

7[^]

Conferenza Nazionale dei Servizi Trasfusionali

Vicenza | 24-26 maggio 2023



QUANTIFICAZIONE MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA DELL'EMORRAGIA FETO-MATERNA (EFM): ANALISI DI 21 CASI

Gianluca Giovannetti

*UOC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico
Umberto I-Sapienza, Roma*

Il sottoscritto, in qualità di Presentatore

dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.

L'EMORRAGIA FETO-MATERNA (EFM)

- Rappresenta il passaggio di sangue fetale nella circolazione materna
- E' un evento che può insorgere prima del parto, in genere nel 3° trimestre, o durante il parto, anche in gravidanze normali
- Non è rara tra i neonati nati morti

In letteratura è riportato che una **EFM >30 ml**, valutata mediante test di Kleihauer–Betke, **incide in 1/330 nascite**, e , con volumi **>150 mL**, **in 1/5000 nascite**.

In gravidanza: <1 ml di emazie in condizioni normali

Al parto: <4 ml di emazie nel **98 %** delle gravidanze

Fino a **3/1000** donne RhD negative potrebbero essere **a rischio di alloimmunizzazione**, poiché la dose standard di Ig somministrata non è sufficiente

Condizioni che si associano più frequentemente ad emorragia feto-materna

- Trauma addominale nel III trimestre
- Idrope fetale
- Rottura di placenta
- Gravidanza gemellare
- Morte intrauterina del feto
- Parto cesareo
- Rimozione manuale della placenta
- Parto vaginale complicato



Valutazione EFM

Test di Kleihauer-Betke

Cellule contenenti HbF

Campione materno:

- ✓ raccolto entro 30'-45' dall'evento di EFM per consentire la redistribuzione degli eritrociti fetali nel circolo materno
- ✓ risospeso accuratamente, onde evitare la sedimentazione delle emazie fetali più grandi

Uno striscio sottile di sangue materno viene esposto ad una soluzione acida; HbA è eluita, mentre HbF è resistente.

La successiva colorazione del vetrino con ematossilina evidenzia in rosa scuro gli eritrociti fetali, mentre quelli contenenti HbA, di origine materna, appaiono come "ombre"



Valutazione EFM mediante test di Kleihauer-Betke

Svantaggi

Test laborioso

Non standardizzabile

GR contenenti 20%–25% di HbF sono presenti in individui sani (0.5%–7.0% dei GR circolanti)

In SCD, β -talassemia, HPFH, e gravidanza: possono essere presenti in % più elevate (falsi positivi, sovrastima della EFM)

Valutazione EFM

La CITOMETRIA A FLUSSO

-è una tecnica di laboratorio che utilizza un fascio di luce laser per la rilevazione, il conteggio e la caratterizzazione di elementi cellulari

-consente di porre diagnosi eziologica nell'anemia fetoneonatale, e viene attualmente considerato il metodo *gold standard* per quantificare l'entità dell'emorragia, dato fondamentale anche nel caso da questo risultato dipenda una prescrizione appropriata in caso di immunoprofilassi anti-D.



METODI

Valutazione EFM mediante test citofluorimetrico

Il nostro laboratorio dispone:

- metodo delle rosette (Immucor) come test di screening nelle gravidanze Rh negative
- utilizza **l'analisi citofluorimetrica** per le conferme di risultati positivi al test di screening e come unico test nei casi di anemia feto-materna.

- Il metodo in citofluorimetria si avvale di un kit (Fetal Cell Count,IQ) basato sull'impiego di una **doppia marcatura con anticorpi monoclonali anti-HbF e anti-carbonicoanidrasi**.
- Per l'analisi viene utilizzato il FACSLyric™ (Becton-Dickinson).
- I risultati ottenuti e la percentuale di globuli rossi fetali vengono usati per calcolare il volume totale di globuli rossi fetali nella circolazione materna e il volume dell'emorragia.

Il laboratorio partecipa regolarmente al programma VEQ UKNEQAS per FMH.

METODI

Valutazione EFM mediante test citofluorimetrico

Il nostro laboratorio dispone:

- metodo delle rosette (Immucor) come test di screening nelle gravidanze Rh negative
- utilizza **l'analisi citofluorimetrica** per le conferme di risultati positivi al test di screening e come unico test nei casi di anemia feto-materna.

Principali vantaggi

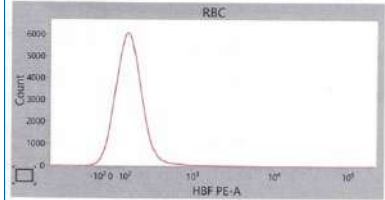
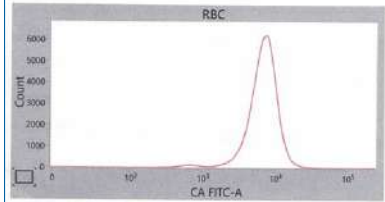
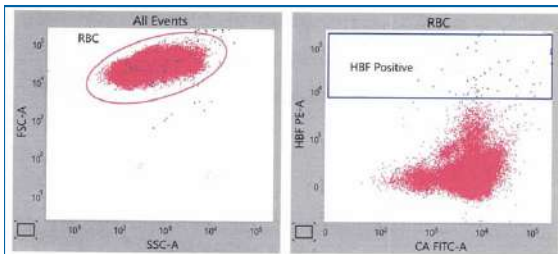
- Capacità di distinguere i GR adulti da quelli del feto
- Accuratezza: analizza un elevato n° di cellule (≥ 50.000)
- Riproducibilità

RISULTATI

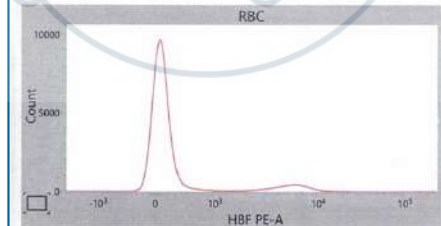
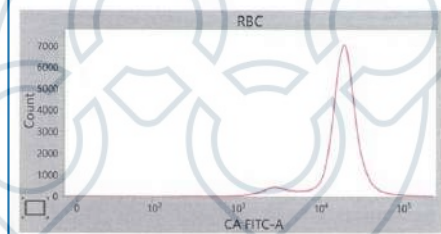
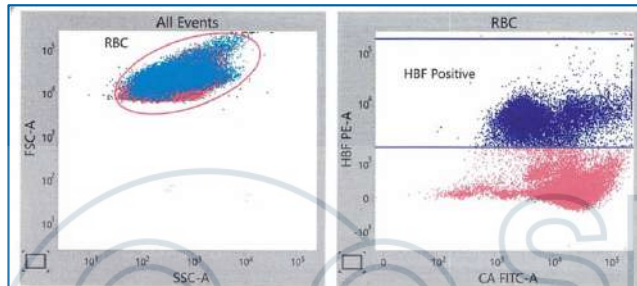
Negli ultimi due anni sono stati inviati, per la valutazione dell'EFM in neonati con anemia da moderata a severa, 21 campioni materni:

- 13 provenienti da ospedali regionali
- 3 da case di cura private
- 2 da ospedali fuori regione.

	Mediana	Range
GR fetali nel circolo materno (%)	2,18	0-7,02
EFM (mL)	47,87	0-154,15 > 100 in 6 neonati
Hb neonato (g/dL)	7,9 (dato disponibile in 11/21 casi)	2,6-11,6 5 neonati < 5
Epoca gestazionale (dato dichiarato in 6 casi)	-	34-38 sett. in 6 casi (negli altri definito parto «a termine»)

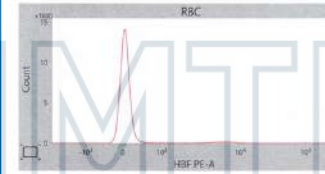
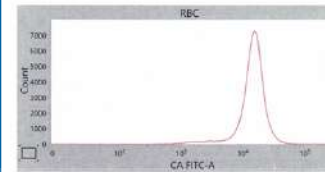
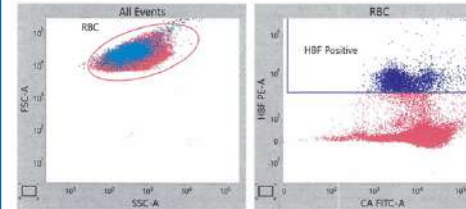


Statistics				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
Tube_001:RBC	149,966	99.98	***	99.98
Tube_001:HBF Positive	52	0.03	0.03	0.03
Tube_001:RBC AND HBF Positive	52	0.03	***	0.03



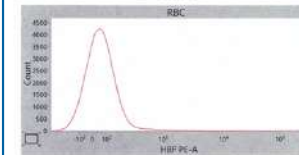
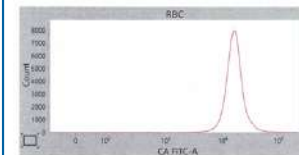
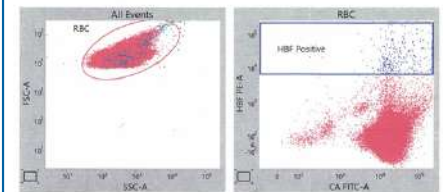
Statistics				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
Tube_001:RBC	149,935	99.96	***	99.96
Tube_001:HBF Positive	15,095	10.07	10.06	10.06
Tube_001:RBC AND HBF Positive	15,095	10.06	***	10.06

Sample ID: CRT POS. MIX
Approved: 4/13/2023 1:25:54 PM
Printed: 4/13/2023 1:25:57 PM



Statistics				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
Tube_001:RBC	149,966	99.98	***	99.98
Tube_001:HBF Positive	4,322	2.88	2.88	2.88
Tube_001:RBC AND HBF Positive	4,322	2.88	***	2.88

Sample ID: CRT NEG.
Approved: 4/13/2023 1:24:56 PM
Printed: 4/13/2023 1:24:59 PM



Statistics				
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total
Tube_001:RBC	149,973	99.98	***	99.98
Tube_001:HBF Positive	342	0.23	0.23	0.13
Tube_001:RBC AND HBF Positive	342	0.23	***	0.13

EFM pari a 220,91 mL

CONCLUSIONI

- L'analisi citofluorimetrica ha consentito di confermare che l'anemia fetale era dovuta ad EFM in 13/21 casi (M/F, 8/5) considerando un cut-off di 4 mL (nel 98% circa delle gravidanze l'entità dell'EFM è in genere < 4mL)
- Abbiamo rilevato difficoltà nell'ottenere in maniera completa i dati relativi alla gravidanza e al parto, al neonato, alla madre
- In letteratura (Carr NR, 2021) è riportato che circa il 40% dei casi di EFM severa non viene diagnosticata. Tra le possibili cause:
 - mancanza di un laboratorio che effettua il test
 - trasfusione neonatale effettuata nei giorni successivi alla nascita in terapie intensive di ospedali diversi da quello in cui è avvenuto il parto, con difficoltà nel reperire i campioni materni.

CONCLUSIONI

La valutazione dell'EFM come test precoce in neonati con anemia grave è importante per una corretta diagnosi, per guidare una gestione clinica più appropriata ed effettuare una adeguata profilassi

E' necessario implementare l'educazione a richiedere il test in presenza di anemia neonatale non giustificata da emolisi, migliorando la comunicazione tra neonatologi, ostetriche e SIMT, nella fase di richiesta dell'esame, che deve essere completa dei dati della madre e del neonato.