

# Amniocentesi: indicazioni e tecniche

**Giovanni Monni, Carolina Axiana, Maria Angelica Zoppi**

---

**Servizio di Ostetricia e Ginecologia, Diagnosi Prenatale e Preimpianto,  
Terapia Fetale, Ospedale Microcitemico, Cagliari**

L'amniocentesi è la tecnica di diagnosi prenatale invasiva più diffusamente utilizzata. Il suo primo impiego risale al 1881 quando Lambi la utilizzò per il trattamento decompressivo del polidramnios. In seguito la procedura è andata diffondendosi solo verso gli anni '50-'60. Inizialmente, il suo impiego era limitato al trattamento delle gravidanze complicate da isomunizzazione e solo alla fine degli anni '60 è stata utilizzata per la diagnosi genetica prenatale. Nel 1966 Carlo Valenti ha riportato la prima diagnosi prenatale di sindrome di Down da liquido amniotico.

Sin dalla sua introduzione alla fine degli anni '60, la tecnica ha subito sostanziali miglioramenti al fine di minimizzare le complicanze e ottimizzare il prelievo di liquido amniotico.

L'introduzione degli ultrasuoni alla fine degli anni '70 ha determinato un'importante evoluzione della tecnica consentendo di individuare il sito ottimale di inserzione dell'ago prima di effettuare l'amniocentesi (prelievo "ecoguidato"). È stato adottato successivamente il prelievo "ecomonitorato" per consentire la visualizzazione costante del feto, della placenta e guidare l'inserimento dell'ago nel sito e alla profondità desiderati.

Con l'avvento del monitoraggio ecografico continuo, la sicurezza e il successo della procedura sono stati significativamente migliorati.

In relazione all'impiego ed ai tempi di esecuzione dell'esame si distinguono:

- *Amniocentesi precoce o precocissima* (early amniocentesis) eseguita tra la 10<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> settimana;
  - *Amniocentesi del II trimestre* (midtrimester amniocentesis) eseguita tra la 15<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> settimana;
  - *Amniocentesi tardiva* (late amniocentesis) eseguita oltre la 24<sup>a</sup> settimana;
- La scelta dell'epoca di esecuzione è strettamente correlata alle indicazioni.

### **Indicazioni**

L'amniocentesi genetica convenzionale viene eseguita tra la 15<sup>a</sup> e la 20<sup>a</sup> settimana di gestazione.

Le indicazioni all'esame rientrano fondamentalmente in due categorie:

- a) in presenza di un rischio procreativo prevedibile a priori, quali età materna avanzata, genitore portatore eterozigote di anomalie cromosomiche strutturali, genitori portatori di mutazioni geniche;
- b) presenza di un rischio fetale evidenziato nel corso della gravidanza: malformazioni fetali rilevate all'esame ecografico, malattie infettive insorte durante la gravidanza, positività dei test ecografici o biochimici per patologie cromosomiche.

In dettaglio, le indicazioni per le indagini citogenetiche per anomalie cromosomiche fetali sono:

1. Età materna avanzata,  $\geq 35$  anni;
2. Genitori con precedente figlio affetto da patologia cromosomica;
3. Genitore portatore di riarrangiamento cromosomico strutturale non associato ad aspetto fenotipico;
4. Genitore con aneuploidie dei cromosomi sessuali compatibili con la fertilità;
5. Anomalie malformative fetali evidenziate con l'ecografia;
6. Probabilità di 1/250 o maggiore che il feto sia affetto da sindrome di Down (o da altre aneuploidie) sulla base di parametri ecografici o biochimici valutati su sangue materno, effettuati con specifici programmi regionali in Centri individuati dalle singole Regioni e sottoposti a verifica continua della qualità (Decreto Ministeriale-Ministero della Sanità - 10 settembre 1998. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 20 ottobre 1998, n. 245).

Ulteriori indicazioni sono rappresentate dal riscontro di infezioni fetali e la determinazione della concentrazione dell'alfa-fetoproteina amniotica nei casi di difetti del tubo neurale o di altri metaboliti fetali, benché l'esame ultrasonografico abbia una sensibilità molto elevata.

La valutazione della maturità polmonare, la determinazione della bilirubina fetale nella isoimmunizzazione materno-fetale, l'evacuazione decompressiva del polidramnios di grado elevato e da ultimo lo studio dei fattori di rischio infettivo del parto pretermine costituiscono indicazioni all'esame del terzo trimestre.

Ogni tecnica invasiva è gravata da un rischio di perdite fetali che è correlato all'esperienza dell'operatore, alla tecnica utilizzata, all'entità del prelievo e all'indicazione, all'epoca gestazionale e all'età della donna.

È fondamentale che le coppie a rischio per malattie genetiche si sottopongano ad un accurato counseling che tratti correttamente i vari aspetti inerenti la procedura.

Deve essere fatta una completa valutazione del rapporto rischio materno/rischio legato all'esame. Il counseling deve essere sempre informativo e non direttivo, fornendo informazioni adeguate e obiettive al fine di favorire la scelta consapevole da parte della gestante. È opportuno inoltre che la coppia sottoscriva formalmente il consenso informato.

### **Aspetti tecnici della procedura**

Il prelievo di liquido amniotico viene effettuato per via transaddominale tramite l'inserimento di un ago in cavità amniotica.

Immediatamente prima dell'esecuzione della procedura deve essere eseguito sistematicamente un controllo ecografico per confermare la vitalità, valutare il numero e la posizione fetale, escludere una gravidanza multipla, rilevarne la biometria, confermare l'età gestazionale, infine valutare il volume del liquido amniotico e la localizzazione della placenta.

Con la tecnica guidata ecograficamente, l'utilizzo degli ultrasuoni era limitato a selezionare il sito dove inserire l'ago prima dell'esecuzione dell'amniocentesi; successivamente l'ago veniva inserito alla cieca in cavità amniotica. Con l'introduzione della tecnica monitorata ecograficamente, l'utilizzo continuo degli ultrasuoni durante la procedura, consente la visualizzazione costante del movimento dell'ago e del feto. Tale tecnica si associa alla riduzione della frequenza di sanguinamento e di mancata aspirazione di liquido amniotico (dry tap) nonché di inserzioni multiple dell'ago, in confronto alla tecnica ecoguidata. Inoltre consente all'operatore di ovviare ad eventuali difficoltà durante la procedura, legate al fenomeno del "membrane tenting" (separazione della membrana corioamniotica dalla parete anteriore dell'utero durante l'inserzione dell'ago) o a contratture uterine.

Dopo la valutazione ecografia si procede alla disinfezione della cute e all'allestimento del campo. L'inserimento dell'ago viene effettuato sotto visione ecografica e il sito viene selezionato cercando di evitare la placenta. È stato rilevato che l'attraversamento della placenta durante l'amniocentesi comportava un aumento del rischio di aborto. Nel corso di uno studio randomizzato, il prelievo transplacentare è risultato più frequente (31,2%) nei casi esitati in aborto rispetto a quelli con esito favorevole (14,9%;  $p < 0,05$ ).

Altri studi attestano che la via transplacentare non si associa ad un aumento dei rischi. La localizzazione anteriore della placenta non controindica la procedura, ma qualora si renda necessaria la puntura transplacentare per accedere ad un'idonea tasca di liquido amniotico, è importante tenersi lontano dall'inserzione del cordone ombelicale.

## Risveglio Ostetrico

Una volta prescelto il sito di inserzione, sotto visione ecografia diretta, un ago spinale di 22-gauge viene inserito a mano libera lungo il lato del trasduttore, e la punta dell'ago che appare come un eco brillante, viene monitorata costantemente durante l'intera durata della procedura.

Attraverso la connessione di una siringa all'ago, si procede all'aspirazione del fluido amniotico, provvedendo alla eliminazione iniziale di una piccola quantità di liquido (0,5 cc), allo scopo di ridurre la probabilità di contaminazione del fluido con cellule materne. Un metodo alternativo per eseguire la procedura sotto guida ecografia continua consiste nell'introdurre l'ago obliquamente a distanza dal trasduttore, consentendo la visualizzazione dell'ago per l'intera lunghezza.

L'amniocentesi eseguita prima della 15ª settimana di gravidanza, tra la 11ª e la 14ª settimana (amniocentesi precocissima) prevede la stessa tecnica di prelievo, ma la quantità di liquido amniotico che viene prelevata è generalmente di 1ml per settimana e cioè 11ml alla 11ª settimana, 12-13-14 ml, rispettivamente alla 12ª - 13ª - 14ª settimana.

Nella maggior parte dei casi si dovrebbe ottenere un quantità di liquido amniotico pari a 20 cc per assicurare al laboratorio un campione sufficiente ad ottenere l'esito della diagnosi prenatale. In occasione di richiesta di studi speciali, si raccomanda di concordare preventivamente con il laboratorio la quantità di liquido amniotico richiesta.

Dopo l'aspirazione del liquido amniotico e la rimozione dell'ago, si documenta ecograficamente l'attività cardiaca fetale al termine della procedura.

La scelta dell'epoca gestazionale di esecuzione del prelievo è scaturita dall'evidenza di un significativo aumento della probabilità di successo del prelievo ed una significativa riduzione dei rischi di perdita fetale per i prelievi effettuati a partire dalla 15ª settimana rispetto a quelli eseguiti in epoca più precoce. Uno studio collaborativo randomizzato canadese ha riportato una percentuale di perdita fetale per aborto spontaneo entro la 20ª settimana significativamente maggiore dopo i prelievi effettuati prima della 14ª settimana rispetto quelli eseguiti a partire dalla 15ª (2,8% contro 0,5%,  $p < 0,001$ ). La stessa significativa differenza è stata rilevata tra le amniocentesi eseguite in epoca compresa tra 14<sup>+0</sup> e 14<sup>+6</sup> settimane e quelle effettuate dopo tale epoca di gravidanza. Nel medesimo studio sono stati riportati maggiori difficoltà di prelievo nel gruppo delle amniocentesi precocissime rispetto al gruppo delle amniocentesi tradizionali, un aumento del rischio di fallimento del prelievo al primo tentativo, un aumento del numero di casi di inserzioni multiple dell'ago, un aumento del numero di casi con perdita di liquido amniotico dopo la procedura diagnostica ed entro la 22ª settimana, ed un aumento della frequenza dei casi di piede torto equinovaro. È stato riportato, infine, che le amniocentesi precocissime si asso-

ciano ad un maggior rischio di fallimento della coltura cellulare rispetto alle amniocentesi tradizionali.

### **Complicanze legate alla procedura**

Le complicanze conseguenti al prelievo possono manifestarsi immediatamente o nelle settimane successive.

Le complicanze immediate sono strettamente correlate alla tecnica di prelievo e si inquadrano nell'ambito del cosiddetto prelievo difficile, come la mancata aspirazione di liquido amniotico (dry tap), l'ostruzione da coagulo ematico (bloody-tap), l'aspirazione di liquido ematico e la ripetizione del prelievo.

Il cosiddetto "membrane tenting" o scollamento delle membrane si verifica quando si determina la separazione della membrana corioamniotica dalla parete anteriore dell'utero durante l'inserimento dell'ago. Questa evenienza è causa di ripetizione del prelievo. Tale problema si identifica quando si visualizza l'estremità dell'ago all'interno di una tasca ben definita di liquido senza che si ottenga fluido durante l'aspirazione; questa complicanza può essere superata ruotando o ridirezionando l'ago.

L'American Collaborative Study sull'amniocentesi del secondo trimestre ha riportato un incremento della frequenza di aborto spontaneo dopo inserzioni multiple. Il Canadian Trial ha riscontrato la medesima associazione tra ripetizione del prelievo (più di due) e perdite fetali. Altri studi che hanno preso in esame tale relazione, non hanno confermato questa evidenza. Tuttavia è consigliato di non eseguire più di due inserimenti di ago per volta, ripetendo l'eventuale terzo prelievo dopo una settimana.

L'insorgenza di contrazioni uterine dolorose dopo il prelievo rappresenta un'evenienza rara, tuttavia risolvibile con la somministrazione di antispastici e l'osservanza del riposo.

Piccole perdite vaginali di fluido amniotico postprocedurali possono manifestarsi transitoriamente nell'1-2% dei casi dei prelievi e vanno incontro a risoluzione spontanea, tuttavia sono riportati casi di persistente perdita di liquido amniotico con marcato oligoamnios.

Una considerazione a parte merita l'isoimmunizzazione materno-fetale nell'ambito del fattore Rh. Gli eritrociti fetali contengono l'antigene D sulla loro superficie e pertanto sono in grado di sensibilizzare madri Rh negative dopo trasfusione fetomaterna con sangue fetale Rh positivo. La profilassi degli eventi sensibilizzanti in gravidanza e prima del parto, come l'amniocentesi, si attua attraverso la somministrazione di 300 mg di IgG anti-D per via intramuscolare alle madri Rh negative, come raccomandato sia dall'WHO (World Health Organization) che dall'ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology).

### **Rischi materni e fetali**

I rischi materni sono dovuti principalmente a complicanze infettive, lesioni di organi interni, e shock settico. Le complicanze infettive si verificano a seguito di prelievo effettuato con procedura non osservante le norme di sterilità. La contaminazione della cavità amniotica può determinare una corioamniotite con conseguente perdita fetale e rischio di morbidità materna. Altre complicanze materne come le lesioni di organi interni o lo shock settico sono evenienze comunque rare.

Per quanto concerne i rischi fetali, questi possono essere diretti o indiretti come conseguenza della rimozione del liquido amniotico. Il loro riscontro è strettamente dipendente dalla correttezza di esecuzione della tecnica e dalla esperienza dell'operatore.

Un'ampia varietà di traumi fetali è stata attribuita all'amniocentesi soprattutto quando non veniva utilizzata la tecnica ecomonitorata, sebbene la reale incidenza sia sconosciuta. Lo spettro delle lesioni descritte comprende traumi oculari, persino cecità monolaterale, poroencefalia, danni intestinali, lesioni a carico degli arti e delle strutture tendinee.

L'amniocentesi è stata implicata nell'eziologia della sindrome da banda amniotica, tuttavia non sussiste opinione univoca sulla relazione causa-effetto tra questa sindrome e il prelievo di fluido amniotico.

Le lesioni cutanee minori rappresentano il danno più frequente. Sebbene sia difficile stabilire una correlazione diretta, sono la conseguenza di occasionali trafitture di parti fetali.

Per quanto riguarda le perdite fetali è importante tener conto delle perdite spontanee, la cui incidenza ha un peso rilevante nell'abortività spontanea e tende ad aumentare con l'avanzare dell'età materna per via dell'aumento dell'incidenza delle anomalie genetiche, mentre si ha una riduzione con l'avanzare dell'età gestazionale, in quanto numerose malattie genetiche esitano in aborti precoci.

Un importante studio prospettico del NICHD ha valutato questo parametro su una popolazione di 1040 amniocentesi versus 992 controlli di pari età, razza e stato socioeconomico. La frequenza della fetal loss rate globale (FLR) e degli aborti nel secondo trimestre era rispettivamente del 3.5% e 2.3% nel gruppo amniocentesi contro 3.2 e 2.1 nel gruppo di controllo.

Un altro studio del MRC Working Party ha rilevato anch'esso un eccesso di perdite correlate all'amniocentesi con un a FLR di 1-1.5%.

Attualmente si ritiene che lo studio di Anna Tabor del 1986, sia quello maggiormente valido ai fini del calcolo della FLR, in quanto è l'unico studio randomizzato eseguito su un'ampia popolazione di 4800 pazienti di giovane età e senza altri fattori di

rischio genetico. Questo studio ha rilevato che la FLR del gruppo di pazienti sottoposte ad amniocentesi era di 1,7% contro lo 0,7% della popolazione di controllo ( $p < 0.01$ ) stabilendo che il rischio di aborto legato all'amniocentesi è dell'1%.

### **Amniocentesi nelle gravidanze gemellari**

La diagnosi prenatale invasiva delle gravidanze multiple differisce dalla tecnica adottata nelle gravidanze singole e si contraddistingue per la maggiore complessità della procedura e per le problematiche di carattere etico e medico-legale poste da eventuali risultati discordanti. È importante valutare preliminarmente il numero dei feti e la loro disposizione topografica (o situazione) nella cavità uterina, la presenza di membrana amniotica e il tipo di placentazione, rilevare infine il sesso fetale ed effettuare la valutazione della biometria e dell'anatomia.

È fondamentale stabilire precocemente la corionicità di una gravidanza gemellare per l'importanza di tale dato non solo ai fini di un'eventuale diagnosi invasiva, ma anche in relazione agli esiti perinatali. La tecnica consiste nel prelievo separato di liquido da ciascun sacco amniotico, secondo la medesima procedura adottata per la gravidanza singola. Per facilitare l'identificazione di ciascun sacco amniotico, dopo il primo prelievo e prima della rimozione dell'ago, si inietta un colorante come l'indaco carminio o il rosso Congo nel primo sacco, e successivamente si procede all'esecuzione del secondo prelievo. Si sconsiglia l'utilizzo del blu di metilene, che era il colorante più usato nel passato, per il rischio di anemia emolitica fetale dovuta a metaemoglobinemia ed una possibile associazione con malformazioni intestinali.

Altra tecnica, ma meno utilizzata, consiste nell'introdurre un singolo ago prima in una sacca, aspirare il liquido e con lo stesso ago penetrare attraverso la membrana intramniotica nella seconda sacca.

Pochi sono i dati disponibili riguardanti il rischio di perdite fetali dopo amniocentesi in gravidanze gemellari bicoriali. Le piccole serie disponibili documentano perdite fetali del 3,55%, valore che non si discosta da quello relativo alle perdite fetali in gravidanze gemellari di pari età gestazionale non sottoposte ad amniocentesi.

### **Analisi**

L'analisi citogenetica convenzionale degli amniociti viene attuata mediante il prelievo di 15-20 ml di fluido amniotico, nel corso dell'amniocentesi tradizionale, seguito dall'allestimento delle colture fino all'analisi dei cromosomi in metafase. La parte corpuscolata del liquido amniotico contiene elementi cellulari di derivazione eterogenea e in particolare dalla desquamazione di epidermide, mucosa orale e del tubo digerente, mucosa dell'apparato respiratorio, epiteli delle vie genito-urinarie e mem-

## Risveglio Ostetrico

brana amniotica. Il tempo necessario per avere una risposta con la tecnica citogenetica classica è di circa 12-15 giorni.

In circa lo 0.5% dei casi può verificarsi il fallimento della coltura dovuto ad insufficiente o totale mancanza di cellule vitali nel campione prelevato o a contaminazione ematica recente o pregressa del liquido amniotico. In questi casi non si può ottenere un risultato diagnostico se non ripetendo il prelievo diagnostico.

La contaminazione con cellule materne non è così frequente come per la biopsia dei villi coriali e si verifica con una frequenza dello 0.34%, con una percentuale di errori diagnostici dello 0.11-0.22%. In presenza di mosaicismo cellulare (0.2-0.7% dei casi) può essere opportuno procedere ad un nuovo prelievo (sangue fetale) per il chiarimento diagnostico.

La diagnostica di anomalie cromosomiche e mutazioni geniche è fautrice di stress ed ansia per la gestante e per la famiglia in generale durante il periodo di attesa del risultato. Pertanto una risposta preliminare rapida che escluda le principali patologie, può contribuire a ridurre l'apprensione materna.

I recenti progressi delle tecniche molecolari come l'uso di sonde cromosomo-specifiche e l'ibridazione in situ hanno determinato un aumento della domanda di risultati rapidi, particolarmente per quanto riguarda l'applicazione delle metodiche rapide sulle cellule non coltivate.

A partire dal 1990 è stato proposto l'utilizzo della FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) su amniociti non coltivati, quale metodo aggiuntivo per una diagnosi rapida delle aneuploidie cromosomiche. Questa tecnica che richiede una piccola quantità di liquido amniotico, si avvale dell'impiego di sonde cromosom specifiche consentendo la diagnosi rapida delle aneuploidie a carico dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y.

In media i risultati si ottengono entro 48 ore dal prelievo. Sussiste tuttavia lo svantaggio che tale tecnica consente la diagnosi solo delle anomalie cromosomiche per la quale è stata predisposta ed è inoltre richiesta considerevole esperienza laboratoristica. La FISH, pertanto, rappresenta una valida alternativa al cariotipo classico ma costituisce un test rapido preliminare.

Un approccio alternativo per la diagnosi rapida del cariotipo fetale è rappresentato dalla PCR (polymerase chain reaction) quantitativa fluorescente che mediante la tecnica della reazione polimerasica a catena è in grado di amplificare specifiche regioni della molecola del DNA da amniociti non coltivati. L'esito diagnostico si ottiene entro 48 ore dalla procedura.

L'amnio-PCR, utilizzando una piccola quantità di liquido amniotico, consente la diagnosi delle maggiori cromosomopatie riguardanti i cromosomi 21, 18, 13 e le anomalie dei cromosomi sessuali.

La diagnosi di altre anomalie cromosomiche e dei mosaicismi richiede l'analisi citogenetica classica a completamento dell'amnio-PCR.

### **Conclusioni**

L'amniocentesi genetica è attualmente una procedura di applicazione routinaria, il cui impiego deve scaturire da un'attenta valutazione dei rischi e dei benefici di ciascuna paziente, tenendo conto che si accompagna comunque ad un rischio di perdite fetali di circa l'1%. È fondamentale inoltre conseguire un accurato training con la supervisione di un "senior tutor" con almeno 50-100 amniocentesi e il mantenimento di un continuo livello di operatività. I dati della letteratura indicano che circa 200 amniocentesi per anno sono sufficienti a garantire un soddisfacente livello di successo. È inoltre altrettanto importante, al fine di garantire la massima affidabilità e sicurezza, che a livello laboratoristico siano eseguiti un adeguato numero di esami secondo quanto riportato dalla Società Italiana di Genetica.

Sulla base delle attuali conoscenze è opportuno evitare l'amniocentesi precoce, optando per il prelievo dei villi coriali qualora sia richiesto un esame rapido e più precoce.

Il prelievo dei villi coriali è la tecnica di scelta per lo studio di malattie legate al DNA, poiché contengono una quantità di DNA superiore a quella ottenuta dagli amniociti, consentendo pertanto una maggiore affidabilità diagnostica.

Tuttavia l'amniocentesi può essere considerata una procedura semplice e abbastanza sicura ed efficace se effettuata da operatori esperti, affiancati da un laboratorio che garantisca la massima affidabilità diagnostica e in circostanze in cui i rischi di anomalie fetali giustifichino i rischi dovuti alla procedura.

### **Bibliografia**

1. American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention of RhD alloimmunization. ACOG Practica Bulletin, 4. Washington DC: ACOG; 1999.
2. Associazione Italiana di Citogenetica Medica (A.I.C.M.). Diagnostica Citogenetica Consensus 1995.
3. Benn PA, Hsu LYF: Maternal cell contamination of amniotic fluid cell coltures. Results of a Nationwide survey. Amer J Med Gen; 14: 3261-5, 1983.
4. Bombard AT, Powers JF, Carter S et al: Procedure-related fetal losses in transplacental versus nontransplacental genetic amniocentesis. Am J Obstet Gynecol; 172 (3): 868-72, 1995.
5. Broome DL, Wilson MG, Weiss B et al: Needle puncture of fetus: a complication of second-trimester amniocentesis. Br J Obstet gynecol; 82: 829, 1975.

## Risveglio Ostetrico

6. Bui TH, Lindson J: European collaborative study on prenatal diagnostic mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cell in amniotic fluid culture. *Prenat Diagn*; 4: 145-62, 1984.
7. Crane JP, Rholand BM: Clinical significance of persistent amniotic fluid leakage after genetic amniocentesis. *Prenat Diagn*; 6: 25, 1987.
8. D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D et al: Defining the role of fluorescence in situ hybridisation for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Obstet Gynecol*; 176: 769-776, 1997.
9. Decreto Ministeriale - Ministero della Sanità - 10 settembre 1998. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, 20 ottobre 1998, n. 245.
10. Espley SL, Hanson JW, Cruikshank DP: Fetal injury with mid-trimester diagnostic amniocentesis. *Obstet Gynecol*; 53: 77, 1979.
11. Evans MI. Teaching new procedures (Editorial): *Ultrasound Obstet Gynecol*; 19: 436-437, 2002.
12. Jeanty P, Shah D, Roussis P: Single-needle insertion in twin amniocentesis. *J Ultrasound Med*; 9: 511, 1990.
13. Johanson JM, Wilson RD, Singer J et al: Technical factors in early amniocentesis predict adverse outcome. Results of the Canadian early (EA) versus mid-trimester (MA) amniocentesis trial. *Prenat Diagn*; 19: 732-38, 1999.
14. Leschot NJ, Verjaal M, Treffers PE: Risks of midtrimester amniocentesis: assessment of 3000 pregnancies. *Brit J Obstet Gynaec*; 92: 804-7, 1985.
15. Levett LJ, Liddle S, Meredith R: A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of the fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* ; 17: 115-118, 2001.
16. Liley AW: Liquor amnii analysis in management of pregnancy complicated by rhesus isoimmunization. *AJOG*; 82: 1359-70, 1961.
17. Linee Guida SIEOG 2002, Editeam, pg 45-65.
18. Marthin T, Liedgren S and Hammar M: Transplacental needle passage and other risk-factor associated with second-trimester amniocentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 76 (8): 728-32, 1997.
19. Mahet JE, Kleinman GE, Lile W et al: The construction and utility of an amniocentesis trainer. *Am J Obstet Gynecol*; 179 (5): 1225-7, 1998.
20. Monni G, Ibba R.M. (1998): Invasive procedures in multiple pregnancies. Kurjak A. and Weiner S. (Eds). *Interventional ultrasound*, 10: 105-115.
21. NICHD national Registry for Amniocentesis Study Group. Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis, safety and accuracy. *JAMA*; 236: 1471, 1976.
22. NICHD Amniocentesis Registry: The safety and accuracy of Mid-trimester am-

- niocentesis DHEW Publication no (NIH) 78-190. Washington, DC: Dep of Health, Education and Welfare, 1978.
23. Nicolini U and Monni G: Intestinal obstruction in babies exposed in utero to methylene blue. *Lancet*; 336: 1258-1259, 1990.
  24. Nizard J, Duyme M, Ville Y: Teaching ultrasound-guided invasive procedures in fetal medicine: learning curves with and without an electronic guidance system. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 19: 274-277, 2002.
  25. Rehder H: Fetal limb deformities due to amniotic constriction (a possible consequence of preceding amniocentesis). *Pathol Res Pract*; 162: 316, 1978.
  26. Romero R, Jeanty P, Reece EA et al: Sonographically monitored amniocentesis to decrease intraoperative complications. *Obstet Gynecol* 65: 426, 1985.
  27. Tabor A, Philip J, Madsen M, et al: Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*, I: 1287-9, 1986.
  28. The Canadian Early and Midtrimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. Randomized trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet*; 351 (9098): 242-7, 1998.
  29. Valenti C, Schutta EJ, Kehaty T: Prenatal Diagnosis of Down's Syndrome. *Lancet*; 2 (7561): 220, 1968.
  30. Williamson RA, Varner MW, Grant SS. Reduction in amniocentesis risks using a real-time needle guide procedure. *Obstet Gynecol*; 65: 751, 1985.
  31. Working Party on Amniocentesis: An assessment of hazards of amniocentesis. *Br J Obstet Gynecol*; 85: 1, 1978.