
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea neinvazivă post mortem a feților cu diagnostic prenatal malformativ

Doctorand **Adelina Staicu**

Conducător de doctorat Acad. Prof.dr. **Florin Stamatian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Principalele avantaje ale autopsiei convenționale	17
1.1. Principalele dezavantaje ale autopsiei convenționale	17
2. Abordarea non-invazivă a examinării post-mortem a patologiei fetale și perinatale–tehnici	18
2.1. Radiografia convențională post-mortem	19
2.2. Ecografia de părți moi post mortem	19
2.3. Computer tomografia post-mortem	20
2.4. Autopsia minim invazivă	22
3. Dezvoltarea și evoluția imagisticii post mortem prin rezonanță magnetică	23
4. Principalele avantaje ale metodei imagistice pm-IRM	26
4.1. Evaluarea sistemului nervos central fetal prin pm-IRM	27
4.2. Evaluarea sistemului cardio-vascular prin pm-IRM	28
4.3. Pm-IRM - tehnică adjuvantă importantă a autopsiei convenționale	28
4.4. Importanța pm-IRM în studiul embriologiei umane	29
5. Principalele dezavantaje ale pm-IRM comparative cu autopsia	30
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	35
2. Metodologie generală	36
2.1. Protocolul de scanare post-mortem IRM și descrierea aparatului	38
2.2. Examenul fetopatologic	39
2.3. Analiza imaginilor	40
2.4. Analiza statistică	40

3. Studiu 1. Beneficii clinice și limitări ale autopsiei virtuale utilizând IRM cu câmp magnetic înalt de 7 tesla pentru evaluarea feților de prim trimestru comparativ cu autopsia stereomicroscopică și evaluarea microscopică	41
3.1. Introducere	41
3.2. Ipoteza de lucru	42
3.3. Material și metodă	42
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	59
4. Studiu 2. Fiabilitatea diagnostică a post mortem-IRM cu câmp magnetic înalt de 7T pentru analizarea feților de trimestrul al II-lea versus autopsia clasică: studiu de validare	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru	62
4.3. Metoda	62
4.4. Rezultate	64
4.5. Discuții	77
4.6. Concluzii	81
5. Studiu 3. Evaluarea multidisciplinară a feților de trimestrul al II-lea cu sindrom malformativ depistat prin ecografia prenatală folosind post mortem IRM 3T și autopsia convențională	83
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru	84
5.3. Metodologie	85
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	91
5.5.1. Evaluarea fiabilității diagnostice a pm-IRM 3T raportată la anomaliile fetale depistate ecografic	91
5.5.2. Evaluarea aportului pm-IRM pentru optimizarea investigării feților diagnosticați prenatal cu sindroame plurimaformative redat prin descrierea unor cazuri analizate	94
5.5.3. Considerații privind posibilitatea implementării pm-IRM 3T în practica clinică curentă derivate din studiu	99
5.6. Concluzii	101
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

Cuvinte cheie

Post mortem IRM, autopsie fetală, malformații fetale, embrion, autopsie virtuală, câmp magnetic 7Tesla, câmp magnetic 3Tesla, prenatal, ecografie, acuratețe diagnostică

Introducere

În prezent, singurul standard acceptat pentru confirmarea patologiei malformative fetale depistate prin investigații imagistice prenatale este autopsia clasică. Autopsia fetală aduce informații utile ce pot fi folosite pentru ghidarea investigațiilor genetice necesare unei consilieri adecvate, privind riscul de recurență al diferitelor sindroame malformative, dar și pentru gestionarea altor cazuri cu patologii asemănătoare. Cu toate că valoarea examenului necropsic fetal nu poate fi contestată din punct de vedere medical, în ultimele decenii s-a înregistrat un declin major al acceptabilității autopsiei fetale și pediatrice, explicat în parte printr-o popularitate mass-media negativă, credințele culturale și religioase ale cuplului parental.

Astfel, a luat naștere radiologia post mortem ce oferă o alternativă neinvazivă, rapidă, ușor de acceptat de către cuplul parental pentru examinarea post mortem a feților rezultați din pierderi spontane sau întreruperi terapeutice de sarcina (ITS). Din spectrul larg de tehnici pe care le folosește radiologia post mortem (radiografia, ecografia, computer tomografia, rezonanța magnetică sau autopsia minim invazivă), imagistica prin rezonanță magnetică post mortem (pm-IRM) s-a detașat printr-un contrast tisular foarte bun și o rezoluție înaltă, a reușit să depășească anumite limitări ale metodei clasice de evaluarea fetală post mortem și să obțină cele mai bune rezultate comparativ cu gold standardul. În acest context actual, cercetarea de față este de actualitate în concordanță cu preocupările actuale din domeniu.

Scopul cercetării a fost realizarea unei analize comparative complexe între metodele neinvazive și metodele invazive de evaluare post mortem fetală pe care le are la dispoziție Obstetrica modernă în România. Obiectivele au urmărit pe de o parte propunerea de metode de evaluare fiabile a feților de prim și secund trimestru cu anomalii structurale sau rezultați din avorturi spontane, folosind aparate de rezonanță magnetică de 7Tesla (T) pentru studii ex vivo sau aparate de rezonanță magnetică de 3T pentru studii clinice, ce pot fi oferite ca metode alternative sau complementare a metodei clasice, în vederea optimizării evaluării post mortem a cazurilor dificile de feți plurimalformați.

Metodologie generală

Au fost incluse 62 de paciente internate Clinica Obstetrică-Ginecologie 1, centru de referință terțiar, al Spitalului Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca Romania cu diagnosticul de sarcină cu anomalie cromozomială confirmată prin cariotip fetal, sindrom malformativ fetal grav incompatibil cu viața extrauterină descoperit în cadrul urmăririi ecografice prenatale și paciente ce au suferit avorturi spontane în trimestrul I și II. Feții rezultați între 9-23 săptămâni de gestație (SG) au fost analizați comparativ prin imagistică post mortem utilizând rezonanța magnetică și autopsia clasică.

Protocolul de cercetare a fost aprobat de comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" și toate pacientele au semnat consimțământul informat înainte de începerea procedurilor (124/6.03.2015).

La internare, toate pacientele au fost evaluate ecografic 3D și 4D. După informarea, consilierea și obținerea acordului scris al pacientei, întreruperile terapeutice de sarcină au fost realizate folosind prostaglandine administrate local și per os și perfuzii ocitocice conform protocolul intern al departamentului. Ulterior, feții rezultați au fost fixați la temperatura camerei, în formaldehidă 10% conform cerințelor Departamentului de Anatomie Patologică a Centrului Imogen, după recoltarea materialului genetic corespunzător. Perioada de fixare în soluție de formaldehidă a fost de 48 h până la o săptămână pentru feții cu vârste gestaționale între 12-23 săptămâni și de 6 săptămâni pentru cazurile cu vârste gestaționale între 9-11 săptămâni.

Feții cu o circumferință craniană și abdominală sub 7 cm, și vârste gestaționale între 9-19 SG au fost direcționați către Centrul Național de Rezonanță Magnetică din cadrul Universității "Babeș Bolyai", unde s-a realizat o examinare morfologică IRM a întregului corp folosind un aparat Bruker BioSpec cu un câmp magnetic înalt de 7 Tesla (BGA 9 S HP). Feții cu o greutate medie 450 g și vârstă gestațională cuprinsă între 19 săptămâni și 23 SG au fost direcționați către Centrul de Cercetare IMOGEN din cadrul SCJU Cluj Napoca unde s-a realizat investigația morfologică imagistică cu un aparat GE Healthcare (Discovery™ MR750w GEM) cu câmp magnetic de 3 Tesla.

Autopsia a fost efectuată în Compartimentului de Anatomie Patologică al Centrului de Cercetare IMOGEN. Pentru a nu influența diagnosticul final, rezultatele imagisticii post mortem nu au fost puse la dispoziția medicilor patologi. Interpretarea imaginilor a fost realizată de către un radiolog cu expertiză în radiologia pediatrică și de către doctorand. Pentru fiecare caz inclus s-a redactat un rezultat detaliat cu descrierea segmentului anatomic cerebral, respirator, cardiac, vascular, renal, digestiv, masivului facial și a scheletului. Imaginile relevante pentru diagnostic au fost atașate fișelor individuale. Pentru fiecare segment anatomic s-a notat absența/numărul total de malformații structurale decelate pe segment analizat și s-au specificat anomaliile diagnosticate. Pentru enunțarea unui diagnostic de anomalie au fost urmărite și descrise 32 de structuri anatomice.

Studiul I. Beneficii clinice și limitări ale autopsiei virtuale utilizând IRM cu câmp magnetic înalt de 7 Tesla pentru evaluarea feților de prim trimestru comparativ cu autopsia stereomicroscopică și evaluarea microscopică

Scopul acestui studiu a fost de a stabili acuratețea diagnostică a autopsiei virtuale realizată cu un câmp magnetic înalt de 7T comparativ cu autopsia stereomicroscopică și examinarea microscopică pentru evaluarea feților de prim trimestru. Un obiectiv a fost testarea unui protocol de scanare folosind un câmp magnetic de 7T pentru examinarea acestor cazuri ce pot prezenta autoliză moderată. De asemenea, au fost subliniate beneficiile pe care le poate aduce o autopsia virtuală

fetală cu câmp magnetic înalt dar și limitările unei examinări exclusiv imagistice a acestor cazuri.

Metodă. Au fost luate în considerare nouă cazuri consecutive de feți de prim trimestru, rezultați din ITS sau întreruperi spontane. În funcție de vârsta gestațională și lungimea cranio-caudală, cazurile au fost împărțite în două grupuri: grupul Embrionar a inclus cazuri de nouă până la 10 SG și grupul Fetal ce a inclus cazuri de 13 SG. Primul grup a fost scanat utilizând un protocol tridimensional Fast Imaging With Steady State Precession (3D FISP), iar al doilea grup a fost scanat utilizând un protocol de scanare bidimensional TurboRare-High Resolution ponderat T2. Imaginile au fost interpretate de către un radiolog și doi embriologi. Toate cazurile au fost evaluate prin autopsie invazivă, iar patologicul nu a cunoscut rezultatele imagistice. În total, baza de date a inclus 270 de indici de comparație (9 cazuri \times 30 structuri/caz).

Rezultate. Concordanța globală între virtopsia fetală realizată cu câmp magnetic înalt și autopsia stereomicroscopică sau examinarea microscopică a fost evaluată prin 225 de indici de comparație vizibili prin ambele metode. În ansamblu, utilizând examenul microscopic și autopsia stereomicroscopică ca standard de aur, autopsia virtuală cu câmp magnetic înalt a prezentat o sensibilitate (SE) de 94,6% [CI 95% 87,2-98,3] și o specificitate (SP) de 97,6% [CI 95%, 95-98,8]. Valoarea predictivă pozitivă (PPV) a fost de 93% [CI 95%, 85,7-96,6], iar valoarea predictivă negativă (NPV) a fost de 98,2% [CI 95%, 95,7-99,4]. Cohen kappa coeficientul de concordanță a fost $k = 0,92$ [CI 95%, 0,82-0,97], iar testul McNemar a arătat $p = 1,00$.

Concluzii: Autopsia virtuală folosind un câmp magnetic la 7 T poate fi considerată o abordare alternativă sigură a autopsiei stereomicroscopice pentru evaluarea anomaliilor structurale la sfârșitul primului trimestru de sarcină. Pm-IRM la 7T poate evalua cu ușurință, în primul trimestru, caracteristicile emisferelor cerebrale, cerebelului, ventriculului cerebral, urechii interne, glandei pituitare, nervii optici și talamusului, coloanei vertebrale, detaliile feței, structurile cardiace, respiratorii și renale.

Studiu 2. Fiabilitatea diagnostică a post mortem-IRM cu câmp magnetic înalt de 7T pentru analizarea feților de trimestrul al II-lea versus autopsia clasică: studiu de validare

Scopul celui de-al doilea studiu a fost de a valida metodele neinvazive cu câmp magnetic înalt de 7T pentru examinarea post mortem a feților de trimestrul al doilea cu vârste gestaționale cuprinse între 12-19 SG comparativ cu autopsia clasică.

Metoda. Au fost incluse prospectiv 30 de paciente internate cu diagnosticul de anomalie cromozomială, sindrom malformativ fetal incompatibil cu viața extrauterină descoperit în cadrul urmăririi ecografice prenatale sau paciente ce au suferit avorturi spontane în trimestrul II.

Toți feții au fost investigați morfologic prin rezonanță magnetică folosind un aparat Bruker BioSpec cu un câmp magnetic înalt de 7 Tesla cu un protocol TurboRare-

High Resolution ponderat T2. Timpul de scanare mediu/caz a fost de 61.89 min. Imaginile au fost interpretate de către un radiolog cu experiență în radiologia pediatrică și doctorand cu experiență în anatomia fetală normală și Medicină Materno-Fetală. Ulterior toate cazurile au fost supuse autopsiei stereomicroscopice sau clasice conform normelor Societății Franceze de Fetopatologie, efectuată de un medic specialist Fetopatolog. Pentru fiecare caz a fost redactat un rezultat detaliat privind aspectul normal sau malformat a 32 de structuri anatomice fetale evaluate, în total baza de date a cuprins 960 de indici de comparație (30 de cazuri x 32 structuri anatomice). Rezultatele imagistice nu au fost disponibile patologului. Pentru a evalua acuratețea diagnostică totală a autopsiei virtuale a feților comparativ cu autopsia fetală, au fost calculate (SE), (SP), VPP, VPN, acuratețea diagnostică și intervalele lor de încredere de 95% folosind Dag_stat extensie a Microsoft Excel și Interactive statistic page atât global cât și pe șapte segmente anatomice: cerebral, cardiac, vascular, pulmonar, uro-genital, scheletic, masiv facial, dar și pe subgrupuri de vârstă gestațională: 12-14 SG, 15-16 SG, 17-19 SG.

Rezultate. Global post mortem IRM a demonstrat o SE de 92.04% [CI 95% 85.42- 96.29] și o SP de 97.87% [CI 95% 94.64- 99.42], cu o VPP de 96.30 % [CI 95% 90.78-98.56] și o VPN de 95.34% [CI 95% 91.61-97.45], determinând o acuratețe diagnostică de 95.68% [CI 95% 92.73-97.68]. De asemenea indicele Cohen's kappa a fost 0.907 subliniind o concordanța aproape perfectă între cele două metode, lucru susținut și de testul McNemars ($p=0.212$) care nu a arătat diferențe semnificative statistic între cele două metode. Aceste rezultate au fost confirmate atât în analiza pe cele șapte segmente anatomice, dar și pe subgrupuri de vârstă, sensibilitatea pm-IRM 7T crescând o dată cu vârsta gestațională.

Concluzii. Pm-IRM cu câmp magnetic înalt de 7T este o opțiune eficientă ce poate fi realizată în timpi de scanare acceptabili clinic, și se conturează ca o metodă adjuvantă fiabilă sau metodă alternativă a autopsiei clasice pentru evaluarea feților plurimalformați de trimestrul al II-lea.

Studiu 3. Evaluarea multidisciplinară a feților de trimestrul al II-lea cu sindrom malformativ depistat prin ecografia prenatală folosind post mortem IRM 3T și autopsia convențională

Scopul principal al studiului a fost de a analiza valoarea diagnostică a pm-IRM de 3T, de a identifica anomaliile structurale la feții rezultați din avorturi terapeutice de trimestrul al II-lea comparativ cu autopsia clasică atât global cât și pe segmente anatomice. Un obiectiv secundar a fost raportarea fiabilității diagnostice a pm-IRM 3T față de autopsie în funcție de sindromul malformativ congenital ce a determinat indicația de ITS, decelat prin examen ecografic prenatal, pentru a sublinia situațiile clinice ce ar putea să beneficieze cel mai mult din pm-IRM.

Metoda. Au fost incluse prospectiv 32 de paciente cu vârstă gestațională cuprinsă între 18-23 SG internate în vederea ITS pentru anomalii cromozomiale sau

anomalii fetale decelate ecografic. Investigațiile morfologice au fost realizate, folosind un aparat GE Healthcare (Discovery™ MR750w GEM) cu câmp magnetic de 3T, folosind un protocol T2,T1 CUBE tridimensional. Ulterior, toți feții au fost examinați conform protocolului de autopsie a Societății Franceze de Fetopatologie.

Cazurile au fost împărțite în 4 grupuri conform sindroamelor malformative decelate prin ecografie prenatală pentru care s-a decis ITS: Grup Cerebral, Grup Cardiac, Grup Renal, Grup Sindroame Rare. Pentru fiecare grup s-a calculat SE, SP, VPP, VPN, acuratețea cu intervalele de confidență de 95%, și coeficientul de concordanță dintre investigarea imagistică și clasică a segmentului anatomic corespunzător

Rezultate. Per total, pm-IRM 3T a demonstrat o sensibilitate diagnostică față de gold standard de 67.33% [CI 95% 57.28-76.33], cu o specificitate de 98.37% [CI 95% 97.33-99.09], o VPP de 81.93% [CI 95% 71.95-89.52], o VPN de 96.49% [CI 95% 95.11-97.57] realizând o acuratețe diagnostică de 95.31% [95% 93.83-96.52], într-o cohortă în care a fost înregistrată o frecvență a malformațiilor de 9.86%. Coeficientul de concordanță Cohen's k a fost de 0.71, relevând o concordanță substanțială între cele două metode, confirmată și prin testul McNemar= 6.75 (p-0.0094).

Cea mai bună concordanță diagnostică dintre pm-IRM și autopsie s-a înregistrat la analiza segmentului cerebral, iar cea mai mică concordanță s-a înregistrat la examinarea segmentului cardiac.

Luând în considerare cele patru grupuri de indicații de ITS, concordanța cea mai bună între cele două metode de evaluare fetală post mortem s-a găsit în Grupul Cerebral, unde indicele de concordanță diagnostică Cohen a fost de 0.76, cu o SE 80% și o SP de 96.30 % și în Grupul Renal unde concordanța a fost de 100%.

Concluzii. Pm-IRM de 3T este o metodă adjuvantă valoroasă a autopsiei feților cu diagnostic prenatal malformativ. Pentru sarcinile cu recomandare de ITS pentru anomalii cerebrale sau renale, poate fi recomandată ca investigație de primă intenție pentru confirmarea diagnosticului prenatal.

Concluzii generale

Principalele situații care ar beneficia dintr-o autopsie virtuală realizată prin pm-IRM așa cum rezultă în urma acestei cercetări doctorale sunt:

1. Analizarea embrionilor rezultați din avorturi spontane prin pm-IRM cu câmp magnetic înalt deoarece principala cauză ce determină avorturi spontane în primul trimestru sunt anomaliile genetice.
2. Examinarea feților de trimestru I rezultați în urma întreruperilor spontane, deoarece, o analiza imagistică ce descrie o anatomie normală a feților de prim trimestru realizată cu câmp magnetic înalt poate să orienteze către o cauză placentară sau sistemică a avortului spontan.
3. Descrierea anomaliilor structurale a feților de trimestrul I și II rezultați din ITS pentru anomalii de cariotip confirmate prin amniocenteză sau biopsie

de vilozități, deoarece cele mai probabile anomalii descrise de autopsia clasică sunt cele structurale.

4. Metodă de primă intenție pentru confirmarea patologiei cerebrale grave decelate prin ecografie prenatală la feții de trimestrul al II-lea, deoarece confirmarea anomaliilor cerebrale prin disecție clasică este deseori îngreunată prin tipul de patologie prezentă sau gradul de macerare avansat.
5. Metodă de primă intenție pentru confirmarea patologiei renale grave confirmate prin ecografie prenatală la feții de trimestrul al II-lea.
6. Descrierea patologiei cardiace la feții de trimestrul I și II folosind câmpuri magnetice înalte.
7. Descrierea unor anomalii metabolice tip hemocromatoză.
8. Ghid pentru disecțiile dificile necesare investigării corespunzătoare a feților mici cu sindroame plurimalformative, deoarece disecția feților mici este un proces laborios a căror rezultate sunt direct proporționale cu experiența primului examinator.
9. Oferă un suport de date cu caracter permanent, imaginile obținute putând fi interpretate de mai mulți examinatori în același moment.
10. Metodă alternativă de investigație post mortem pentru părinții care refuză autopsia convențională.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cele trei studii introduc pentru prima dată în România noțiunea de autopsie virtuală prin IRM ca metodă alternativă a autopsiei fetale.

Este propusă evaluarea feților malformați de prim trimestru folosind un câmp magnetic de 7T și un protocol de scanare oferind astfel, o metodă nouă de evaluare a acestor cazuri dificile ce poate depăși anumite limitări ale metodei clasice.

Rezultatele obținute demonstrează că folosirea câmpului magnetic de 7T este o opțiune fiabilă pentru evaluarea corespunzătoare a feților mici, plurimalformați de trimestrul al doilea, fiind propusă atât o nouă direcție de cercetare și aplicație practică a câmpului magnetic înalt, dar și o soluție alternativă, rapidă cu acurațe diagnostică înaltă ce poate fi oferită părinților ce refuză autopsia fetală.

Totodată au fost detaliate pe lângă avantajele și limitările acestei metode, atât logistice, de personal, de disponibilitate cât și de performanță în vederea soluționării unui protocol de implementare în practica clinică din România.

SUMMARY OF THE PHD THESIS

Non-invasive Post Mortem Evaluation of Foetuses with Prenatal Malformation Diagnosis

PhD candidate **Adelina Staicu**

PhD supervisor **Prof. Florin Stamatian** PhD



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENT

Introduction	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Main Advantages of Conventional Autopsy	17
1.1. Main Disadvantages of Conventional Autopsy	17
2. Non-invasive Approach of Post Mortem Examination of Foetal and Perineal Pathology – Procedures	18
2.1. Conventional Post Mortem Ultrasound	19
2.2. Post Mortem Ultrasound of Soft Tissue	20
2.3. Post Mortem Computer Tomography	21
2.4. Minimal Invasive Autopsy	23
3. Development and Evolution of Post Mortem Imaging through Magnetic Resonance	24
4. Main Advantages of the pm-MRI Imaging Method	27
4.1. Evaluation of the Foetal Central Nervous System through pm-MRI	28
4.2. Evaluation of the Cardio-vascular System through pm-MRI	29
4.3. Pm-MRI – Important Adjuvant Procedure for the Conventional Autopsy	29
4.4. Significance of pm-MRI for the Study of Human Embriology	31
5. Main Disadvantages of pm-MRI in comparison to Autopsy	32
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work Hypothesis/Objectives	37
2. General Method	39
2.1. Post-mortem MRI Scanning Protocol and Description of the Device	40
2.2. Foeto-pathologic Examination	41
2.3. Image Analysis	42
2.4. Statistic Analysis	43
3. Case study 1. Clinical Benefits and Limitations of Virtual Autopsy using MRI with a 7 Tesla Magnetic Field for the Evaluation of First Trimester Foetuses as compared to Stereomicroscopic Autopsy and microscopic Evaluation	45
3.1. Introduction	45
3.2. Work Hypothesis	46
3.3. Material and Method	46
3.4. Results	50

3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	64
4. Case Study 2. Diagnostic Fiability of Post Mortem MRI with 7 Tesla Magnetic Field for the Analysis of Second Trimester Foetuses versus Classical Autopsy: Validation Study	65
4.1. Introduction	65
4.2. Work Hypothesis	66
4.3. Method	67
4.4. Results	68
4.5. Discussions	83
4.6. Conclusions	87
5. Case Study 3. Multidisciplinary Evaluation of Second Trimester Foetuses with Malformation Syndrome Detected through Prenatal Ultrasound using 3T Post Mortem MRI and Conventional Autopsy	88
5.1. Introduction	88
5.2. Work Hypothesis	89
5.3. Methodology	90
5.4. Results	92
5.5. Discussions	98
5.5.1. Evaluation of the Diagnostic Fiability of 3T pm-MRI with regard to Foetal Anomalies Detected through Ultrasound	98
5.5.2. Evaluation of the Contribution of pm-MRI for the Optimization of the Investigation of Foetuses Diagnosed with Multiple Malformation Syndrome reported through the Description of Analysed Cases	100
5.5.3. Considerations on the Possibility to Implement 3T pm-MRI in Current Clinical Practice Derived from the Study	106
5.6. Conclusions	109
6. General Conclusions	110
7. Originality and Innovative Contributions of the PhD Thesis	113
References	115

Keywords

Post mortem MRI, foetal autopsy, foetal malformations, embryo, virtual autopsy, 7Tesla magnetic field, 3Tesla magnetic field, prenatal, ultrasound, diagnostic accuracy

Introduction

Currently the only accepted standard for confirming foetal malformation detected through prenatal imagistic investigations is the classical autopsy. Foetal autopsy reveals useful information, which can be used for guiding genetic investigations necessary for an appropriate counseling with respect to the recurrency risk of different malformation syndroms, but also for managing other cases with similar pathologies. Although the value of necroscopic investigations cannot be contested from the medical point of view, in the last decades acceptability of foetal and pediatric autopsy underwent a major decline, which can partly be explained by negative mass-media popularity and cultural and religious creeds of the parental couple. Thus, post mortem radiology appeared offering a non invasive, rapid alternative, easy to be accepted by the parental couple for the post mortem investigation of fetuses resulted from spontaneous abortion or therapeutic terminations of pregnancy (TTP). From the vast spectrum of techniques post mortem radiology uses (radiography, ultrasound, CT, MRI or minimal invasive autopsy), post mortem magnetic resonance imaging (pm-MRI) emerged due to very good tissue contrast and high resolution, managing to surpass certain limitations of the classical post mortem foetal evaluation and obtain the best results as compared to the gold standard. Given the current context, this research represents a topical issue in accordance with the current pursuits in the field.

The aim of the research was to achieve a complex comparative analysis between non invasive methods and invasive methods of post mortem foetal evaluation, which are available for modern obstetrics in Romania. The objectives aimed at suggesting fiable evaluation methods for fetuses of the first and second trimester with structural anomalies or resulting from spontaneous abortions, using 7Tesla (T) magnetic resonance equipment for in vivo studies or 3T magnetic resonance equipment for clinical trials, which can be used as alternative methods or complementary methods to the classical one in order to optimize the post mortem evaluation of difficult cases of fetuses with multiple malformations.

General Method

62 patients admitted to the Clinic for Obstetrics and Gynecology, tertiary reference center of the Regional Emergency Clinic, Cluj-Napoca, Romania with diagnosis of pregnancy with chromosomal anomaly confirmed through foetal karyotype, severe foetal malformation syndrome incompatible with extrauterine life revealed within the prenatal ultrasound monitoring process were included in the study, as well as patients who suffered spontaneous abortions during trimesters I and II. Fetuses resulted ranging between 9-23 weeks of gestation (WG), were analyzed comparatively through post mortem imaging using magnetic resonance and through classical autopsy.

The research protocol was approved by the ethics committee of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy and all patients signed an informed consent before the beginning of the procedures (124/6.03.2015).

Upon admission, the patients were evaluated using 3D and 4D ultrasound. After having been informed, advised and after having obtained the written consent of the patient, the therapeutic terminations of pregnancy were conducted using locally administered prostaglandins and per os, as well as oxytocine perfusions according to the internal protocol of the department. Subsequently, the foetuses resulted were fixed in 10% formaldehyde solution according to the requirements of the Department of Pathological Anatomy of the Imogen Centre, after having harvested the appropriate genetic material. The period of fixation in formaldehyde solution was of 48 h up to one week for foetuses with gestational age between 12-23 WG and 6 WG for cases with gestational ages between 9-11 WG.

Foetuses with head and abdomen circumference under 7 cm, and gestational ages between 9-19 WG were directed to the National Center for Magnetic Resonance within the "Babeş Bolyai" University, where a morphologic MRI examination of the entire body using a Bruker BioSpec device with a 7 Tesla (BGA 9 S HP) magnetic field was carried out. Foetuses with a mean weight of 450 g and gestational age between 19 and 23 WG were directed to the IMOGEN Research Center within the SCJU Cluj Napoca where the imagining morphologic examination was conducted using a GE Healthcare (Discovery™ MR750w GEM) device with a magnetic field of 3 Tesla.

The autopsy was carried out at the Department for Pathologic Anatomy within the IMOGEN Research Center. In order not to influence the final diagnosis, the results of the post mortem images were not made available to the pathologists. The interpretation of the images was performed by a radiologist with expertise in the field of pediatric radiology and by the PhD candidate. A detailed result was drafted for every enclosed case containing the description of the cerebral, respiratory, cardiac, vascular, digestive, facial and skeletal anatomic segment. Relevant images for the diagnosis were attached to the individual files. For every anatomic segment the absence/total number of structural malformations detected in the analyzed segment was recorded and the diagnosed anomalies were indicated. 32 anatomic structures were monitored and described for stating an anomaly diagnosis.

Study Case I. Clinical Benefits and Limitations of Virtual Autopsy Using MRI with 7 Tesla Magnetic Field for the Evaluation of First Trimester Foetuses as compared to the Stereomicroscopic Autopsy and Microscopic Evaluation

The aim of this study was to establish the diagnostic accuracy of virtual autopsy carried out with a 7T magnetic field as compared to stereomicroscopic autopsy and microscopic examination for the evaluation of first trimester foetuses. One of the objectives was to test a scanning protocol using a 7T magnetic field for the examination of these cases which can present moderate autolysis. Additionally, benefits brought about

by a virtual foetal autopsy with high magnetic field, but also the limitations of an examination based exclusively on imaging of these cases were emphasized.

Method: There were taken into consideration nine consecutive cases of first trimester fetuses, resulted from therapeutic pregnancy termination or spontaneous abortion. The cases were divided into two groups according to gestation age and craniocaudal length: the Embryo Group included cases from 9 to 10 gestation weeks and the Foetal Group cases of 13 gestation weeks. The first group was scanned using a tridimensional Fast Imaging with Steady State Precession (3D FISP) protocol, while the second group was scanned using a bidimensional TurboRare-High Resolution weighted T2 protocol. The images were interpreted by a radiologist and two embryologists. All cases were evaluated through invasive autopsy, while the pathologist did not know the imaging results. The data base included a total of 270 comparison indices (9 cases × 30 structures/case).

Results: The global concordance between foetal virtopsy carried out with high magnetic field and stereomicroscopic autopsy or microscopic examination was evaluated through 225 comparison indices visible through both methods. Using the microscopic exam and the stereomicroscopic autopsy as gold standard, the virtual autopsy with high magnetic field presented an overall sensibility (SE) of 94.6% [CI 95% 87.2-98.3] and a specificity (SP) of 97.6% [CI 95%, 95-98.8]. The positive predictive value (PPV) was of 93% [CI 95%, 85.7-96.6], while the negative predictive value (NPV) was of 98.2% [CI 95%, 95.7-99.4]. The Cohen Kappa concordance coefficient was of $k = 0.92$ [CI 95%, 0.82-0.97], while the McNemar test showed $p = 1.00$.

Conclusions: The virtual autopsy using a 7T magnetic field can be considered a secure alternative approach to stereomicroscopic autopsy for the evaluation of structural anomalies at the end of the first pregnancy trimester. Pm-MRI at 7T can easily evaluate the characteristics of cerebral hemispheres, of the cerebellum, of the cerebral ventricles, of the internal ear, of the pituitary gland, of the optic nerve and the renal characteristics in the first trimester.

Study Case 2. Diagnostic Fiability of Post Mortem MRI with 7 Tesla Magnetic Field for the Analysis of Second Trimester Foetuses versus Classical Autopsy: Validation Study

The aim of the second study was to validate the non invasive methods with 7T magnetic field for the post mortem examination of second trimester fetuses with gestation ages between 12 and 19 weeks as compared to the classical autopsy.

Method: Prospectively 30 patients admitted with the diagnosis of chromosomal anomaly, severe foetal malformation syndrome incompatible with extrauterine life revealed in the course of ultrasound pregnancy monitoring or patients who had suffered spontaneous abortions during the second trimester were included in the case study. All fetuses were morphologically investigated through magnetic resonance

using a Bruker BioSpec device with 7 Tesla magnetic field with a TurboRare-High Resolution T2 weighted protocol. The mean scanning time/case was of 61.89 minutes. The images were interpreted by a radiologist with expertise in pediatric radiology and by the PhD candidate with experience in normal foetal anatomy and maternal-foetal medicine. Subsequently, all cases underwent stereomicroscopic or classical autopsy according to the norms of the French Society of Foetal Pathology, carried out by an expert foetal pathologist. For every case a detailed result was drafted referring to the normal or malformed of 32 evaluated anatomical foetal structures, the data base included a total of 960 comparison indices (30 cases x 32 anatomical structures). The imaging results were not made available to the pathologist. In order to evaluate the overall diagnosis accuracy of virtual autopsy of foetuses as compared to the foetal autopsy (SE), (SP), PPV, NVP were calculated, the diagnostic accuracy and their 95% trust intervals using Dag_stat extension of Microsoft Excel and Interactive statistic page, total as well as according to seven anatomical segments: cerebral, cardiac, vascular, pulmonary, uro-genital, scheletic, facial, but as well according to gestation age: 12-14 weeks, 15-16 weeks, 17-19 weeks.

Results: Global post mortem MRI showed an SE of 92.04% [CI 95% 85.42-96.29] and a SP of 97.87% [CI 95% 94.64- 99.42], with a PPV of 96.30 % [CI 95% 90.78-98.56] and a NVP of 95.34% [CI 95% 91.61-97.45], determining a diagnostic accuracy of 95.68% [CI 95% 92.73-97.68]. Also the Cohen Kappa index was of 0.907, emphasizing an almost perfect concordance between the two methods, a fact also sustained by the McNemars ($p=0.212$) test, which did not show statistically significant differences between the two methods. These results were confirmed by the analysis of the seven anatomic segments, but also by the age subgroups, while the sensitivity of the 7T pm-MRI increases with gestation age.

Conclusions: Pm-MRI with 7T magnetic field is an efficient option which can be realized within clinically acceptable scanning times, and emerges as fiable adjuvant method or alternative method of the classical autopsy for the evaluation of second trimester foetuses with multiple malformations.

Study Case 3. Multidisciplinary Evaluation of Second Trimester Foetuses with Malformation Syndrome Detected through Prenatal Ultrasound using 3T Post Mortem MRI and Conventional Autopsy

The main aim of the study was to analyze the diagnostic value of 3T pm-MRI in order to identify structural anomalies in foetuses resulted from therapeutic pregnancy terminations during the second trimester as compared to classical autopsy, globally, but according to anatomical segments as well. A secondary aim was to reference the diagnostic fiability of 3T pm-MRI to the autopsy according to the congenital malformation syndrome, which was revealed through prenatal ultrasound exam and which let to the indication of therapeutic pregnancy termination, in order to emphasize the clinical situations which might benefit more from pm-MRI.

Method: Prospectively 32 patients with gestational age between 18-23 weeks admitted for therapeutic pregnancy termination due to cromosomal anomalies or foetal anomalies revealed by ultrasound were included in the study. The morphological investigations were carried out using a GE Healthcare (Discovery™ MR750w GEM) device with 3T magnetic field, using a T2, T1 CUBE tridimensional protocol. Subsequently all fetuses were examined according to the autopsy protocol of the French Society of Foetal Pathology.

The cases were divided into 4 groups according to the malformation syndromes revealed through prenatal ultrasound and due to which the therapeutic termination of pregnancy was decided: Cerebral Group, Cardiac Group, Renal Group, Rare Syndromes Group. For every group SE, SP, PPV, NVP, accuracy with 95% trust and the concordance coefficient between the imaging investigation and the corresponding classical investigation of the anatomic segment were calculated.

Results: Overall 3T pm-MRI showed a diagnostic sensibility as compared to the gold standard of 67.33% [CI 95% 57.28-76.33], with a specificity of 98.37% [CI 95% 97.33-99.09], a PPV of 81.93% [CI 95% 71.95-89.52], an NVP of 96.49% [CI 95% 95.11-97.57] reaching a diagnosis accuracy of 95.31% [95% 93.83-96.52], in a cohort with malformation frequency amounting to 9.86%. Cohen's k coefficient of concordance was of 0.71, revealing a substantial concordance between the two methods, also confirmed by the McNemar test= 6.75 (p=0.0094).

The best diagnostic concordance between pm-MRI and autopsy was recorded when analyzing the cerebral segment, while the weakest concordance was recorded when analyzing the cardiac segment.

Taking into consideration the four groups with indication of therapeutic termination of pregnancy, the best concordance between the two methods of foetal post mortem evaluation was found in the Cerebral Group, where the Cohen index of diagnostic concordance was of 0.76, with a SE of 80% and a SP of 96.30 % and in the Renal Group where the concordance reached 100%.

Conclusions: 3T Pm-MRI represents a valuable adjuvant method for autopsy conducted on fetuses with prenatal malformation diagnosis. For pregnancies with recommendation of therapeutic termination of pregnancy for cerebral or renal anomalies, it can be recommended as first intention investigation for the confirmation of the prenatal diagnosis.

General Conclusions

The main situations benefiting from a virtual autopsy conducted through pm-MRI, as resulting from the present PhD research are the following:

1. Analysis of embryos resulting from spontaneous abortion through high magnetic field pm-MRI, as the main cause to determine spontaneous abortions during the first trimester are genetic anomalies.

2. Examination of first trimester fetuses resulting from spontaneous abortion, as an imaging analysis which only describes a normal anatomy of the first trimester fetuses carried out with high magnetic field can direct to a cause of the spontaneous abortion related to the placenta or a systemic cause.
3. The description of the structural anomalies of first and second trimester fetuses resulting from therapeutic termination of pregnancy for anomalies related to the karyotype confirmed through amniocentesis or villi biopsy, as the most probable anomalies described by the classical autopsy are the structural ones.
4. First intention method of the confirmation of severe cerebral pathology revealed through prenatal ultrasound for second trimester fetuses, as the confirmation of cerebral anomalies through classical dissection is often hampered by the type of pathology present or the advanced level of maceration.
5. First intention method for the confirmation of severe renal pathology confirmed through prenatal ultrasound in second trimester fetuses.
6. Description of cardiac pathology in first and second trimester fetuses using high magnetic fields.
7. Description of other metabolic anomalies of hemochromatosis type.
8. Guide for difficult dissections necessary for the proper investigation of small fetuses with multiple malformation syndrom, as the dissection of small fetuses is a labour-intensive process, where the results are directly proportional with the experience of the first examiner.
9. Offers a permanent data carrier and the images obtained can be interpreted by more than one examiner at the same time.
10. Alternative post mortem investigation method for parents refusing conventional autopsy.

Originality and Innovative Contributions of the PhD Thesis

The three studies introduce the notion of virtual autopsy through MRI as an alternative to foetal autopsy for the first time in Romania.

The evaluation of first trimester fetuses with malformations using a 7T magnetic field and a scanning protocol is suggested, offering a new evaluation method of these difficult cases, which can exceed certain limitations of the classical method.

The results obtained show that using a 7T magnetic field represents a fiable option for the appropriate evaluation of small fetuses with multiple malformations from the second trimester, suggesting a new research direction and also practical application of the high magnetic field, but also an alternative solution, which is fast and presents high diagnostic accuracy, which can be offered to parents who refuse foetal autopsy. At the same time, alongside the advantages, also the limitations of this method were detailed, limitations referring to the logistics of the method, but also to human resources, availability, but also performance for solving an implementation protocol in clinical practice in Romania.