



Il significato della titolazione degli anticorpi in Medicina Trasfusionale: aggiornamento

**Il ruolo della titolazione anticorpale
nella gestione della malattia emolitica feto-natale**

Melania Di Cerbo

Fondazione Policlinico Universitario Campus Bio-Medico

Roma

La sottoscritta, **Melania Di Cerbo** in qualità di Relatrice
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, **NON È** in alcun modo portatrice 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 mie funzioni al fine di trarne vantaggio.



Malattia emolitica del Feto e del Neonato: MEFN

- ✓ La **MEFN** è caratterizzata da un'anemia emolitica provocata dalla reazione immunomediata tra gli anticorpi materni di classe IgG e gli antigeni presenti sui globuli rossi del feto attraverso il fenomeno dell'emorragia feto materna (EFM), che ha come conseguenza la loro distruzione principalmente nella milza.
- ✓ Il sistema immunitario materno entra in contatto con gli antigeni fetali attraverso **EFM**



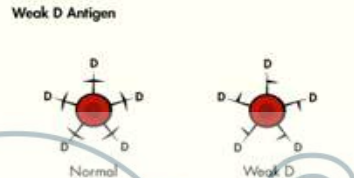
SIMTI
PRO



MEFN: Cause

DA INCOMPATIBILITA' RhD:

- IgM DELLA 1° GRAVIDANZA → IgG 2° GRAVIDANZA -
- > lisi GR fetali
- L'incompatibilità ABO materno fetale favorisce la distruzione dei GR fetali
- La più frequente e la più pericolosa
- 25% casi mortale



DA INCOMPATIBILITA' Ag RARI:

- spesso benigne
- ordine di frequenza: K, c, Cw, Fyb, Jka, S, s, M (raro)
- anti I, Pi e Le scarsamente presenti sui GR fetali
- anti K da titolare perchè se > 1:8 è a rischio
- Flussi migratori

DA INCOMPATIBILITA' ABO:

- 20% gravidanze nei bianchi
- Spesso madre O figlio A1
- Solo 1.2 % richiede intervento trasfusionale
- A e B poco presenti sui GR fetali
- A e B presenti in modo ubiquitario anche in altre cellule e adsorbono le IgG materne (di classe 2 e quindi poco capaci di passare la placenta)

incompatibilità ABO con anticorpi anti-A, anti-B

alloanticorpi anti-Rh (D, c, E)
anti-Kell → emolisi
anti-Kidd → inibizione eritropoiesi
anti-Duffy

Antigene	Sistema	Antigene	Sistema
Fy ^a	Duffy	ABO	ABO
Lu ^a	Lutheran	D	Rh
Lu ^b	Lutheran	C	Rh
M	MNSs	c	Rh
N	MNSs	E	Rh
S	MNSs	e	Rh
s	MNSs	K	Kell
P	P	k	Celano
Tj ^a	P	Jkb	Kidd
Xg	Xg		
Co ^a	Colton		
Co ^{ab}	Colton		
Yt ^a	Cartwright		
Yt ^b	Cartwright		
Di ^a	Diego		
Di ^b	Diego		
Wr ^a	Wright		

Possono causare MEN gravi

Di solito MEN LIEVI

Da : Tarjeon ML, Fundamentals of Immunohematology:2nd ed p260, 1995

Indagini diagnostiche

La gestione delle indagini prenatali finalizzate alla prevenzione della MEFN rientra tra i LEA del Sistema Trasfusionale (Legge 219 del 2015)

Antenatale

- Gruppo sanguigno
- Dvariant
- Ricerca e identificazione Ab irregolari
- Genotipizzazione fetale
- Titolazione dell'Ab
- Distinzione tra anti-D passivo o attivo

Post-parto

- Gruppo sanguigno e TAD del neonato
- Stima dell'EFM per calcolo dose IP

Indagini Immunoematologiche: RAI Positiva (1)

RAI* POSITIVA in gravidanza



Definire la significatività clinica dell'Ab

Specificità

Titolo

Origine

Raccomandazione n. 5	GdR
Se la ricerca di anticorpi è positiva, al fine di valutare il rischio di MFEN, si suggerisce di identificare la specificità, il titolo e l'origine degli anticorpi e di eseguire un'accurata anamnesi immunoematologica e ostetrica della donna.	2B
Raccomandazione n. 6	GdR

Società Italiana di
Medicina Trasfusionale
e Immunoematologia



Raccomandazioni
per la prevenzione ed il trattamento
della Malattia Emolitica del Feto
e del Neonato

Gruppo di Redazione
Francesco Bennardello, Serellina Coluzzi, Giuseppe Curciarello,
Tullia Todros, Stefania Villa

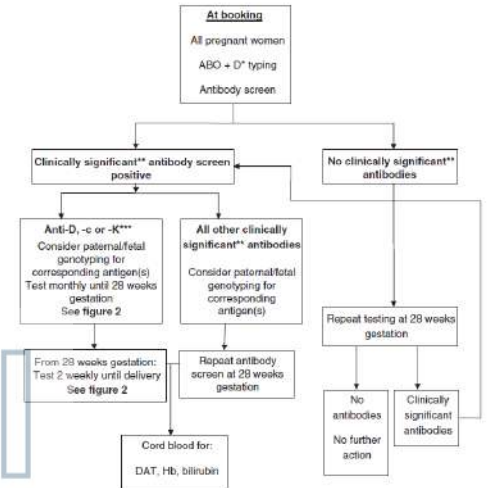
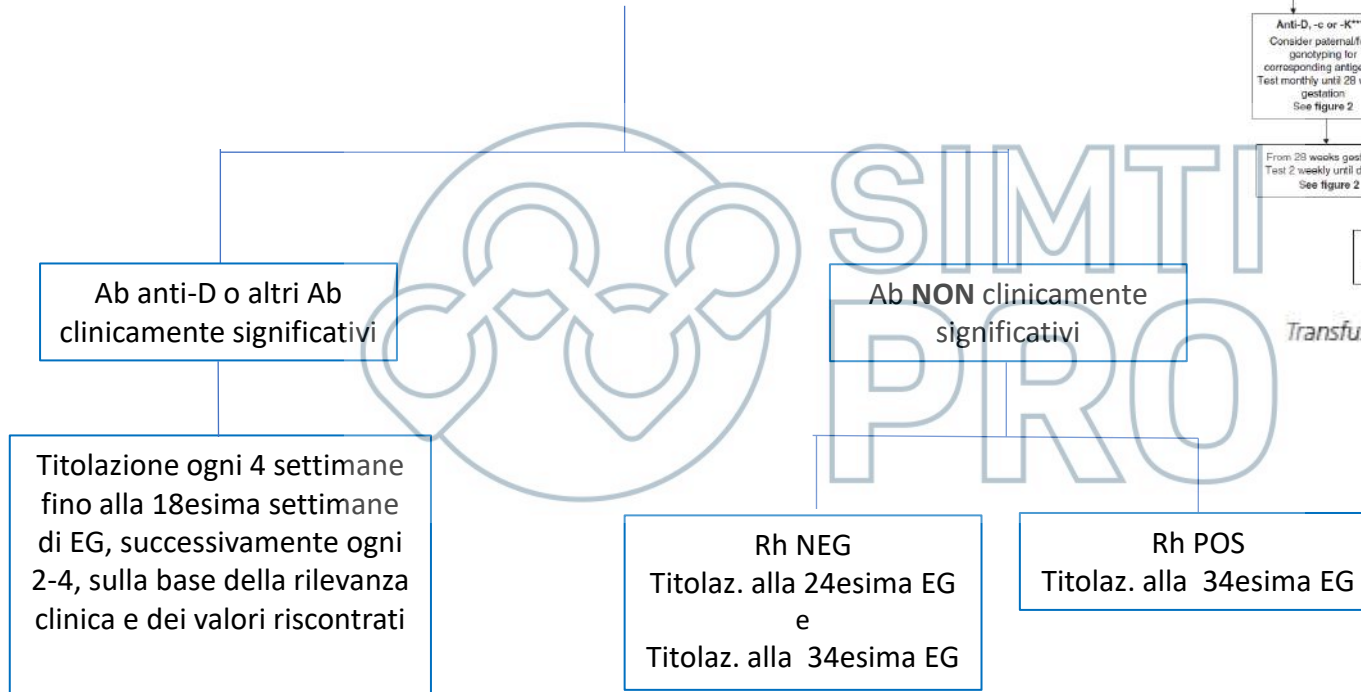
* Pannelli a 3 cellule, in cui siano rappresentati almeno i seguenti antigeni:
C, c, D, E, e, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, M, N, P1, Lea, Leb, con espressione in **“doppia dose”** di:
Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, M

Standard SIMTI, III edizione 2017

Indagini Immunoematologiche: RAI Positiva (2)



Titolo



Transfusion Medicine, 2016, 26, 246-263

Titolazione anticorpale

- **La titolazione anticorpale** permette di valutare la FORZA di un Ab , ove non disponibili metodi di quantificazione
- **Aiuta nella decisione clinica :**
 - inizio del monitoraggio fetale
 - follow-up e gestione della gravidanza

Il laboratorio di Immunoematologia deve:

- definire per ciascun metodo utilizzato, il **VALORE CRITICO**
- garantire il monitoraggio dell'andamento del titolo
- Utilizzare sempre lo stesso end-point nell'interpretazione (w+ o 1+)

Il valore critico è quello che si associa a **idropese fetale**

- Deve esser eseguita sempre con lo stesso campione siero/plasma
- La metodica deve essere convalidata e usata sempre la stessa

Titolazione anticorpale: definizione e metodi

Titolazione: allestire una serie di diluizioni 2x siero/plasma e testare per ciascuna specificità anticorpale.
Il titolo è il reciproco della maggior diluizione che dà risultato ancora positivo (AABB: 1+)

Provetta

Micropiastra

Microcolonna

- Non utilizzare mezzi potenzianti (albumina, LISS, PEG)
- Non utilizzare emazie trattate con enzima

UK NEQAS

Fase liquida (metodo standard AABB)

- risente di numerosi variabili (modalità di diluizione, incubazione e centrifugazione, soggettività di interpretazione)
- tempi richiesti
- volumi di reagenti
- impossibilità di automazione

Fase solida e microcolonna

- minor dipendenza dall'operatore
 - obiettività di lettura
 - tempi minori
 - minor volume di reagenti
 - possibilità di automazione
 - maggior sensibilità (microlonna) rilevazione di reazioni a campi misti, titoli più alti**
- IMPORTANTE ridefinire la SOGLIA CRITICA**



Titolazione anticorpale: Raccomandazioni SIMTI-SIGO

Standard di Medicina Trasfusionale

E.3.7.1

Per le indagini immunoematologiche finalizzate alla prevenzione e allo studio della malattia emolitica del neonato, la ST, in relazione alla casistica osservata ed al grado di specializzazione delle aree assistenziali materno-infantili servite, deve predisporre ed applicare specifiche procedure, atte a definire e regolamentare:

....

c) il valore critico del titolo degli anticorpi antieritrocitari materni clinicamente significativi che deve essere segnalato ai fini della sorveglianza materno-fetale;

...

Insorgenza
Andamento nel
tempo del titolo
Correlazione con i
dati clinici della
gravidanza

Valore critico va
sempre segnalato
allo Specialista di
ginecologia ed
ostetricia

❑ Il valore critico significativo ≥ 32 \neq a seconda del tipo di Ab analizzato

Raccomandazioni per la prevenzione ed il trattamento della Malattia Emolitica del Feto e del Neonato (SIMTI-SIGO)

Raccomandazione n.5

GdR

Se la ricerca di anticorpi è positiva, al fine di valutare il rischio di MEFN, si suggerisce di identificare la specificità, il titolo e l'origine degli anticorpi e di eseguire un'accurata anamnesi immunoematologica ed ostetrica della donna

2B

4.3 Titolazione degli anticorpi

4.3.1 Una volta che viene individuato un anticorpo, e questo è riconosciuto come potenziale causa di MEFN, ne deve essere determinata il titolo con una tecnica standardizzata.

4.3.2 ... è necessario eseguire la titolazione dell'anticorpo ogni 4 settimane fino alle 18 settimane di EG; successivamente, ogni 2-4 settimane sulla base della rilevanza clinica e dei valori riscontrati. L'incremento rapido del titolo impone un monitoraggio immunoematologico più frequente e una più stretta sorveglianza materno-fetale.

4.3.3 Per le titolazioni dell'anti-D si suggerisce l'uso di emazie D-eterozigoti...

4.3.4 ... per l'anticorpo anti-D .. (tecnica standard) il valore critico del titolo anticorpale è pari a 32.

4.3.5 In caso di utilizzo di altre tecniche ogni laboratorio deve convalidare le metodiche ...

Incremento rapido del
titolo anticorpale in
gravidanza è sempre
un indice predittivo
sfavorevole

Ruolo dell'IEM importante
guida le decisioni cliniche dei
ginecologi e aiuta nella
gestione della gravidanza

Titolazione anticorpale

Valutare la «forza»
emolitica dell'Ab

Decidere l'inizio del
monitoraggio
strumentale del feto

Avviare la donna a programmi di
trattamento della MEFN

Riferimento: titolo in soluzione
fisiologica, senza additivi, incubazione
a 37°C per 1 ora

In caso di impiego di altre metodiche, queste devono essere convalidate,
e ne devono essere definiti i livelli critici

Titolazione anticorpale: Raccomandazione UK

Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy

White, J¹ Qureshi, H² Massey, E³ Needs, M⁴ Byrne, G⁵ Daniels, G⁶ Allard S⁷ & British Committee for Standards in Haematology

Received 28 September 2015; accepted for publication 1 March 2016

- ✓ Tecnica standardizzata per la titolazione
- ✓ Marker prognostico negativo aumento del titolo di più di una diluizione : MEFN

2. LABORATORY TESTS

All laboratory testing procedures must be validated in compliance with published guidelines (BCSH, 2012b). Wherever possible, testing should be performed on automated equipment, which ensures positive sample identification, and with electronic transfer of results to the Laboratory Information Management System (LIMS).

Recommendation

- All laboratory testing procedures should be validated in compliance with published guidelines (BCSH, 2012a, Grade 1B).

Titolazione anticorpale: alloanticorpi (1)

- **Titolo critico per anti-D: ≥ 32** (Lieberman L 2020; Moise JK)

Valore critico
che si associa
a rischio di
idrope fetale

Raccomandazione n. 10

Per le titolazioni dell'anti-D si **suggerisce** l'uso di emazie D-eterozigoti (R1r, R2r) in grado di testimoniare meglio l'espressione antigenica del feto. In ogni caso per una corretta valutazione dell'andamento del titolo, è necessario utilizzare sempre emazie test con la medesima zigosità.

USARE EMAZIE
D- ETEROZIGOTI

La pratica dell'immunoprofilassi in gravidanza ha comportato un aumento delle ricerche anticorpali per anti-D:

- interpretare come passivo un Ab immune, gravidanza non sorvegliata e rischio MEFN
- Interpretare come immune un Ab passivo, mancata indicazione a IP e rischio immunizzazione

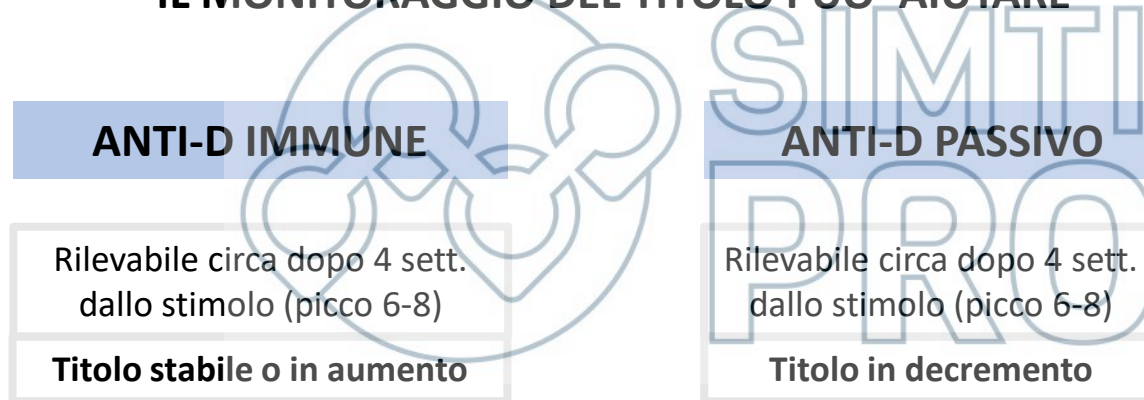
Anti-D
passivo o
immune?

SHOT annual report

Titolazione anticorpale: alloanticorpi anti-D immuni o passivi

- ✓ Per distinguere gli Ab anti-D immuni o passivi sono fondamentali l'anamnesi e registro IP
- ✓ E' importante avere un TCI negativo pre IP

IL MONITORAGGIO DEL TITOLO PUO' AIUTARE



- ✓ Metodi quantitativi potrebbero esser un potenziale discriminine
 - calibrazione con standard anti-D
 - confronto con la cinetica di concentrazione dell'anti-D a distanza di una data dose di IP

Titolazione anticorpale: alloanticorpi (2)

- Titolo critico per anti-Kell: ≥ 4

> Am J Obstet Gynecol. 2018 Oct;219(4):393.e1-393.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2018.07.020. Epub 2018 Jul 29.

Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management

Yolentha M Slootweg¹, Irene T Lindenburg², Joke M Koelewijn³, Inge L Van Kamp², Dick Oepkes², Masja De Haas⁴

Affiliations + expand

PMID: 30063902 DOI: 10.1016/j.ajog.2018.07.020

- Ag Kell forte immunogeno ma non è frequente
- Ab anti-Kell sono generalmente da trasfusione
- L'anamnesi ostetrica è poco predittiva
- Bassi titoli (≥ 8) devono esser già considerati a rischio di MEFN
- Emolisi e **soppressione dell'eritropoiesi fetale**

UK: tutti i casi di Ab del sistema Kell devo esser rinviati allo specialista di ginecologia e ostetricia, indipendentemente dal titolo

**TRANSFUSION
MEDICINE**

Official Journal of
the British Blood Transfusion Society

Transfusion Medicine | GUIDELINES



MEFN ABO

15-20% delle gravidanze presentano un'incompatibilità ABO maggiore madre/figlio



10% di queste MEFN → di cui 1,5% in forma grave

Motivazioni della ridotta espressività clinica della MEFN ABO:

- Ag A/B ancora non completamente maturi sui GR feto/neonato
- Presenza ubiquitaria delle sostanze A/B nelle cellule endoteliali ed epiteliali
- IgG anti-A/-B > IgG2 (ridotta capacità di attraversare la placenta)

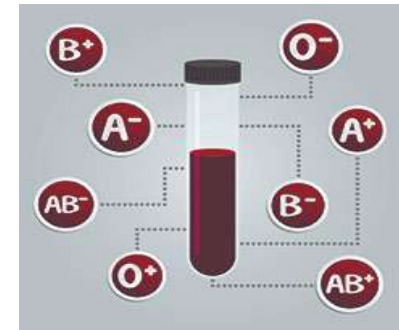
Malattia non prevenibile, ne prevedibile, pertanto **non si raccomanda** la ricerca e titolazione delle IgG anti-A/-B in gravidanza

MEFN ABO: Raccomandazioni SIMTI-SIGO

Raccomandazione n. 15	GdR
In presenza di evidenze laboratoristiche (TAD positivo) o cliniche (ittero) di emolisi neonatale, quando la madre è di gruppo O, si suggerisce di eseguire la tipizzazione gruppo-ematica ABO/RhD sulle emazie del funicolo, la ricerca e la titolazione delle IgG anti-A e/o anti-B nel siero materno e, in caso di TAD positivo, l'eluizione delle IgG (anti-A e/o anti-B) dalle emazie neonatali.	2C

- ✓ La titolazione delle isoemoagglutinine **non è predittivo** della MEFN ed è per questo che non è raccomandato dosarle (SIMTI-SIGO, 2014)

Raccomandazione n. 7	GdR
Si raccomanda di non eseguire la ricerca e il monitoraggio degli anticorpi immuni anti-A e anti-B nelle donne in gravidanza.	2B



Titolazione anticorpale: riferimento metodologico (1)

- ✓ Titolazione Antenatale: **UK NEQAS
BTLP Antenatal Antibody Titration
(ANT) Pilot Scheme**

UK NEQAS

Registrare la tecnologia utilizzata, la forza di reazione per ciascuna diluizione testata e il titolo riportato. Se si utilizza più di una tecnologia, registrare i risultati per la tecnologia principale utilizzata per riportare i risultati clinici.

Clin Lab. 2020 Jun 1;66(6). doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.191021.

Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter?

Ioanna Flesiopoulou, Abraham Pouliakis, Marianna Politou, Antonia Dourouki, Christos Damaskos, Theodora Koutsouri, Maria Papakonstantinou, Vasileios Soulakis, Argyrios Tsantes, Serena Valsami
PMID: 32538044 DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.191021

Titolazione anticorpale: riferimento metodologico (2)



Anti-D NIBSC: codice 7/304

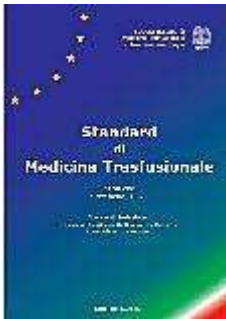
Automazione

- ✓ Fornisce dei campioni a titolo noto per «superare» il concetto di standardizzazione del metodo
- ✓ Superamento positivo del test (secondo UK NEQAS) una lettura di +/- 1 diluizione rispetto al target



- ✓ Molti studi in letteratura propongono l'automazione come il metodo migliore
- ✓ E' più precisa, non è operatore dipendente
- ✓ Riduce la variabilità tra laboratori

Valutazione esterna di qualità VEQ



E.2.3.1 La ST garantisce la partecipazione a programmi di Valutazione Esterna della Qualità delle attività analitiche svolte

- Programmi professionali con esercizi di verifica della performance del monitoraggio del titolo degli anticorpi irregolari in gravidanza
 - Selezionare gli **eritrociti adatti per la titolazione**
 - Titolare l'Ab con la **tecnologia IAT** in uso
 - Riportare la **forza di reazione** per ogni diluizione
 - Dichiarare il **titolo refertato** e l'indicazione ad **allertare lo Specialista di Ginecologia ed Ostetricia**

Conclusioni

1. La titolazione contribuisce ad aiutare il clinico nel prendere una decisione su quando iniziare il monitoraggio del feto con mezzi strumentali

- Indubbiamente un titolo alto in corso di gravidanza è spesso indice di una MEFN clinicamente severa, ma è anche noto come il suo valore prognostico non sia assoluto
- Sicuramente sono significativi i repentini aumenti del titolo anticorpale

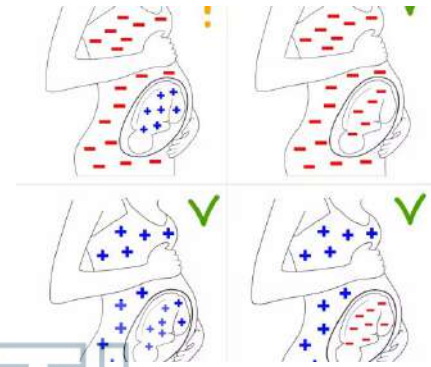
2. Il laboratorio di IEM ha un ruolo rilevante nella diagnosi e nel monitoraggio del rischio di MEFN

- Garantire un'attività di laboratorio di comprovata efficacia con metodiche convalidate, controllate con VEQ per il confronto intra- e inter- laboratorio

3. Deve esserci una stretta collaborazione tra l'Immunoematologo e lo Specialista di Ginecologia ed Ostetricia

- la gestione dell'alloimmunizzazione materno-fetale è un esempio di attività clinica in Medicina Trasfusionale

Grazie per
l'attenzione!!



SIMTI
PRO

