per la villocentesi transcervicale rispetto all'amniocentesi del secondo trimestre [57].

Sanguinamento dai genitali esterni

Nel 10% dei casi le pazienti riscontrano sanguinamento dai genitali esterni in seguito a villocentesi [52,53], particolarmente se la metodica di prelievo è transcervicale (30% di rischio di sanguinamento vaginale) [52] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA 2-**).

Complicanze rare

Il rischio di perdita di liquido amniotico in seguito a villocentesi è molto basso (<0.5% dei casi) [52] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2-**). Non è ben noto il rischio di perdita fetale qualora si verifichi una perdita di liquido amniotico

post-villocentesi. Molto basso è anche il rischio di corionamniosite ed infezione endouterina post-villocentesi (1-2/3000) [52] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2-**). Non sono mai stati segnalati casi di shock settico o decesso materno in pazienti sottoposte a villocentesi.

Associazione con pre-eclampsia e ritardo di crescita fetale

Alcuni studi hanno messo in luce una possibile associazione tra villocentesi e sviluppo di pre-eclampsia col progredire della gravidanza, verosimilmente legata al danno placentare subito nel corso del prelievo dei villi. Tuttavia molti studi negli anni hanno a loro volta confutato questa ipotesi ed una meta-analisi non ha confermato questa associazione [58] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Uno studio caso-controllo ha invece escluso l'esistenza di una associazione tra villocentesi e ritardo di crescita fetale; dall'analisi di regressione è emerso che la maggiore incidenza di pre-eclampsia nel gruppo sottoposto a villocentesi fosse in realtà dovuta a fattori di confondimento sia di origine materna sia di origine fetale (ad esempio bassi livelli di pregnancy-associated plasma protein-A PAPP-A oppure elevate resistenze vascolari a livello delle arterie uterine) [59] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**).

Fattori di rischio per complicanze

Si riscontrano più bassi tassi di perdita fetale se si effettuano più di 100 procedure per anno [2]. L'opinione di esperti suggerisce di rivalutare le competenze dell'operatore qualora il tasso di perdita fetale ecceda il valore di 8 su 100 villocentesi consecutive oppure il tasso di fallimento del campionamento ecceda il valore di 5 su 100 villocentesi consecutive [2].

Un ampio studio retrospettivo ha individuato alcuni fattori di rischio associati ad aborto post-villocentesi quali appartenenza all'etnia Afro-Americana, doppio passaggio dell'ago o doppia aspirazione, severa perdita ematica nel corso della villocentesi, età materna < 25 anni, epoca gestazionale < 10 settimane [54] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA 2++**). La presenza di anomalie strutturali del feto e di un aumentato spessore della traslucenza nucale (NT) sono associate ad un aumentato rischio di base di aborto [2]. In questi casi la villocentesi comporta un ulteriore incremento del rischio. Anche bassi livelli sierici di PAPP-A sembrerebbero presentare un aumentato rischio d'aborto post-villocentesi, verosimilmente per l'associazione esistente tra bassi livelli di PAPP-A e disordini placentari [60] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Esistono ulteriori fattori che potrebbero essere causa di un aumento del rischio perdita fetale a seguito del prelievo dei villi coriali, la cui influenza non è stata del tutto chiarita. Tra questi fattori di rischio citiamo [3,22]: miomi uterini, età materna avanzata, malformazioni uterine, separazione corion-amniotica, ematoma sottocoriale, sanguinamento materno in atto o pregresso, utero retroverso, bradicardia fetale post-procedurale persistente (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2-**).

PRELIEVO DI SANGUE FETALE

-Il prelievo di sangue fetale dovrebbe essere eseguito a partire dalle 18 settimane + 0 giorni, utilizzando un ago da 20-22 G per via transaddominale, sotto guida ecografica.

-Il prelievo di sangue fetale viene effettuato per ricercare eventuali mosaicismi cromosomici in seguito ad amniocentesi e per valutare lo stato ematologico del feto.

-Il rischio di perdita fetale in seguito a prelievo di sangue fetale aumenta in presenza di anomalie strutturali fetali (inclusa l'idrope), restrizione di crescita intrauterina (IUGR) e, probabilmente, anche nei feti di età gestazionale < 24 settimane (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: B**).

Sono state descritte diverse modalità di approccio alla vena ombelicale per effettuare il prelievo di sangue fetale, tra cui la "cordocentesi o funicolocentesi" (a livello dell'inserzione placentare del cordone oppure di un'ansa libera) e l'accesso alla vena nel suo tratto intra-addominale per via trans-epatica. Il termine "cordocentesi" indica la puntura ecoguidata della vena del cordone ombelicale (vena ombelicale) a scopo diagnostico (prelievo del sangue fetale) oppure terapeutico (trasfusione intrauterina o instillazione di farmaci). La prima casistica pubblicata sulla cordocentesi risale al 1987 [61]. Tale procedura dovrebbe sempre essere eseguita dopo il completamento delle 18 settimane + 0 giorni di gestazione, poiché prima di tale epoca il rischio di perdita fetale è maggiore [62].

Tecnica

Si inserisce per via transaddominale e sotto costante guida ecografica un ago da 20-22 G che viene introdotto all'interno della vena ombelicale. Solitamente viene utilizzata la tecnica a mano libera, sebbene alcuni operatori prediligano l'ago montato su guida. Se la placenta è anteriore si suggerisce di pungere il cordone a livello della sua inserzione placentare; in caso di placenta posteriore si suggerisce di pungere un'ansa libera del cordone oppure la porzione intra-addominale della vena ombelicale [62] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA:4**). Quando l'ago raggiunge l'obiettivo è possibile effettuare un breve lavaggio con soluzione fisiologica per assicurarsi che la posizione dell'ago sia corretta. Si consiglia massima cautela nell'evitare le arterie ombelicali. L'aspirazione della siringa può essere effettuata da un assistente oppure dall'operatore stesso fino a quando non si raggiunge la quantità necessaria di sangue. L'origine del sangue dovrebbe essere confermata microscopicamente (analisi automatizzata del sangue) valutando il volume corpuscolare medio oppure tramite un test di acidificazione rapido (ad esempio: test di Kleihauer Betke o test di Apt) [62]. Qualora l'accesso al cordone risulti difficoltoso oppure fallisca il tentativo di prelievo a livello dell'inserzione placentare del cordone è possibile effettuare il prelievo a livello della vena intraepatica [63]. Un vantaggio del prelievo a livello intraepatico è rappresentato dalla assenza di complicazioni cordonali oltre che dalla riduzione del rischio di perdita ematica fetale ed emorragia feto-materna. Infine, con questa metodica di prelievo si ha assoluta certezza circa l'origine fetale del sangue prelevato.

Perdita fetale

Il rischio di perdita fetale in seguito al prelievo di sangue fetale varia tra l'1% ed il 2 % [64-66]. Un ampio studio retrospettivo basato su 1821 donne sottoposte a prelievo di sangue fetale con buon esito della procedura ha dimostrato un rischio pari al 3.2% nelle gravidanze sottoposte al prelievo di sangue fetale e dell'1.8% nel gruppo di controllo, con un tasso di perdita fetale netto pari all'1.4% [64]. (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Tra i fattori associati ad un aumento del rischio di perdita fetale post-procedura annoveriamo le anomalie fetali, lo IUGR ed un'epoca gestazionale < 24 settimane. Un piccolo studio retrospettivo ha dimostrato tassi di perdita fetale pari al 14% (4/29) in feti con difetti strutturali e del 25% (9/36) in feti con idrope, mentre in feti strutturalmente normali all'esame ecografico il tasso di perdita fetale si aggirava attorno all'1% (1/176) [65] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Un altro studio retrospettivo molto simile, ma di dimensioni maggiori (n=1878) ha riportato un aumento dei tassi di perdita fetale in feti IUGR (8.9%) oppure affetti da anomalie strutturali (13.1%) rispetto all'1% in feti strutturalmente normali all'indagine ecografica [66]. (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Infine un altro studio retrospettivo di ampie dimensioni ha preso in analisi 2010 procedure dimostrando come la perdita fetale post-prelievo aumenti prima delle 24 settimane di gestazione e diminuisca oltre questa epoca (2.7% e 1.9%). (**LIVELLO DELL'EVIDENZA 2++**).

Questa procedura dovrebbe essere effettuata esclusivamente da operatori esperti. Sebbene non esistano specifiche evidenze a riguardo è ragionevole pensare che il rischio di complicazioni o di fallimento della procedura si riducano all'aumentare dell'esperienza dell'operatore.

CRITERI DI ELEGGIBILITA' PER LA DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

-Si consiglia di eseguire un dettagliato counselling prima dell'esecuzione di qualsiasi tipo di diagnosi prenatale invasiva, illustrando i vantaggi, i rischi e gli aspetti tecnici della procedura proposta.

-Tra le indicazioni correnti all'esecuzione della diagnosi prenatale invasiva sono inclusi l'aumentato rischio di anomalia cromosomica fetale, l'aumentato rischio di patologia genetica o metabolica ereditarie e l'aumentato rischio infettivo perinatale.

Prima di eseguire una procedura di diagnosi prenatale invasiva è necessario eseguire un approfondito counselling con la coppia. Tale counselling può essere effettuato dallo specialista in ostetricia o medicina fetale che effettuerà l'esame, dal genetista oppure da un'ostetrica adeguatamente formata (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**). Nel corso del counselling con la coppia si consiglia di approfondire i seguenti argomenti [2]: rischi e benefici della diagnosi prenatale invasiva rispetto allo screening [17,22]; differenze tra amniocentesi e villocentesi in termini di accuratezza delle due metodiche, complicanze legate all'una o all'altra metodica, tempistiche per l'esecuzione delle due procedure e, in caso di risultato patologico, differenti modalità di interruzione della gravidanza in base alla metodica effettuata [22]. Si consiglia inoltre di citare i rischi di perdita fetale legati alle due metodiche tratti da stime locali e nazionali e di informare la coppia circa l'accuratezza e le limitazioni degli esami di laboratorio che verranno eseguiti, mettendo i genitori a conoscenza dei tassi di insuccesso dell'analisi, delle tempistiche necessarie per avere il referto del laboratorio, delle modalità di comunicazione dell'esito dell'esame da parte della struttura, delle possibilità di continuare ad essere seguiti una volta ricevuto l'esito dell'esame ed infine della necessità di immunoprofilassi post-procedura per

tutte le pazienti Rh negative non immunizzate [2,22]. Al termine di tale dettagliato processo di informazione va ottenuto dalla donna il consenso informato scritto all'esecuzione dell'esame [2].

Indicazioni all'amniocentesi o alla villocentesi

Attualmente le indicazioni all'esecuzione di diagnosi prenatale invasiva tramite amniocentesi o villocentesi includono: l'aumentato rischio di aneuploidia fetale, l'aumentato rischio di specifica malattia genetica o biochimica nota in anamnesi, una malattia infettiva materna a rischio di trasmissione fetale ed infine, in alcune specifiche circostanze, la richiesta materna.

Aumentato rischio di aneuploidia fetale (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

Un aumentato rischio di aneuploidia fetale può derivare da un test di screening (test combinato del primo trimestre, test del cfDNA anche noto come NIPT "non invasive prenatal test", esami biochimici del secondo trimestre quali il triplo o il quadrupolo test), da un riscontro ecografico di anomalia fetale (anomalia strutturale fetale, associata ad anomalie cromosomiche), dall'anamnesi ostetrica della paziente (precedente gravidanza con feto affetto da aneuploidia) o dall'anamnesi familiare della coppia (presenza in famiglia di una nota traslocazione o inversione bilanciata, di una aneuploidia o di un mosaicismo per aneuploidia) [17].

L'età materna avanzata (>35 anni) da sola non costituisce una sufficiente indicazione alla diagnosi prenatale invasiva, sebbene in alcuni paesi ancora venga accettata come indicazione [4,17]. Anche la gravidanza ottenuta tramite tecniche di procreazione medicalmente assistita non costituisce, da sola, una sufficiente indicazione alla diagnosi prenatale invasiva. Tuttavia nelle gravidanze ottenute tramite ICSI ("intracytoplasmic sperm injection") per oligospermia è buona norma informare i genitori dell'esistenza di un aumentato rischio di anomalie cromosomiche degli spermatozoi, possibilmente responsabili dell'infertilità paterna e trasmissibili alla prole di sesso maschile.

Aumentato rischio di specifica malattia genetica o biochimica fetale, già nota in anamnesi [17] (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4).

Tale aumento del rischio può derivare da una patologia ereditaria presente all'interno della famiglia, dovuta ad una mutazione genetica oppure ad un difetto metabolico già noti in anamnesi; da una madre con feto di sesso maschile, portatrice di alterazione cromosomica legata alla X ; da genitori entrambi portatori di mutazione per patologia autosomica recessiva.

Malattia infettiva materna a rischio di trasmissione fetale [17] (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4).

In caso di infezione materna primaria o di sieroconversione da toxoplasma, citomegalovirus o rosolia è indicata l'esecuzione di diagnosi prenatale invasiva per confermare o escludere la trasmissione dell'infezione al feto.

Richiesta materna (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4).

La richiesta materna da sola generalmente non costituisce un valido motivo per l'esecuzione di diagnosi prenatale invasiva, tuttavia, in casi altamente selezionati (ad esempio coppie con forte ansia) è possibile effettuare diagnosi prenatale, dopo aver eseguito un approfondito counselling.

Indicazioni al prelievo di sangue fetale (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4).

Le più comuni indicazioni all'esecuzione di un prelievo di sangue fetale includono: ricerca di un mosaicismo fetale sospettato in seguito all'amniocentesi; valutazione dello stato ematologico fetale (quantificazione dell'anemia fetale o della conta piastrinica/linfocitaria) [17, 62].

Altre indicazioni sono invece divenute molto rare nella pratica clinica attuale, poiché in larga parte rimpiazzate dalla villocentesi ed amniocentesi [17,62]: esecuzione del cariotipo fetale completo, del gruppo sanguigno o tipizzazione antigeni piastrinici, esecuzione di test genetici, presenza di infezione, studi su plasma o siero (es. metaboliti, ormoni).

CHECKLIST PRE E POST-PROCEDURA DI DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

-Si consiglia di valutare l'eventuale negatività materna al fattore Rh e la presenza di alloanticorpi nel siero materno prima di eseguire qualsiasi procedura di diagnosi prenatale invasiva; in pazienti non immunizzate è necessaria la somministrazione in via profilattica delle immunoglobuline anti-D entro 72h dalla procedura, a meno che non venga verificata anche la negatività paterna al fattore Rh.

-Non è raccomandato lo screening universale su sangue materno per virus trasmessi per via ematica quali l'epatite B e C (HBV ed HCV) o il virus da immunodeficienza acquisita (HIV).

-Attualmente non è raccomandato l'uso di profilassi antibiotica pre-procedura.

-Durante l'esecuzione della procedura è necessaria l'osservanza dei principali criteri dell'asepsi.

-Al termine della procedura è necessario produrre un referto, indirizzato al curante della paziente, con dettagliata descrizione di quanto eseguito.

Verifica del gruppo sanguigno materno ed immunoprofilassi (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+)

Attualmente tutte le linee guida raccomandano la verifica dell'emogruppo materno e dell'eventuale presenza di alloanticorpi sierici prima di eseguire procedure invasive di diagnosi prenatale [68]. È altamente raccomandata l'esecuzione dell'immunoprofilassi post-procedura in pazienti Rh negative, non immunizzate, con partner Rh positivo (eccetto in feti con gruppo sanguigno Rh negativo verificato tramite cffDNA su siero materno). Generalmente viene consigliata l'esecuzione di una singola dose intramuscolo di anticorpi anti-D in preparazioni già pronte all'uso [68]. Uno studio prospettico condotto su 361 donne Rh negative sottoposte ad amniocentesi senza immunoprofilassi con feto Rh positivo ha dimostrato il riscontro in 5 di queste (1.4%) di anticorpi anti-D ed assenza di conseguenze cliniche per i neonati [69]. In uno studio simile, condotto su 115 donne, il tasso di pazienti con anticorpi anti-D in circolo riscontrato è stato del 3.4% e per uno di questi 4 neonati sono state necessarie 2 exsanguinotrasfusioni, sebbene lo sviluppo neurocomportamentale valutato all'età di due anni sia risultato nella norma [70]. Tuttavia l'immunoprofilassi post-amniocentesi viene raccomandata fin dagli anni settanta [71] ed in una serie di 944 donne Rh negative sottoposte ad immunoprofilassi non sono stati riscontrati casi di sensibilizzazione materna [72].

Screening materno per virus a trasmissione ematica

Il rischio di trasmissione di virus dalla madre al feto nel corso di procedure di diagnosi prenatale invasiva è trascurabile ed è probabilmente limitato a casi di madri che presentano alte cariche virali [73].

Antibioticoprofilassi

Esiste un solo trial clinico randomizzato sulla somministrazione profilattica di antibiotici (azitromicina) pre-amniocentesi (n= 34923): nel gruppo pre-trattato con azitromicina (n=21219) sono stati osservati tassi inferiori di aborto e pPROM rispetto al gruppo non trattato con antibiotici (rispettivamente 0.28% e 1.12%, n=12529) [74] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1-**). Tuttavia la pubblicazione di questo studio ha scatenato una disputa scientifica e legale [75-77] e, per tale motivo, è necessario interpretare con cautela questi risultati. Uno studio retrospettivo di dimensioni molto inferiori (n= 1744) non ha trovato differenti tassi di perdita fetale tra il gruppo trattato con antibiotici profilattici (amoxicillina/acido clavulanico o azitromicina, tasso 1.3%) ed il gruppo non trattato (1.2%) [78] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Attualmente vi è una scarsità di evidenze scientifiche di alta qualità che consentano di valutare correttamente l'effetto dell'antibioticoprofilassi prima di una procedura invasiva [79] e per tale motivo le maggiori società scientifiche non consigliano l'antibioticoprofilassi pre-procedura.

Ecografia (pre e post-procedura) (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

Prima di sottoporre una paziente a diagnosi prenatale invasiva è necessario eseguire il controllo ultrasonografico del numero di feti e della loro vitalità, della posizione placentare, della quantità di liquido amniotico e dell'epoca gestazionale [3]. Generalmente un controllo ecografico viene eseguito anche dopo la procedura per il controllo della frequenza cardiaca fetale, della placenta (eventuale presenza di ematomi) e del liquido amniotico. Questo controllo può essere eseguito al termine della procedura oppure dopo qualche giorno, a seconda dei protocolli locali [22].

Asepsi (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

I principali criteri dell'asepsi devono essere rispettati mentre si esegue una procedura invasiva per minimizzare il rischio di infezioni materno-fetali. Si raccomanda l'uso di un carrello con guanti sterili, garze, pinze ed aghi [3]. Prima di eseguire la villocentesi, l'amniocentesi o il prelievo di sangue fetale per via transaddominale è necessario disinfettare la cute dell'addome con soluzione antisettica (clorexedina o iodio) e coprirla con un telo sterile. Spesso viene anche utilizzato un coprisonda sterile. In alternativa è possibile disinfettare dopo ogni utilizzo la sonda. Si consiglia inoltre di utilizzare per ogni procedura un diverso gel ecografico che sia anche sterile, per evitare contaminazione batterica. Prima dell'esecuzione della villocentesi transcervicale si inserisce uno speculum sterile e si disinfettano con soluzione antisettica le pareti vaginali e la portio [2,3,5].

Anestesia locale

Una recente meta-analisi della Cochrane ha preso in considerazione i risultati di 5 trial clinici randomizzati basati sullo studio di diverse modalità di analgesia in corso di amniocentesi; non sono stati condotti trial clinici sull'analgesia in corso di villocentesi. La meta-analisi ha concluso affermando che, in genere, l'amniocentesi provoca un dolore molto tollerabile alla paziente e per tale motivo non vi sono evidenze a favore dell'utilizzo di analgesici [80] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 1+**). È possibile somministrare un anestetico locale prima della villocentesi transaddominale per ridurre il fastidio provocato alla paziente da aghi di maggiore calibro [2,3,8]. Da un recente sondaggio britannico è emerso che l'89% degli operatori utilizza anestesia locale prima della villocentesi [47] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 3**). Prima del prelievo di sangue fetale è possibile considerare l'utilizzo di anestetico locale principalmente per ridurre il rischio di movimento materno nel corso della procedura [62]. Non si hanno segnalazioni in merito all'utilizzo di anestesia locale pre-villocentesi transcervicale.

Refertazione (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

È necessario produrre un referto che descriva la procedura in modo dettagliato e consegnarlo alla paziente affinché lo porti al suo curante. All'interno di tale referto è importante inserire l'indicazione all'esame [2], descrivere i reperti ecografici pre-procedura [2], descrivere la procedura stessa, includendo: lo strumento utilizzato, il sito del passaggio dell'ago, il numero di punture effettuate, la quantità del campione prelevato, l'aspetto del campione di liquido amniotico (in caso di amniocentesi), la vitalità fetale, l'aspetto della placenta e la quantità di liquido amniotico post-procedura [2], l'eventuale negatività materna al fattore Rh e l'immunoprofilassi [2], la tipologia di indagini di laboratorio richieste (cariotipo ottenuto tramite bandeggio G e/o QF PCR "quantitative fluorescence polymerase chain reaction" /FISH "fluorescence *in situ* hybridization" con o senza microarray) [2].

Norme post-procedura (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

Non è strettamente necessario limitare l'attività fisica per 12-24 ore poiché non vi sono evidenze di un reale beneficio clinico. Generalmente non viene raccomandato l'utilizzo di alcun farmaco specifico dopo la procedura, sebbene la paziente possa assumere del paracetamolo al termine della procedura per ridurre il fastidio a livello addominale [3]. Non è stato dimostrato alcun beneficio sugli esiti clinici dall'assunzione di progesterone o di farmaci tocolitici (es. terbutalina) post-amniocentesi o post-villocentesi [79]. Un secondo counselling col genetista dopo la procedura si rende necessario solo in caso di risultato anomalo dell'esame [17] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**).

TIPOLOGIE DI ESAME GENETICO: COSA RICERCARE

È possibile effettuare le seguenti indagini di laboratorio sul campione di origine fetale ottenuto tramite la procedura invasiva: cariotipo completo, test rapidi, diagnosi molecolare di anomalie cromosomiche e diagnosi di malattie monogeniche.

Cariotipo completo (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

Convenzionalmente lo studio del cariotipo si basa sull'analisi in metafase degli amniociti in coltura (ottenuti tramite amniocentesi) oppure delle cellule mesenchimali placentari (ottenute tramite villocentesi). Sono necessarie due settimane per avere i risultati. L'analisi in metafase dei linfociti fetali ottenuti tramite cordocentesi richiede invece circa 2-5 giorni. Tramite la villocentesi è comunque possibile effettuare l'analisi diretta delle metafasi citotrofoblastiche in circa 5 giorni [17].

Test rapidi (LIVELLO DELL'EVIDENZA:4)

Test rapidi come la QF-PCR (più di rado la FISH) possono essere condotti su villi coriali o su liquido amniotico per analizzare determinati cromosomi (21, 13, 18, X ed Y). Con test rapidi è possibile avere risultati in 1-2 giorni e solitamente sono consigliati in feti che giungono alla diagnosi invasiva a seguito di uno screening positivo oppure del riscontro all'esame ecografico di anomalie o marcatori associati alle più comuni aneuploidie [17]. In alcuni sistemi sanitari la QF-PCR ha completamente rimpiazzato il cariotipo completo. Tuttavia, talvolta, questa metodica può rivelarsi poco accurata: sono stati infatti riscontrati casi di falsi positivi o falsi negativi. Per tale motivo un eventuale risultato positivo ottenuto tramite test rapido dovrebbe sempre essere confermato dall'esame con colture in metafase o perlomeno essere associato ad alterazioni ecografiche prima di prendere decisione cliniche circa la prosecuzione o meno della gravidanza [81]. La possibilità di interrompere la gravidanza a seguito di un risultato positivo ottenuto al test rapido non è offerta in tutti i paesi, varia a seconda della tipologia di sistema sanitario e si basa sui protocolli locali.

Diagnosi molecolare di anomalie cromosomiche

Le tecniche di microarray (ad esempio l'ibridazione genomica comparativa su array (aCGH)) sono una recente introduzione nel campo della diagnosi prenatale. Queste metodiche consentono di diagnosticare delezioni e duplicazioni cromosomiche submicroscopiche (variazioni del numero di copie (CNV)) [17]. Sono disponibili diverse piattaforme, tra cui la "genome-wide" (risoluzione di 10-400 Kb), la "targeted" (ad esempio i cromosomi batterici artificiali (BAC) legati a pozzetti ("beads"- BoBs)) ed infine gli array misti. Nel primo grande studio di confronto tra microarray e cariotipo per la diagnosi prenatale è emerso come i microarray fossero in grado di diagnosticare aberrazioni clinicamente rilevanti nel 6.0% dei feti con cariotipo normale e anomalie strutturali nell'1.7% dei feti sottoposti a diagnosi prenatale invasiva per età materna avanzata o screening positivo [82]. In seguito sono stati condotti ulteriori studi che hanno dimostrato una resa diagnostica incrementale combinata, con l'uso di aCGH, rispettivamente del 7.0% e del 5.0% in feti con difetti cardiaci congeniti ed aumentato spessore della translucenza nucale [83,84] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Attualmente si raccomanda l'utilizzo di queste tecniche per feti con anomalie strutturali [82] o translucenza nucale >3.5 mm nel primo trimestre [83,84]. In queste gravidanze a rischio l'uso di microarray permette un aumento della diagnosi di variazioni del numero di copie (CNV) patologiche rispetto all'analisi convenzionale. L'utilizzo di queste metodiche in popolazioni non selezionate è tutt'ora oggetto di forte dibattito nel mondo scientifico poiché in questi casi è possibile riscontrare varianti di significato ignoto (VOUS) sulle quali è molto difficile esprimersi e dare un giudizio clinico. Alcuni studiosi hanno addirittura proposto di non segnalare il riscontro di eventuali VOUS per evitare di dover effettuare un counselling clinicamente poco utile, nel corso del quale è molto difficile fornire concrete risposte ai genitori [6] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**).

Diagnosi di patologie monogeniche

Le procedure invasive possono essere utilizzate per diagnosticare in epoca prenatale qualunque malattia monogenica il cui difetto molecolare sia noto o sia stato precedentemente caratterizzato (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**).

INFEZIONE MATERNA

-Il rischio di trasmissione verticale di HBV post-amniocentesi non è superiore in pazienti HBe-Ag negative.

-Il rischio di trasmissione verticale di HIV non è superiore in pazienti in terapia HAART ("highly active antiretroviral therapy").

-Tuttavia in pazienti HBV, HCV ed HIV positive è preferibile effettuare diagnosi prenatale non invasiva; qualora si effettui l'amniocentesi è importante compiere ogni sforzo per evitare la placenta.

In donne con infezione cronica è importante evitare il passaggio transplacentare dell'ago nel corso dell'amniocentesi. Il tasso di trasmissione al feto sembra dipendere dalla carica virale materna [85].

Epatite B (HBV)

Uno studio di confronto tra i tassi di trasmissione verticale di HBV in donne HBsAg positive sottoposte ad amniocentesi o meno ha evidenziato tassi di trasmissione globale superiori nel gruppo sottoposto ad amniocentesi (6.35% e 2.53%). Non sono state rilevate grandi differenze nei tassi di trasmissione verticale tra il gruppo amniocentesi ed il gruppo di controllo se la paziente sottoposta ad amniocentesi aveva una bassa carica virale. Tuttavia per le pazienti con alta carica virale ($\geq 7 \log_{10}$ copie/mL) sottoposte ad amniocentesi i tassi di trasmissione verticale sono risultati di molto più alti (50%) [85] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Il tasso di trasmissione fetale non sembra aumentato in donne HBsAg positive ed HBeAg negative rispetto ai controlli (1.5-3%), mentre il rischio è probabilmente aumentato in donne HBeAg positive, rispetto ai controlli. Non ci sono dati sull'eventuale ruolo protettivo delle immunoglobuline o della terapia antivirale eseguite prima della procedura [86,87] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Sebbene l'evidenza sia scarsa, soprattutto riguardo all'aumentato rischio trasmissivo in pazienti HBeAg positive, attualmente la "Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada" raccomanda di compiere ogni sforzo nel corso dell'amniocentesi per non inserire l'ago attraverso la placenta o vicino alla placenta, in pazienti HBV positive [73].

Epatite C (HCV)

Vi sono pochi dati sul tasso di trasmissione verticale di HCV post-amniocentesi, tuttavia i tassi di infezione fetale sembrano molto simili sia in pazienti che hanno effettuato l'amniocentesi sia in pazienti che non l'hanno effettuata [17].

Virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV)

L'amniocentesi ha rappresentato un serio fattore di rischio per trasmissione verticale di HIV prima dell'avvento della terapia anti-retrovirale. Uno studio retrospettivo condotto su 533 nati da madri positive all'HIV-1 ha dimostrato come l'amniocentesi fosse un fattore di rischio indipendente per la trasmissione verticale del virus, aumentandone di circa 4 volte il rischio (odds ratio, 4.1 (IC 95%, 2.1-9.5)) [88] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). L'introduzione della terapia anti-retrovirale combinata (c-ART) ha completamente modificato la situazione. Uno studio spagnolo ha confrontato gli esiti di 366 madri HIV positive prima e dopo il 1997, anno in cui è stata diffusa su larga scala la terapia anti-retrovirale. Da questo studio è emerso che i tassi di trasmissione verticale del virus prima del 1997 si aggiravano attorno al 30% (3/10) in donne sottoposte ad amniocentesi e al 16.2% (40/247) in donne non sottoposte ad amniocentesi, per poi scendere allo 0% (0/18) ed al 3.7% (3/81) rispettivamente dopo la diffusione della terapia anti-retrovirale [89] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Valori molto simili sono stati riscontrati in uno studio italiano (3.3%) [90] ed in uno studio francese (0%) [91], entrambi condotti dopo il 1997. Uno studio multicentrico di origine francese ha dimostrato la superiorità della HAART (tasso di trasmissione 0%) rispetto al regime di trattamento con sola zidovudina (tasso di trasmissione 6.1%) o al non trattamento (tasso di trasmissione 25%) in pazienti HIV positive sottoposte ad amniocentesi [92] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Il tasso di trasmissione verticale del virus dell'HIV non sembra aumentato in pazienti positive sottoposte ad amniocentesi rispetto ai controlli, a condizione che la carica virale sia bassa e che la paziente assuma la c-ART già da prima del concepimento; qualora la carica virale sia alta il rischio di trasmissione verticale del virus resta non particolarmente elevato a condizione che la donna assuma c-ART da almeno 2 settimane prima dell'amniocentesi [90,93].

La "Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada" afferma che l'amniocentesi sia responsabile di un aumento del rischio di trasmissione verticale di HIV in pazienti che non assumono c-ART. In questi casi, se possibile, è necessario che la paziente inizi immediatamente la terapia con c-ART e che la procedura venga rimandata fino all'azzeramento della carica virale [73]. Come consigliato per le pazienti HBV ed HCV positive, anche per le madri HIV positive è fondamentale che, nel corso dell'amniocentesi, si eviti di inserire l'ago attraverso o vicino alla placenta [73].

Il rischio di trasmissione verticale di HBV, HCV e HIV post-villocentesesi e post-cordocentesesi non è stato ancora studiato a fondo [73].

GRAVIDANZA MULTIPLA

-I tassi di perdita fetale post-amniocentesi e villocentesesi sono simili nelle gravidanze gemellari (**GRADO DELLA RACCOMANDAZIONE: C**).

Le procedure di diagnosi prenatale invasiva in gravidanze multiple dovrebbero essere eseguite da uno specialista in grado di effettuare anche l'interruzione selettiva della gravidanza [17]. Tutti i dati inerenti al rischio di aborto post-procedura derivano da studi di coorte retrospettivi, poiché non esistono studi clinici randomizzati.

Amniocentesi nei gemelli

Numerosi studi retrospettivi hanno valutato il rischio di aborto in gravidanze gemellari sottoposte ad amniocentesi. Tra i più recenti citiamo uno studio caso-controllo canadese che ha riportato un tasso di perdita fetale del 3% a seguito di amniocentesi (0.8% nel gruppo di controllo) [94], uno studio spagnolo che ha riportato tassi di perdita fetale pari al 2.7% (2.6% nel gruppo di controllo) [95] ed infine uno studio americano con un tasso di perdita fetale del 3.2% (1.4% nel gruppo di controllo) [96] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Una meta-analisi ha riportato tassi di perdita fetale combinati del 3.07% e del 2.54% prima delle 24 settimane; per gli studi caso-controllo i tassi di perdita fetali combinati riscontrati sono stati del 2.59% nei gemelli sottoposti ad amniocentesi e dell'1.53% nei controlli (RR 1.81 (IC 95%, da 1.02 a 3.19)) [97]. Non è stata riscontrata alcuna differenza per quel che riguarda il passaggio singolo o ripetuto dell'ago in cavità amniotica (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**).

Villocentesi nei gemelli

Le evidenze riguardanti la villocentesesi nelle gravidanze gemellari sono molto limitate. La meta-analisi menzionata nel paragrafo precedente [97] ha riportato un tasso di perdita fetale combinato pari al 3.84% in gravidanze gemellari sottoposte a villocentesesi. Non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda l'approccio utilizzato

(transaddominale o transcervicale), l'uso di un ago singolo o doppio od il numero di passaggi dell'ago (singolo o doppio) [97] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2++**). Studi retrospettivi di confronto tra la villocentesi e l'amniocentesi in gravidanze gemellari non hanno riportato differenze significative tra i tassi di perdita fetale post-procedura. Uno studio condotto tra il 1984 ed il 1990 ha riscontrato un tasso di perdita fetale del 3.2% in seguito a villocentesi e del 2.9 % in seguito ad amniocentesi [98]. Dati molto simili sono emersi da uno studio più recente che ha trovato un tasso di perdita fetale del 3.85% post-villocentesi e del 4.0% post-amniocentesi (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Non vi sono sufficienti elementi per confrontare il rischio di perdita fetale post-villocentesi con il rischio di perdita fetale di base in gravidanze gemellari.

Gravidanze di ordine superiore

Vi sono scarsissimi dati sul rischio di aborto dovuto a procedure di diagnosi prenatale invasiva in gravidanze multiple di ordine superiore.

Corionicità e mappatura

Prima di effettuare una procedura di diagnosi prenatale invasiva in una gravidanza multipla è fondamentale effettuare un mappatura della gravidanza ossia valutare con attenzione la corionicità e la placentazione, etichettare i gemelli (con diagrammi) e registrare l'eventuale discordanza del sesso [3,100,101].

Tecnica d'esecuzione dell'amniocentesi nella gravidanza gemellare

Gemelli bicoriali

In una gravidanza gemellare bicoriale si consiglia di prelevare liquido amniotico da entrambi i sacchi amniotici. Con la tecnica della doppia puntura (una per sacco) vi è un lieve rischio (1.8%) di pungere due volte lo stesso sacco [101]. Per ovviare a tale problematica, nei casi dubbi oppure nelle gravidanze di ordine superiore, è possibile iniettare un colorante (indaco carminio) nel primo sacco. L'utilizzo del blu di metilene è stato abbandonato a causa dell'aumentato rischio di anomalie fetali (atresia del digiuno) [102, 103] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**). Un'alternativa è rappresentata dalla tecnica della puntura singola con passaggio attraverso il setto interamniotico. Qualora si scelga questa metodica si consiglia di eliminare i primi 1-2 mL prelevati dopo il passaggio attraverso il setto interamniotico per evitare una eventuale contaminazione del secondo prelievo [101]. La metodica della doppia puntura non aumenta il rischio di perdita fetale rispetto alla metodica della puntura singola [99]. (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 2+**).

Gemelli monocoriali biamniotici

Nelle gravidanze monocoriali biamniotiche è possibile prelevare il campione solamente da un sacco nei casi in cui la corionicità sia stata stabilita con precisione tramite una ecografia effettuata prima delle 14 settimane di gestazione ed in assenza di discordanza tra gemelli per quanto riguarda la crescita fetale e l'anatomia fetale. Qualora non sussistano queste condizioni si consiglia di effettuare il prelievo da entrambi i sacchi [101] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**). Il doppio prelievo è consigliabile anche nelle gravidanze ottenute tramite tecniche di fecondazione assistita oppure nei casi di gemelli discordanti per anomalie strutturali o per crescita (presenza di piccola percentuale di rischio di eterocariotipia). Qualora sia clinicamente indicato il prelievo da entrambi i sacchi consiglia la tecnica della doppia puntura per evitare in genere una monoamniocità iatrogena [101] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**).

Tecnica d'esecuzione della villocentesi nella gravidanza gemellare

La tecnica d'esecuzione della villocentesi nelle gravidanze multiple dovrebbe essere scelta in base alla corionicità.

Gemelli bicoriali

Nei gemelli bicoriali sottoposti a villocentesi per via transaddominale è possibile effettuare due punture separate, una per ogni area trofoblastica, oppure utilizzare una tecnica di passaggio singolo dell'ago con prelievo da entrambe placente in sequenza (utilizzando un ago doppio con esterno singolo da 18-19 G e due distinti corpi interni da 20 G, uno per ogni placenta). Nelle villocentesi transcervicali si consiglia di effettuare due biopsie, una per ogni sito placentare [101] (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**). Errori od inaccurately di campionamento possono avvenire nel 3-4% dei casi [101]. Nell'1% dei casi di gravidanze bicoriali può avvenire una cross-contaminazione del tessuto coriale, con presenza di cellule di provenienza placentare diversa all'interno dello stesso campione [104]. Per ridurre il rischio di ottenere risultati inaffidabili o poco accurati si consiglia di prelevare il campione di placenta nei pressi dell'inserzione del cordone e di evitare l'area attorno al setto interamniotico. In alternativa è possibile prendere in considerazione una tecnica combinata transaddominale e transcervicale (**LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4**).

Gemelli monocoriali (LIVELLO DELL'EVIDENZA: 4)

In questi casi è sufficiente effettuare un singolo prelievo attorno all'equatore amniotico. Nelle gravidanze monocoriali ottenute con tecniche di fecondazione assistita oppure nei casi di gemelli discordanti per anomalie o crescita fetale si consiglia di preferire una amniocentesi con doppio prelievo per il rischio che vi sia un eterocariotipia [101].

TROMBOPROFILASSI

Attualmente non vi sono dati presenti in letteratura inerenti all'interruzione del trattamento di tromboprofilassi prima di procedure di diagnosi prenatale invasiva. Le informazioni di cui siamo in possesso derivano da dati riguardanti altre procedure invasive percutanee, ad esempio le biopsie epatiche. Attualmente non sembra clinicamente indicato consigliare alla donna di interrompere un trattamento con cardioaspirina o eparina a basso peso molecolare a dosaggi profilattici prima di sottoporsi a diagnosi prenatale invasiva, sebbene si possa consigliare alla paziente di saltare solamente una singola dose di eparina [105,106].

AUDIT

Ogni operatore dovrebbe condurre un personale controllo della qualità sul proprio operato tenendo nota dei seguenti fattori: numero di procedure effettuate ogni anno, numero di campioni con materiale insoddisfacente, numero di campioni con liquido amniotico ematico, numero di procedure che hanno richiesto più di una puntura e quanti passaggi dell'ago sono stati necessari per ottenere il campione, outcome delle gravidanze sottoposte a diagnosi prenatale (incluso il numero di gravidanze esitate in aborti e l'intervallo di tempo intercorso tra procedura ed aborto; perdite di liquido amniotico; parti prematuri; PROM) ed infine ogni altra eventuale complicanza [22].

TRAINING

L'apprendimento delle tecniche di diagnosi prenatale invasiva dovrebbe iniziare su simulatori o modelli. In tal modo l'operatore può esercitarsi sul mantenimento della traiettoria dell'ago all'interno della finestra ultrasonografica, in modo che l'ago sia sempre sotto visione e la procedura si svolga in sicurezza. Il training clinico vero e proprio dovrebbe iniziare con delle amniocentesi semplici (ad esempio con placenta posteriore e adeguata tasca di liquido amniotico) o delle villocentesi semplici (ad esempio con placenta facilmente accessibile) oppure in pazienti che intendono sottoporsi ad interruzione di gravidanza (qualora sia consentito). Il numero di procedure minime che un operatore deve effettuare per ottimizzare la propria competenza ed agire in sicurezza è molto variabile in letteratura (da 45 a 300). Tuttavia, molti esperti del campo concordano nell'affermare che dopo 100 procedure effettuate in modo autonomo si possiedono i requisiti sufficienti per poter condurre diagnosi prenatale invasiva in sicurezza [2].

AUTORI DELLE LINEE GUIDA

Queste Linee Guida sono state scritte per conto della International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology da:

T. Ghi, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Parma, Parma, Italy

A. Sotiriadis, Department of Obstetrics and Gynecology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

P. Calda, Department of Obstetrics and Gynecology, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

F. Da Silva Costa, Monash Ultrasound for Women and Perinatal Services, Monash Medical Centre, Melbourne, Victoria, Australia

N. Raine-Fenning, Division of Child Health, Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, University of Nottingham, Nottingham, UK – Nurture Fertility, The Fertility Partnership

Z. Alfirevic, Department of Women's and Children's Health, University of Liverpool, Liverpool, UK

G. McGillivray, Victorian Clinical Genetics Services, Mercy Hospital for Women, Murdoch Children's Research Institute, Melbourne, Australia

Revisori delle Linee Guida:

R. Fareeduddin, F. Prefumo, A. Borrell, A. Khalil,

M. Bebbington and M. Vicea Calomfirescu.

La peer-review di queste Linee Guida è stata effettuata dalla Commissione per gli Standard Clinici.

Revisori esterni delle Linee Guida:

M. D. Kilby, Centre for Women's and Children's Health, University of Birmingham and Fetal Medicine Centre, Birmingham Women's Foundation Trust, Birmingham, UK

S.Suresh, Mediscan, Mylapore, Chennai, India

CITAZIONE

Queste Linee Guida devono essere citate come: Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, McGillivray G, on behalf of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis in obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; **48**: 256–268.

BIBLIOGRAFIA

1. Sarto GE. Prenatal diagnosis of genetic disorders by amniocentesis. *Wis Med J* 1970; 69: 255 – 260.
2. Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling. Green-top Guideline No. 8, June 2010.
3. Wilson RD, Davies G, Gagnon A, Desilets V, Reid GJ, Summers A, Wyatt P, Allen VM, Langlois S; Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Amended Canadian guideline for prenatal diagnosis (2005) change to 2005 – techniques for prenatal diagnosis. *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27: 1048 – 1062.
4. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 2010; 27: 1–7.
5. Cruz-Lemini M, Parra-Saavedra M, Borobio V, Bennasar M, Goncáez A, Martínez JM, Borrell A. How to perform an amniocentesis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 44: 727 – 731.
6. Athanasiadis AP, Pantazis K, Goulis DG, Chatzigeorgiou K, Vaitis V, Assimakopoulou E, Tzeveleki F, Tsirikis T, Bontis JN. Comparison between 20G and 22G needle for second trimester amniocentesis in terms of technical aspects and short-term complications. *Prenat Diagn* 2009; 29: 761 – 765.
7. Uludag S, Aydin Y, Ibrahimova F, Madazli R, Sen C. Comparison of complications in second trimester amniocentesis performed with 20G, 21G and 22G needles. *J Perinat Med* 2010; 38: 597 – 600.
8. Giorlandino C, Mobili L, Bilancioni E, D'Alessio P, Carcioppolo O, Gentili P, Vizzone A. Transplacental amniocentesis: is it really a higher-risk procedure? *Prenat Diagn* 1994; 14: 803 – 806.
9. Bombard AT, Powers JF, Carter S, Schwartz A, Nitowsky HM. Procedure-related fetal losses in transplacental versus nontransplacental genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 868 – 872.
10. Marthin T, Liedgren S, Hammar M. Transplacental needle passage and other risk-factors associated with second trimester amniocentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 728 – 732.
11. Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 607 – 615.
12. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Nørgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986; 1: 1287 – 1293.
13. Calda P, Brestak M. Amniocentesis vs standard syringe technique for amniocentesis: experience with 1219 cases. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 593.
14. Nuss S, Brebaum D, Grond-Ginsbach C. Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique. *Hum Genet* 1994; 93: 121 – 124.
15. Hockstein S, Chen PX, Thangavelu M, Pergament E. Factors associated with maternal cell contamination in amniocentesis samples as evaluated by fluorescent in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 551 – 556.
16. Welch RA, Salem-Elgharib S, Wiktor AE, Van Dyke DL, Blessed WB. Operator experience and sample quality in genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 189 – 191.
17. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 1459 – 1467.
18. Johnson JM, Wilson RD, Winsor EJ, Singer J, Dansereau J, Kalousek DK. The early amniocentesis study: a randomized clinical trial of early amniocentesis versus midtrimester amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* 1996; 11: 85 – 93.
19. Wilson RD, Johnson J, Windrim R, Dansereau J, Singer J, Winsor EJ, Kalousek D. The early amniocentesis study: a randomized clinical trial of early amniocentesis and midtrimester amniocentesis. II. Evaluation of procedure details and neonatal congenital anomalies. *Fetal Diagn Ther* 1997; 12: 97 – 101.
20. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. The Canadian Early and Mid-trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. *Lancet* 1998; 351: 242 – 247.
21. Farrell SA, Summers AM, Dallaire L, Singer J, Johnson JA, Wilson RD. Club foot, an adverse outcome of early amniocentesis: disruption or deformation? CEMAT. Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial. *J Med Genet* 1999; 36: 843 – 846.
22. Kahler C, Gembruch U, Heling KS, Henrich W, Schramm T; DEGUM. [DEGUM guidelines for amniocentesis and chorionic villus sampling]. *Ultraschall Med* 2013; 34: 435 – 440.

23. O'Donoghue K, Giorgi L, Pontello V, Pasquini L, Kumar S. Amniocentesis in the third trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2007; 27: 1000 – 1004.
24. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 16 – 26.
25. Wulff CB, Gerds TA, Rode L, Ekelund CK, Petersen OB, Tabor A; Danish Fetal Medicine Study Group. The risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first trimester risk screening for Down syndrome – a national cohort of 147 987 singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 38 – 44.
26. Philip J, Silver RK, Wilson RD, Thom EA, Zachary JM, Mohide P, Mahoney MJ, Simpson JL, Platt LD, Pergament E, Hershey D, Filkins K, Johnson A, Shulman LP, Bang J, MacGregor S, Smith JR, Shaw D, Wapner RJ, Jackson LG. Late first-trimester invasive prenatal diagnosis: results of an international randomized trial; NICHD EATA Trial Group. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 1164 – 1173.
27. Borgida AF, Mills AA, Feldman DM, Rodis JF, Egan JF. Outcome of pregnancies complicated by ruptured membranes after genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 937 – 939.
28. Cross HE, Maumenee AE. Ocular trauma during amniocentesis. *Arch Ophthalmol* 1973; 90: 303 – 304.
29. Epley SL, Hanson JW, Cruikshank DP. Fetal injury with midtrimester diagnostic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1979; 53: 77 – 80.
30. Cambiaghi S, Restano L, Cavalli R, Gelmetti C. Skin dimpling as a consequence of amniocentesis. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 888 – 890.
31. Sepu' lveda W, Quiroz V, Ferna' ndez R. [Trauma of the fetal vessels during amnio- centesis]. *Rev Chil Obstet Ginecol* 1984; 49: 99 – 103.
32. Eller KM, Kuller JA. Porencephaly secondary to fetal trauma during amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 865 – 867.
33. Squier M, Chamberlain P, Zaiwalla Z, Anslow P, Oxbury J, Gould S, McShane MA. Five cases of brain injury following amniocentesis in mid-term pregnancy. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42: 554 – 560.
34. Okyay RE, Gode F, Saatli B, Guclu S. Late-onset maternal mortality after amnio- centesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158: 367 – 368
35. Bodner K, Wierrani F, Bodner-Adler B. Maternal sepsis due to *Clostridium per- fringens* after 2nd-trimester genetic amniocentesis. *J Obstet Gynaecol* 2011; 31: 339 – 340.
36. Pinette MG. Maternal death after second-trimester genetic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 409.
37. Elchalal U, Shachar IB, Peleg D, Schenker JG. Maternal mortality following diag- nostic 2nd-trimester amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* 2004; 19: 195 – 198.
38. Plachouras N, Sotiriadis A, Dalkalitis N, Kontostolis E, Xiropotamos N, Paraske- vaidis E. Fulminant sepsis after invasive prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 1244 – 1247.
39. Hess LW, Anderson RL, Golbus MS. Significance of opaque discolored amniotic fluid at second-trimester amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 44 – 46.
40. Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sam- pling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 19 – 24.
41. Towner D, Currier RJ, Lorey FW, Cunningham GC, Greve LC. Miscarriage risk from amniocentesis performed for abnormal maternal serum screening. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 608.e1– 5.
42. Harper LM, Cahill AG, Smith K, Macones GA, Odibo AO. Effect of maternal obesity on the risk of fetal loss after amniocentesis and chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 745 – 751.
43. Department of Obstetrics and Gynecology, Tietung Hospital, Anshan, China. Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic cells during early pregnancy. *Chin Med J (Engl)* 1975; 1: 117 – 126.
44. Niazi M, Coleman DV, Loeffler FE. Trophoblast sampling in early pregnancy. Cul- ture of rapidly dividing cells from immature placental villi. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88: 1081 – 1085.
45. Young C, von Dadelszen P, Alfirevic Z. Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1: CD000114.
46. Jackson LG, Zachary JM, Fowler SE, Desnick RJ, Golbus MS, Ledbetter DH, Mahoney MJ, Pergament E, Simpson JL, Black S, et al. A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villus sampling. The U.S. National Institute of Child Health and Human Development Chorionic-Villus Sampling and Amniocentesis Study Group. *N Engl J Med* 1992; 327: 594 – 598.
47. Carlin AJ, Alfirevic Z. Techniques for chorionic villus sampling and amniocentesis: a survey of practice in specialist UK centres. *Prenat Diagn* 2008; 28: 914 – 919.
48. Battagliarin G, Lanna M, Coviello D, Tassis B, Quarenghi A, Nicolini U. A ran- domized study to assess two different techniques of aspiration while performing transabdominal chorionic villus sampling. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33: 169 – 172.

49. von Dadelszen P, Sermer M, Hillier J, Allen LC, Fernandes BJ, Johnson JA, Shime J, Winsor EJ, Ryan G. A randomised controlled trial of biopsy forceps and cannula aspiration for transcervical chorionic villus sampling. *BJOG* 2005; 112: 559 – 566.
50. Mastroiacovo P, Botto LD, Cavalcanti DP, Lalatta F, Selicorni A, Tozzi AE, Baron-ciani D, Cigolotti AC, Giordano S, Petroni F, et al. Limb anomalies following chorionic villus sampling: a registry based case– control study. *Am J Med Genet* 1992; 44: 856 – 864.
51. Botto LD, Olney RS, Mastroiacovo P, Khoury MJ, Moore CA, Alo CJ, Costa P, Edmonds LD, Flood TJ, Harris JA, Howe HL, Olsen CL, Panny SR, Shaw GM. Chorionic villus sampling and transverse digital deficiencies: evidence for anatomic and gestational-age specificity of the digital deficiencies in two studies. *Am J Med Genet* 1996; 62: 173 – 178.
52. Brambati B, Lanzani A, Tului L. Transabdominal and transcervical chorionic villus sampling: efficiency and risk evaluation of 2,411 cases. *Am J Med Genet* 1990; 35: 160 – 164.
53. Papp C, Beke A, Mezei G, Toth-Paál E, Papp Z. Chorionic villus sampling: a 15-year experience. *Fetal Diagn Ther* 2002; 17: 218 – 227.
54. Odibo AO, Dicke JM, Gray DL, Oberle B, Stamilio DM, Macones GA, Crane JP. Evaluating the rate and risk factors for fetal loss after chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 813 – 819.
55. Donner C, Simon P, Karioun A, Delneste D, Abramowicz M, Cochaux P, Rodesch F. Experience with 1251 transcervical chorionic villus samplings performed in the first trimester by a single team of operators. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 60: 45 – 51.
56. Smidt-Jensen S, Permin M, Philip J, Lundsteen C, Zachary J, Fowler S, Gruning K. Randomized comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling. *Lancet* 1992; 340: 1237 – 1244.
57. Alfrevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 3: CD003252.
58. Basaran A, Basaran M, Topatan B. Chorionic villus sampling and the risk of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 1175 – 1181.
59. Sotiriadis A, Eleftheriades M, Chatzinikolaou F, Chatzistamatiou K, Assimakopoulou E, Chasiakos D. Fetal growth impairment after first-trimester chorionic villus sampling: a case– control study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015 29: 1– 5.
60. Akolekar R, Bower S, Flack N, Bilardo CM, Nicolaides KH. Prediction of miscarriage and stillbirth at 11 – 13 weeks and the contribution of chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 2011; 31: 38 – 45.
61. Orlandi F, Damiani G, Jakl C, Rossi C, Maggio A, Scola B, Cittadini E, Quaratano P. Clinical results and fetal biochemical data in 140 early second trimester diagnostic cordocenteses. *Acta Eur Fertil* 1987; 18: 329 – 333.
62. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Berry SM, Stone J, Norton ME, Johnson D, Berghella V. Fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 2013 Sep; 209: 170 – 180.
63. Nicolaidis P, Nicolini U, Fisk NM, Tannirandorn Y, Nasrat H, Rodeck CH. Fetal blood sampling from the intrahepatic vein for rapid karyotyping in the second and third trimesters. *Br J Radiol* 1991; 64: 505 – 509.
64. Tongsong T, Wanapirak C, Kunavakikul C, Sirirachotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 719 – 723.
65. Maxwell DJ, Johnson P, Hurley P, Neales K, Allan L, Knott P. Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 892 – 897.
66. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Michalakis S. Fetal blood sampling--indication-related losses. *Prenat Diagn* 1998; 18: 934 – 940.
67. Liao C, Wei J, Li Q, Li L, Li J, Li D. Efficacy and safety of cordocentesis for prenatal diagnosis. *Int Gynecol Obstet* 2006; 93: 13 – 17.
68. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The use of Anti-D Immunoglobulin for Rhesus D Prophylaxis. Green-top Guideline No. 22. London: RCOG Press, March 2011. <http://obgyn2015.org/wp-content/uploads/2015/11/Rh-negative-and-AntiD.pdf>.
69. Tabor A, Jerne D, Bock JE. Incidence of rhesus immunisation after genetic amniocentesis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293: 533 – 536.
70. Murray JC, Karp LE, Williamson RA, Cheng EY, Luthy DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am J Med Genet* 1983; 16: 527 – 534.
71. Henrion R, Papa F, Rouvillois JL, Henrion-Gent E. [Early amniocentesis, 1061 punctures and 1000 pregnancies]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1979; 8: 603 – 611.
72. Brandenburg H, Jahoda MG, Pijpers L, Wladimiroff JW. Rhesus sensitization after midtrimester genetic amniocentesis. *Am J Med Genet* 1989; 32: 225 – 226.
73. Gagnon A, Davies G, Wilson RD; Genetics Committee, Wilson RD, Audibert F, Brock JA, Campagnolo C, Carroll J, Chitaya DT, Gagnon A, Johnson JA, MacDonald W, Murphy-Kaulbeck L, Okun N, Pastuck M; Executive and Council of the Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada. Prenatal invasive procedures in women with hepatitis B, hepatitis C, and/or human immunodeficiency virus infections. *J Obstet Gynaecol Can* 2014; 36: 648 – 655.
74. Giorlandino C, Cignini P, Cini M, Brizzi C, Carcioppolo O, Milite V, Cocca C, Gentili P, Mangiafico L, Mesoraca A, Bizzoco D, Gabrielli I, Mobili L. Antibiotic prophylaxis before second-trimester genetic amniocentesis (APGA): a single-centre open randomised controlled trial. *Prenat Diagn* 2009; 29: 606 – 612.

75. Alfirevic Z, Pilu G. Antibiotic prophylaxis for amniocentesis. *Prenat Diagn* 2009;29: 1094.
76. Ferrazzi E. Antibiotic prophylaxis before second-trimester genetic amniocentesis. *Prenat Diagn* 2010; 30: 188.
77. Hobbins JC, Pilu G, Abuhumad A, Alfirevic Z, Bahado-Singh RO, Benacerraf BR, Berkowitz RL, Cetin I, Copel JA, Eik-Nes S, Frusca T, Galan HL, Guaschino S, Mahoney MJ, Marsal K, Malinger G, Marconi AM, Martinelli P, Moore TR, Papageorgiou AT, Platt LD, Rizzo N, Tabor A, Thilaganathan B, Timor-Tritsch IE, Todros T, Yagel S. Antibiotic prophylaxis before amniocentesis. *Prenat Diagn* 2011; 31: 1213 – 1214.
78. Gramellini D, Fieni S, Casilla G, Raboni S, Nardelli GB. Mid-trimester amniocentesis and antibiotic prophylaxis. *Prenat Diagn* 2007; 27: 956 – 959.
79. Mujzinovic F, Alfirevic Z. Technique modifications for reducing the risks from amniocentesis or chorionic villus sampling. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 8: CD008678.
80. Mujzinovic F, Alfirevic Z. Analgesia for amniocentesis or chorionic villus sampling. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 11: CD008580.
81. Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. Technical considerations. American College of Medical Genetics. *Genet Med* 2000; 2: 356 – 361.
82. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet al, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 2175 – 2184.
83. Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, Haak MC. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 27 – 35.
84. Grande M, Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, Borrell A. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 46: 650 – 658.
85. Yi W, Pan CQ, Hao J, Hu Y, Liu M, Li L, Liang D. Risk of vertical transmission of hepatitis B after amniocentesis in HBs antigen-positive mothers. *J Hepatol* 2014; 60: 523 – 529.
86. Towers CV, Asra T, Rumney P. The presence of hepatitis B surface antigen and deoxyribonucleic acid in amniotic fluid and cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 184: 1514 – 1518.
87. Grosheide PM, Quartero HW, Schalm SW, Heijntink RA, Christiaens GC. Early invasive prenatal diagnosis in HBsAg-positive women. *Prenat Diagn* 1994; 14: 553 – 558.
88. Tess BH, Rodrigues LC, Newell ML, Dunn DT, Lago TD. Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in Sao Paulo State, Brazil. Sao Paulo Collaborative Study for Vertical Transmission of HIV-1. *AIDS* 1998; 12: 513 – 520.
89. Maiques V, Garc'ia-Tejedor A, Perales A, Cordero J, Esteban RJ. HIV detection in amniotic fluid samples. Amniocentesis can be performed in HIV pregnant women? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108: 137 – 141.
90. Somigliana E, Bucci AM, Tibaldi C, Alberico S, Ravizza M, Savasi V, Marini S, Matrone R, Pardi G; Italian Collaborative Study on HIV Infection in Pregnancy. Early invasive diagnostic techniques in pregnant women who are infected with the HIV: a multicenter case series. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 437 – 442.
91. Ekoukou D, Khuong-Josses MA, Ghibaudo N, Mechali D, Rotten D. Amniocentesis in pregnant HIV-infected patients. Absence of mother-to-child viral transmission in a series of selected patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 140: 212 – 217.
92. Mandelbrot L, Jasseron C, Ekoukou D, Batallan A, Bongain A, Pannier E, Blanche S, Tubiana R, Rouzioux C, Warszawski J; ANRS French Perinatal Cohort (EPF). Amniocentesis and mother-to-child human immunodeficiency virus transmission in the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales French Perinatal Cohort. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 160.e1–9.
93. Shapiro DE, Sperling RS, Mandelbrot L, Britto P, Cunningham BE. Risk factors for perinatal human immunodeficiency virus transmission in patients receiving zidovudine prophylaxis. Pediatric AIDS Clinical Trials Group protocol 076 Study Group. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 897 – 908.
94. Millaire M, Bujold E, Morency AM, Gauthier RJ. Mid-trimester genetic amniocentesis in twin pregnancy and the risk of fetal loss. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28: 512 – 518.
95. Lenis-Cordoba N, Sánchez MA, Bello-Munoz JC, Sagalá-Martínez J, Campos N, Carreras-Moratonas E, Cabero-Roura L. Amniocentesis and the risk of second trimester fetal loss in twin pregnancies: results from a prospective observational study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 1537 – 1541.
96. Cahill AG, Macones GA, Stamilio DM, Dicke JM, Crane JP, Odibo AO. Pregnancy loss rate after mid-trimester amniocentesis in twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 257.e1–6.
97. Agarwal K, Alfirevic Z. Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 40: 128 – 134.
98. Wapner RJ, Johnson A, Davis G, Urban A, Morgan P, Jackson L. Prenatal diagnosis in twin gestations: a comparison between second-trimester amniocentesis and first-trimester chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 49 – 56.
99. Simonazzi G, Curti A, Farina A, Pilu G, Bovicelli L, Rizzo N. Amniocentesis and chorionic villus sampling in twin gestations: which is the best sampling technique? *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 365.e1–5.

100. Pergament E, Schulman JD, Copeland K, Fine B, Black SH, Ginsberg NA, Frederiksen MC, Carpenter RJ. The risk and efficacy of chorionic villus sampling in multiple gestations. *Prenat Diagn* 1992; 12: 377 – 384.
101. Audibert F, Gagnon A; Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada; Prenatal Diagnosis Committee of the Canadian College of Medical Geneticists. Prenatal screening for and diagnosis of aneuploidy in twin pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can* 2011; 33: 754 – 767.
102. Kidd SA, Lancaster PA, Anderson JC, Boogert A, Fisher CC, Robertson R, Wass DM. A cohort study of pregnancy outcome after amniocentesis in twin pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1997; 11: 200 – 213.
103. McFadyen I. The dangers of intra-amniotic methylene blue. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 89 – 90.
104. Weisz B, Rodeck C. Invasive diagnostic procedures in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2005; 25: 751 – 758.
105. Butwick AJ, Carvalho B. Anticoagulant and antithrombotic drugs in pregnancy: what are the anesthetic implications for labor and cesarean delivery? *J Perinatol* 2011; 31: 73 – 84.
106. Patel IJ, Davidson JC, Nikolic B, Salazar GM, Schwartzberg MS, Walker TG, Saad WA; Standards of Practice Committee, with Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe (CIRSE) Endorsement. Consensus guidelines for periprocedural management of coagulation status and hemostasis risk in percutaneous image-guided interventions. *J Vasc Interv Radiol* 2012; 23: 727 – 736.