



**Il significato della titolazione degli anticorpi
in Medicina Trasfusionale: aggiornamento**

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

Pierpaolo Negro
SIMT Gallipoli, ASL Lecce

Il sottoscritto, in qualità di Relatore

dichiara che

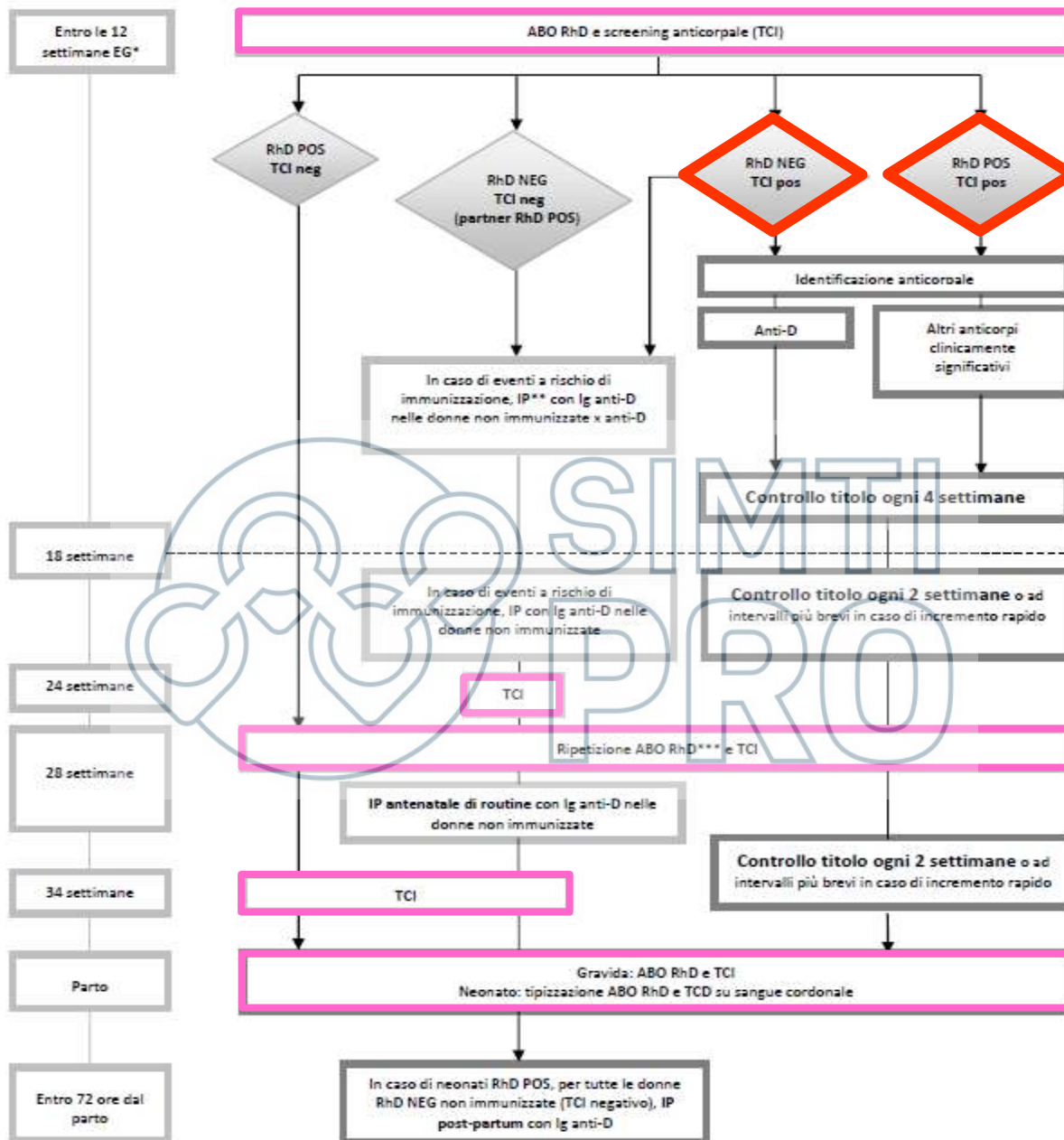
nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le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

Test di Coombs Indiretto (TAI)

Tutte le gestanti «devono» essere monitorate con TAI *nel corso della gravidanza e al parto* (SORVEGLIANZA IMMUNOEMATOLOGICA)

Il TAI «deve» essere effettuato con *metodica validata* in grado di evidenziare anticorpi clinicamente significativi (Standard SIMTI)





ALLOIMMUNIZZAZIONE



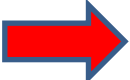
Trasfusioni
Manovre invasive
Emorragie silenziose
Aborto
Parti precedenti



TAI POS

TCI POSITIVO
(SOSPETTO DI ANTICORPI IMMUNI a rischio MEFN)

Gravida Rh NEG?
NO SI



Identificazione Anticorpale

Anticorpo identificato?

NO

SI

Anamnesi negativa?

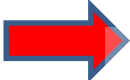
NO

SI

Approfondire studio con metodiche diverse di TCI e/o con altri test (ad es. fase solida e/o impiego di emazie fittinate)

Verosimile anticorpo naturale

Rivalutare anamnesi ostetrico-ginecologica



Tipizzazione Ag corrispondenti (gravida e partner)

Incompatibilità antigenica?

NO

SI

Altri partner?

NO

SI

Anamnesi trasfusionale negativa?

NO

SI

Anticorpo immune da pregressa sensibilizzazione materno-fetale

Anticorpo immune da pregressa sensibilizzazione post-trasfusionale



Titolazione Anticorpale

Livello critico?

SI

NO

EG > 18^a settimana?

SI

NO

Monitorare titolo ogni 4 settimane

Monitorare titolo ogni 2 settimane

Titolo in aumento?

NO

SI

SORVEGLIANZA FETALE (Ecografia ed eco-Doppler ACM)



IDENTIFICAZIONE

Ab non significativi

- **IgM** incapaci di superare il filtro placentare (*anti-M, -N, -P1, -Le*)
- **Neutralizzati da Ag solubili** (*anti-Le*)
- **Diretti vs Ag non ben sviluppati** sulle emazie fetali (*anti-Le, -P1, -I, ecc*)

Ab significativi

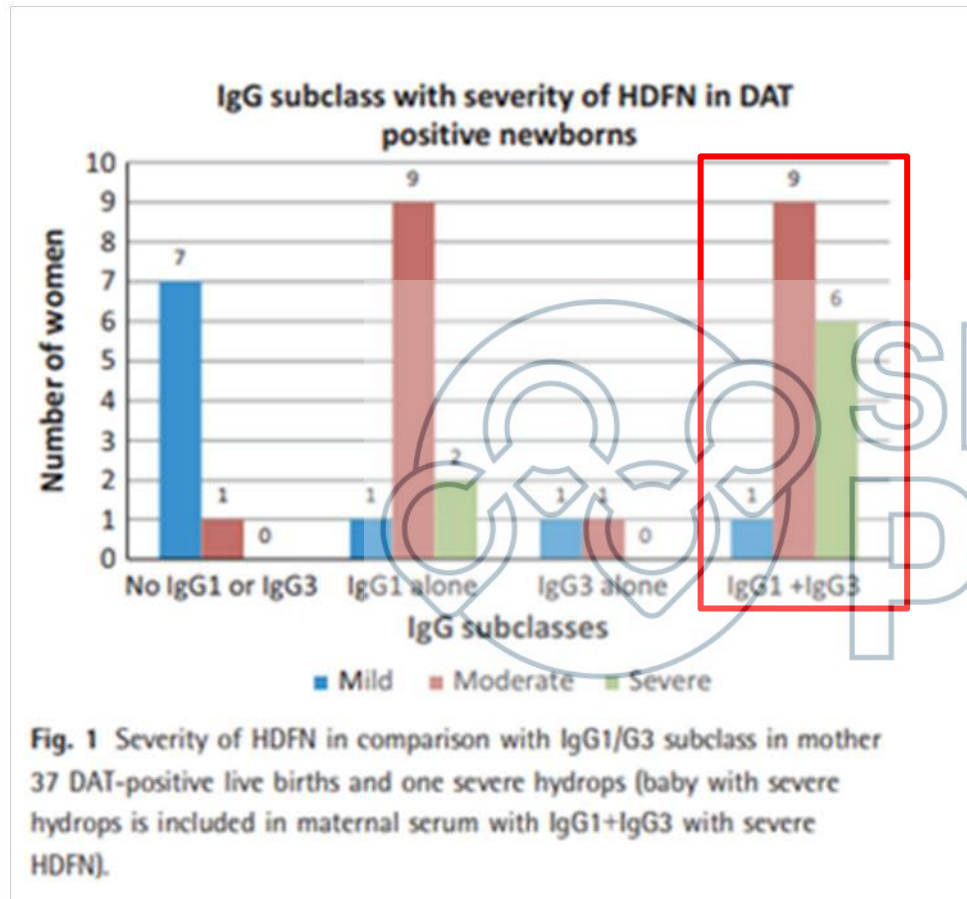
- **Reattivi a 37 °C e/o in Coombs (IgG immuni) diretti vs antigeni del sistema Rh, Kell, Kidd, Duffy, MSs, Diego ..**

Specificità anticorpale

Specificità	Classe Ig	Temperatura Reazione	Grado MEFN
Anti-D	IgG	-37°C- IAT	Lieve a severa
Anti-C	IgG	-37°C- IAT	Lieve
Anti-c	IgG	-37°C- IAT	Lieve a severa
Anti-E	IgG	-37°C- IAT	Moderata
Anti-e	IgG	-37°C- IAT	Rara, lieve
Anti-Cw	IgG/IgM	22-37°C- IAT	Lieve a moderata
Anti-G	IgG	IAT	No a severa
Anti-K	IgG	IAT	Lieve a severa
Anti-k	IgG	IAT	Lieve a severa (rara)
Anti-Kp ^a	IgG	IAT	Lieve a severa
Anti-Kp ^b	IgG	IAT	Lieve a moderata
Anti-Js ^a	IgG	IAT	Lieve a severa
Anti-Js ^b	IgG	IAT	Lieve a severa
Anti-Fy ^a	IgG	IAT	Lieve a severa (rara)
Anti-Fy ^b	IgG	IAT	Lieve (rara)
Anti-Jk ^a	IgG	IAT	Lieve a moderata(rara)
Anti-Jkb	IgG	IAT	No a lieve (rara)
Anti-M	IgM/IgG	4-22°C	No. raramente severa
Anti-N	IgM	4-22°C	No
Anti-S	IgG	22°C- IAT	No a severa (raro)
Anti-s	IgG	IAT	No a severa (raro)
Anti-U	IgG	IAT	Lieve a severa

Specificità	Classe Ig	Temperatura Reazione	Grado MEFN
Anti-Lu ^a	IgM/IgG	22°C- IAT	No a lieve, rara
Anti-Lu ^b	IgG	22°C- IAT	Lieve
Anti-Le ^a	IgM	4-22-37°C- IAT	No
Anti-Le ^b	IgM	4-22-37°C- IAT	No
Anti-Pl	IgM	4-22°C	No
Anti-Di ^a	IgG	IAT	Lieve a severa
Anti-Di ^b	IgG	IAT	Lieve
Anti-Yt ^a	IgG	IAT	No
Anti-Yt ^b	IgG	IAT	No
Anti-Sc1	IgG	IAT	TAD+, no MEFN
Anti-Sc2	IgG	IAT	TAD+, no a lieve
Anti-Co ^a	IgG	IAT	Lieve a severa (rara)
Anti-Co ^b	IgG	IAT	Lieve
Anti-Do ^a	IgG	IAT	TAD+, no MEFN
Anti-Do ^b	IgG	IAT	TAD+, no MEFN
Anti-Jr ^a	IgG	IAT	TAD+, no MEFN a severa
Anti-Lan	IgG	IAT	No a lieve
Anti-V	IgG	IAT	No
Anti-Vel	IgG	IAT	DAT+ a severa
Anti-PP1Pk	IgM/IgG	4°-22-37°C- IAT	No a severa
Anti-Ge3	IgG/IgM	IAT	TAD+ a severa
Anti-Wr ^a	IgM/IgG	22°C- IAT	Lieve a severa
Anti-Wr ^b	IgM/IgG	IAT	TAD+, no MEFN
Anti-Ch/Rh	IgG	IAT	No
Anti-JMH	IgG	IAT	No
Anti-Kn ^a	IgG	IAT	No
Anti-Cr ^a	IgG	IAT	No
Anti-Mia	IgG	IAT	Lieve a severa

SOTTOCLASSI IgG



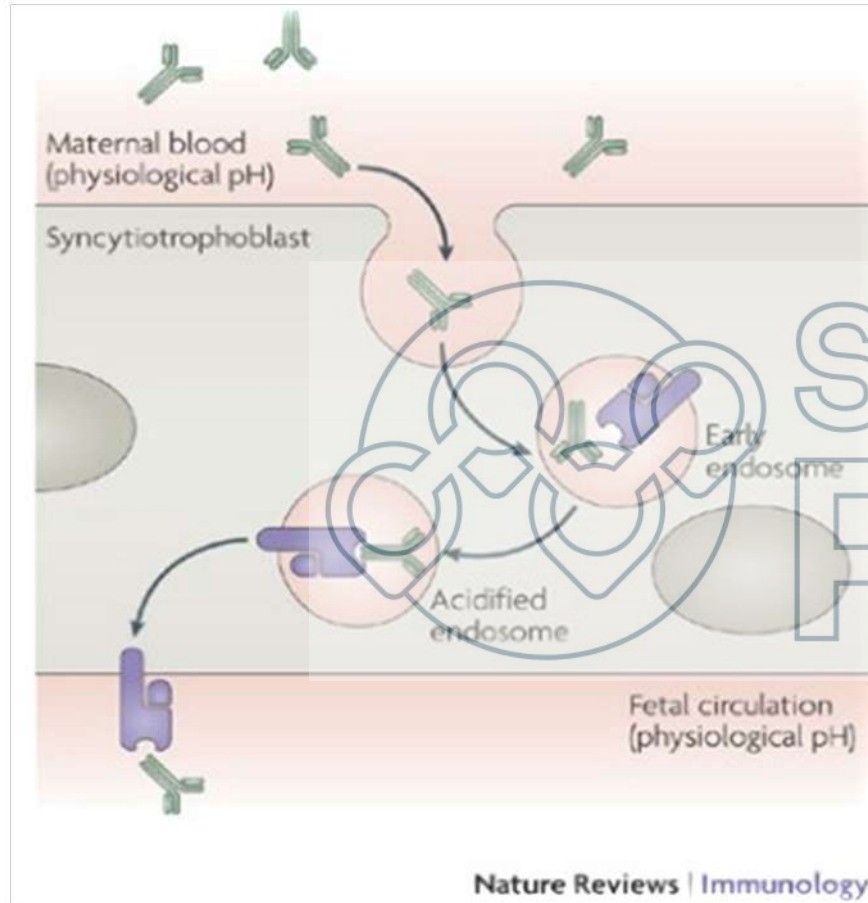
**IgG1 e IgG3
più emolitiche
di IgG2 e IgG4**



**IgG1 + IgG3
> rischio di
MEFN severa**

Choudhuri et al. *Clinical impact and prevalence of IgG1 and IgG3 subclasses in antenatal alloimmunized women: experience from a tertiary medical centre in South India* ISBT Science Series (2016) 11, 58–61

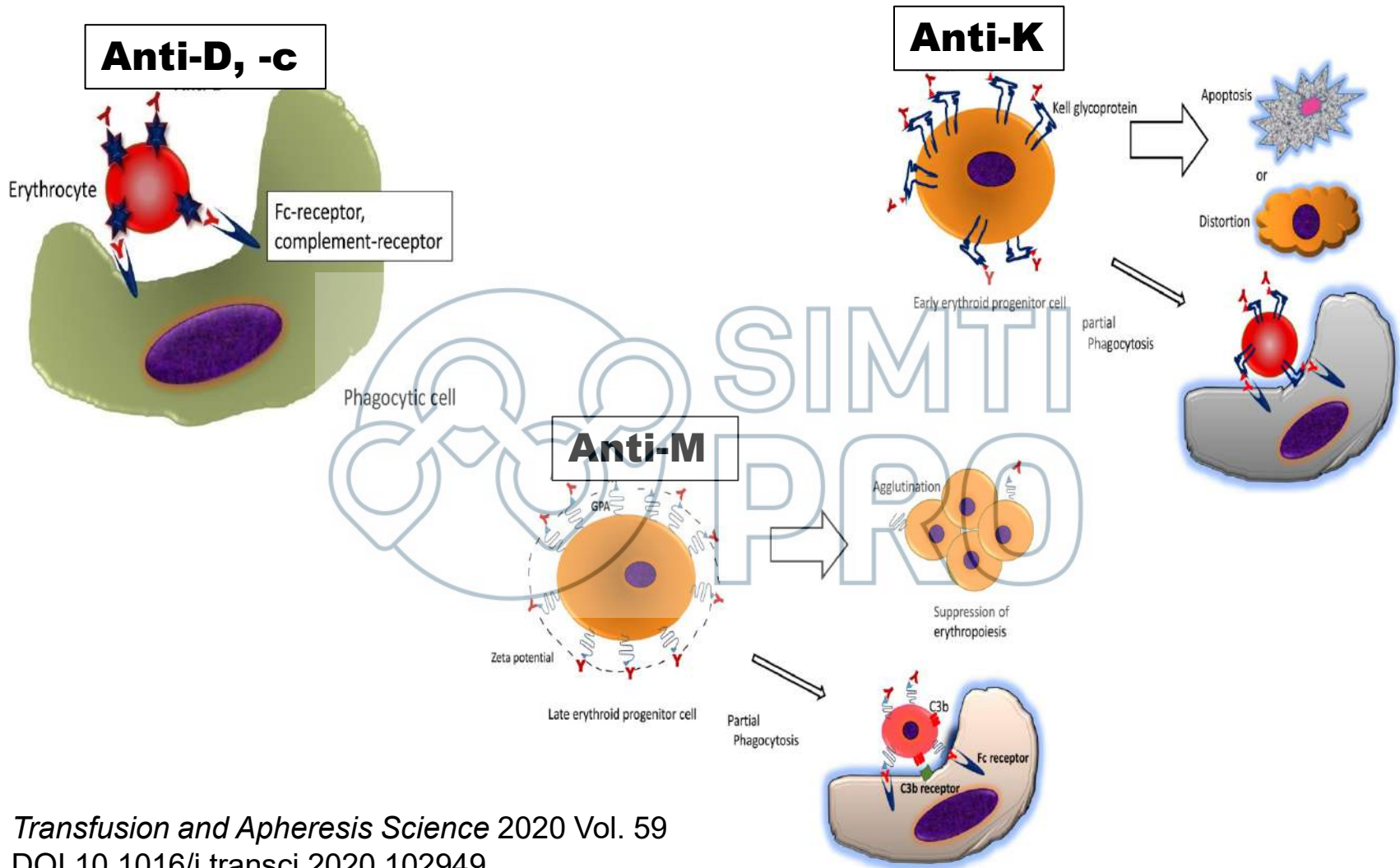
PASSAGGIO IgG MATERNE NEL CIRCOLO FETALE



Il passaggio transplacentare delle IgG è un *processo attivo*

Il titolo anticorpale fetale può essere più elevato di quello materno

MECCANISMI PATOGENETICI MEFN



Transfusion and Apheresis Science 2020 Vol. 59
DOI 10.1016/j.transci.2020.102949

TIPIZZAZIONE PARTNER

Definizione zigosità paterna

- **RhD**: analisi molecolare (PCR)
- **CcEe, Kell, Kidd, Duffy**: tipizzazione sierologica

- **Omozigosi e paternità certa**: RISCHIO CERTO DI MEFN
- **Eterozigosi o assetto Ag sconosciuto e/o incerto**:
genotipizzazione fetale (PCR) su *cffDNA* da plasma materno

TITOLAZIONE ANTICORPALE

Tecnica semi-quantitativa necessaria per valutare la «concentrazione» e «forza» di un anticorpo nel siero materno

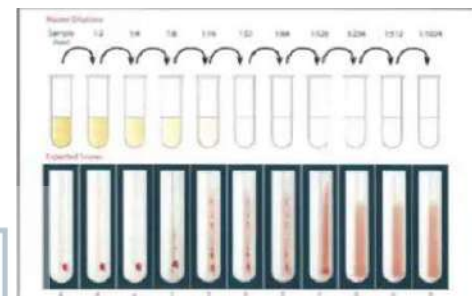
Decidere quando iniziare il monitoraggio strumentale del feto

Avviare la donna a specifici programmi terapeutici della MEFN

TECNICHE DI TITOLAZIONE

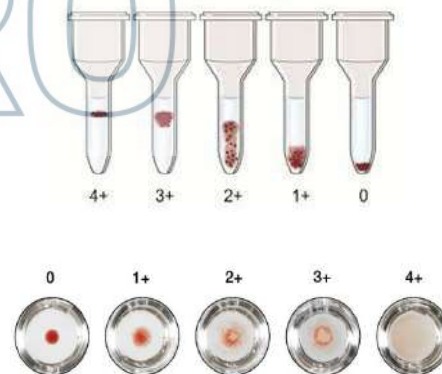
METODICA STANDARD

Fase liquida (provetta) con incubazione di 1 ora a 37°C senza mezzi potenzianti



Altre metodiche

- **Microcolonna**
- **Micropiastra**



MICROCOLONNA O MICROPIASTRA

VANTAGGI:

- Maggiore sensibilità
- Gestione su piattaforma automatizzata
- Minore variabilità intra-operatore
- Riduzione dei tempi

SVANTAGGI:

- Risultati di titolazioni più elevati (in genere di 1 o 2 diluizioni), specie per anticorpi immuni a titoli più alti
- Necessità di ridefinire la soglia critica

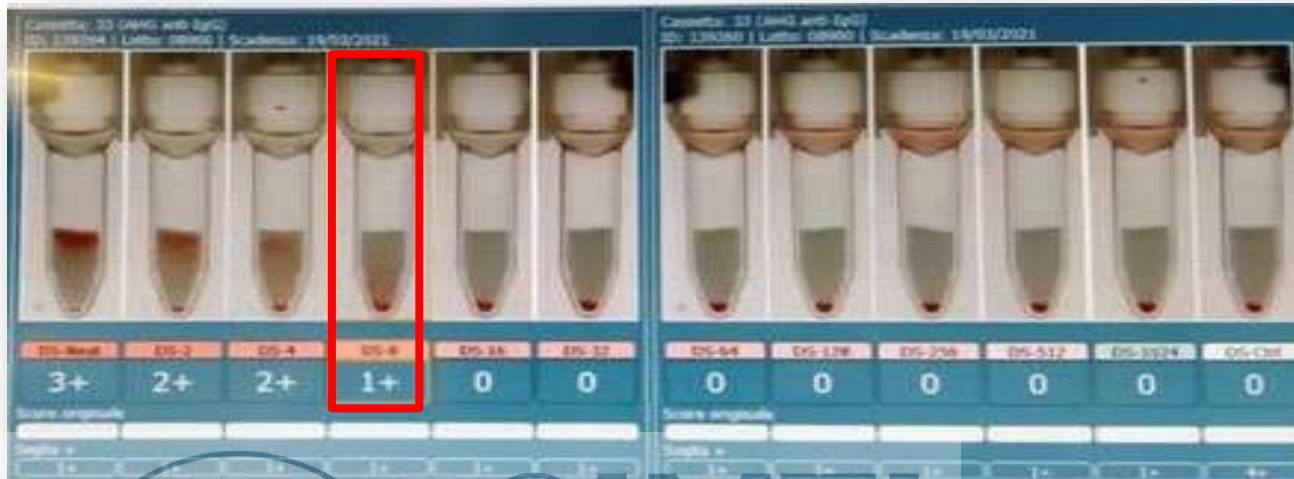
MISURAZIONE DEL TITOLO

Il titolo è espresso come il reciproco della diluizione del siero o plasma con end-point 1+ o come titre score (TS)



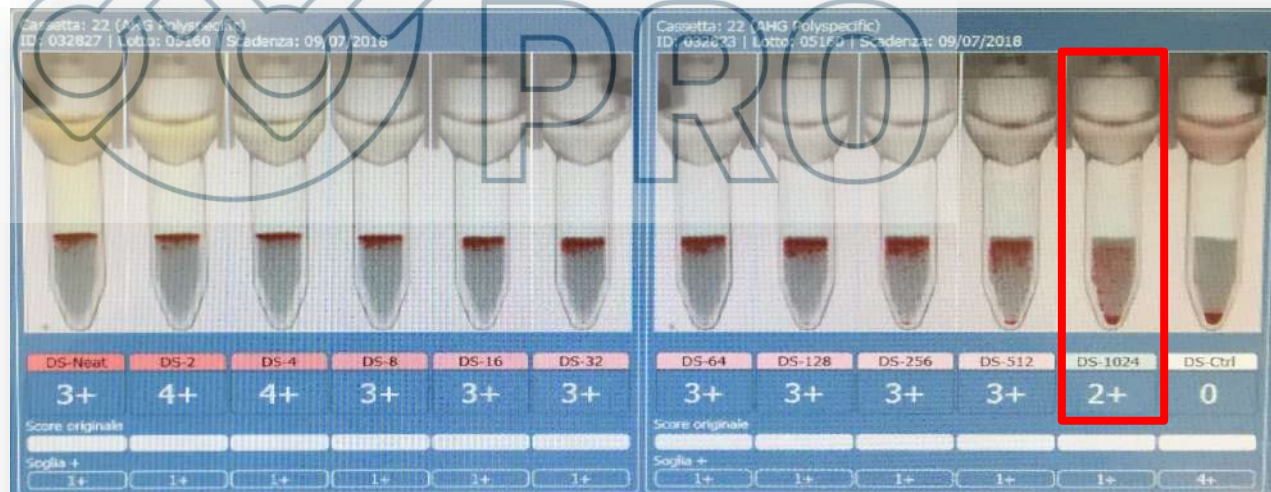
Reaction grade	Titre Score (TS)
4+	12
3+	10
2+	8
1+	5
+/-	3
0	0

Es. 1



Titolo 8 -> TS 31

Es. 2



Titolo 1024 -> TS 114

ESECUZIONE DEL TITOLO

**TITOLAZIONE IN PARALLELO CON IL CAMPIONE PRECEDENTE
(stessa metodica - stessa tipologia di campione)**



Stesso end-point (1+)

Emazie test con uguale zigosità (per anti-D -> emazie D-eterozigoti R1r/R2r)

Miscele anticorpali (ad es. anti-K + -Fy^a -> emazie K- e Fy (a+b+) e K+k+ e Fy (a-))

**Antigeni a bassa incidenza
-> emazie paterne**



SIGNIFICATO DEL TITOLO

Il «LIVELLO CRITICO» del titolo è quello associato ad un rischio significativo di anemia (moderata/severa) ed idrope fetale



Sono «critici» titoli IgG ≥ 32 , ad eccezione anti-K (già pericoloso per titoli ≥ 8 o inferiori)

Con TAI score $< 3+$ in colonna, la titolazione è quasi sempre < 4 e quindi non «dovrebbe» essere eseguita



MONITORAGGIO DEL TITOLO



- **Ogni 4 sett. (fino alla 18 sett.)**
- **Ogni 2 sett. (dalla 18 sett.):**
 - *Valori del titolo*
 - *Grado di compromissione fetale*

Il repentino aumento del titolo impone un monitoraggio immunoematologico ed una sorveglianza fetale più frequenti (intervalli <2 sett.)

REFERTAZIONE

1. Anamnesi

2. Metodica

3. Risultati con riferimento scritto a **scores (TAI)**,
rilevanza clinica e valori del titolo anticorpale

4. Conclusioni con indicazione eventuale al follow-up
ostetrico e al timing dei controlli immunoematologici



SORVEGLIANZA FETALE

Dalla 18 sett. **ecografia fetale** ed **ecodoppler**
con misurazione MCA-PVS

- *Livello anticorpale critico*
- *Repentini aumenti del titolo*
- *Incrementi di più di una diluizione*



**Ecografia
fetale**

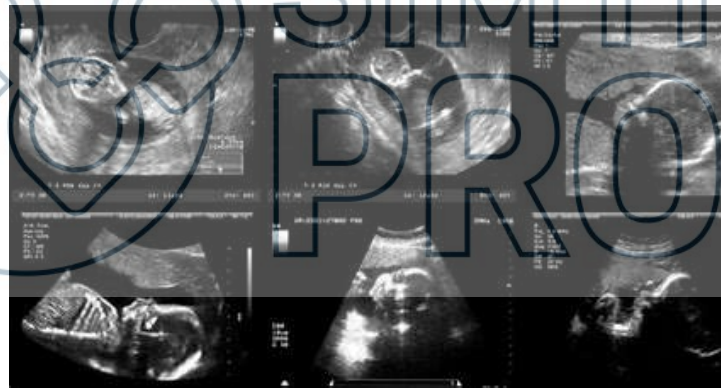


**Doppler MCA-
PVS**

ECOGRAFIA FETALE

Rilevazione segni indiretti di anemia

- ***Versamento pleurico e/o peritoneale e/o edema sottocutaneo***
- ***Idrope fetale***
- ***Edema placentare***
- ***Epatosplenomegalia***
- ***IUGR***
- ***Alterazioni flussimetriche (Doppler) alla misurazione del picco di velocità sistolica (PVS) dell'arteria cerebrale media (MCA)***



ECODOPPLER (MCA-PVS)

Esame di elezione per valutare, in anticipo sui segni di idrope fetale, il grado di anemizzazione fetale (rischio di anemia fetale per valori di picco sistolico in MCA $>1,5$ volte la mediana per epoca di gravidanza)

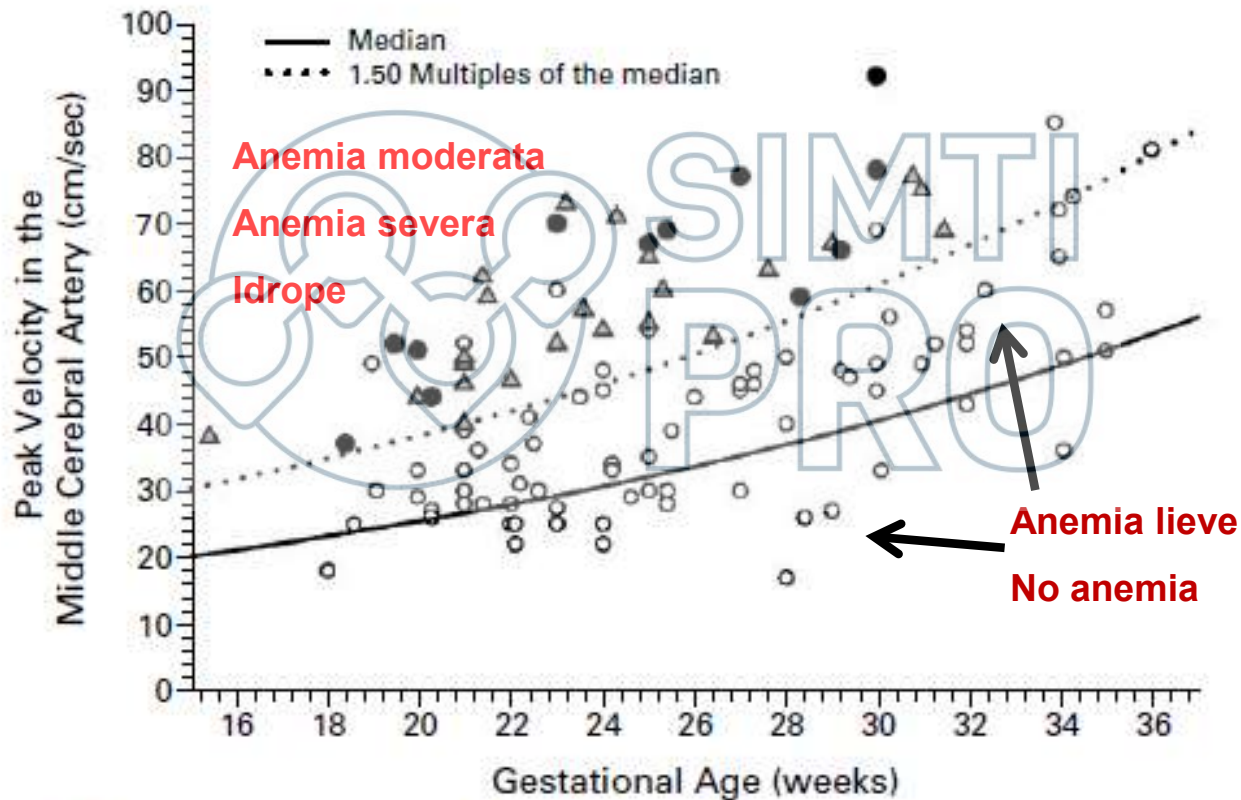


Figure 3. Peak Velocity of Systolic Blood Flow in the Middle Cerebral Artery in 111 Fetuses at Risk for Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization.

SORVEGLIANZA FETALE (MCA-PVS)

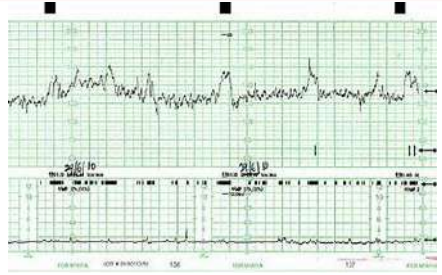
Settimane di gestazione	18	25 26	34 35	40
-------------------------	----	-------	-------	----



1-3 sett. 1-2 sett. 4-10 giorni



**Monitoraggio mediante
CARDIOTOCOGRAFIA (1/sett)**



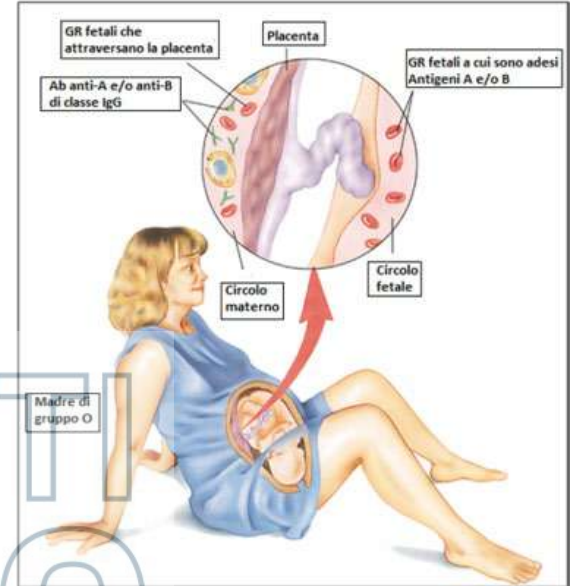
AFFIDABILITÀ LIMITATA



Velocimetria doppler

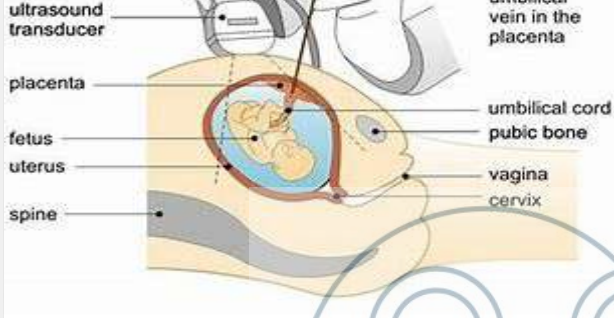
MEN ABO

- **Non è una malattia fetale**
- **Non é prevenibile né prevedibile.**
- **Madre O/neonato A1 o B**
- **Alti titoli IgG anti-A/B (spesso IgG₂)**
- **TCD neonato pos (a volte neg!!)**
- **Ricerca, titolazione post-partum IgG anti-A/B**
- **Eluizione IgG anti-A/B.**
- **Ittero variabile per intensità e comparsa (spesso più tardivo) + anemia di media gravità**
- **Terapia: quasi sempre solo FTT; rara ET (1-2%).**



TERAPIA MEFN

TIV



PEX e IVIg RIDUCONO LA NECESSITÀ DI TIV

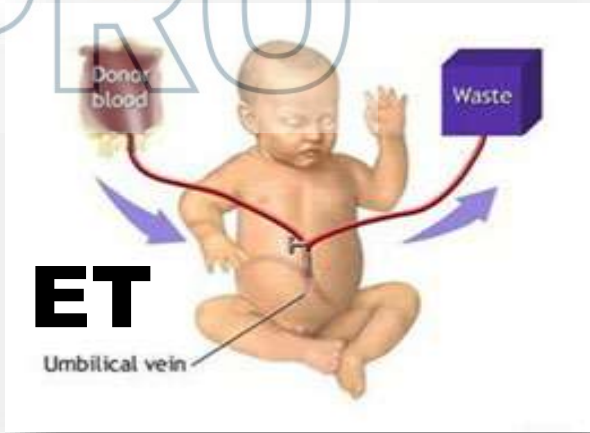


SIMTI PRO

FTT



ET



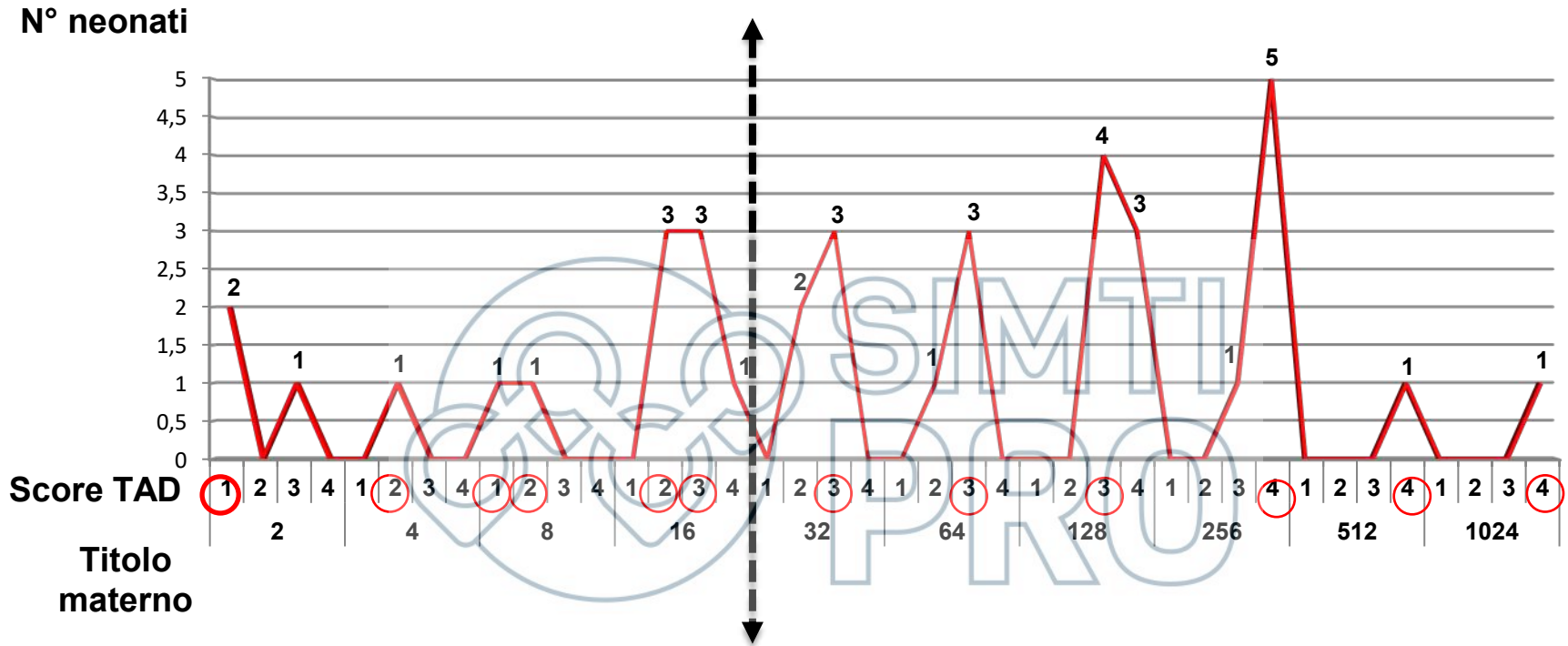
MEFN Simt Lecce 2005-2023 (N° 45 casi)

Ab	Titolo Ab	MCA-PVS	TIV	TAD	FTT	ET	ECF	IVIg	MEFN
D	8	Neg	NO	POS 2	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	16	Neg	NO	POS 2	SI (4 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	16	Neg	NO	POS 3	SI (2 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
D	32	Neg	NO	POS 2	SI (2 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	32	Neg	NO	POS 2	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
D	32	Pos	NO	POS 3	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	32 -> 4	Pos	NO	POS 2	NO	NO	SI (1)	NO	SEVERA
D	64	Neg	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
D	128	Pos	NO	POS 4	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	128	Neg	NO	POS 3	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	128	Pos	NO	POS 3	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	128	Pos	NO	POS 3	SI (2 gg)	NO	SI (1)	NO	SEVERA
D	256	Neg	NO	POS 4	SI (5 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	256	Neg	NO	POS 4	SI (2 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	512	Neg	NO	POS 4	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
D	1024	Pos	NO	POS 4	SI (4 gg)	SI (1)	NO	SI	SEVERA
D	2048	Pos	SI	NEG	SI (6 gg)	SI (1)	SI (1)	SI	SEVERA
c	128	Neg	NO	POS 4	SI (5gg)	NO	SI (3)	SI	SEVERA
c	256	Pos	NO	POS 3	SI (2 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
c	256	Pos	NO	POS 4	SI (4 gg)	SI (1)	SI (1)	SI	SEVERA
c	256	Neg	NO	POS 4	SI (4 gg)	SI (1)	NO	SI	SEVERA
c	1024	Neg	NO	POS 4	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA

MEFN Simt Lecce 2005-2023 (N° 45 casi)

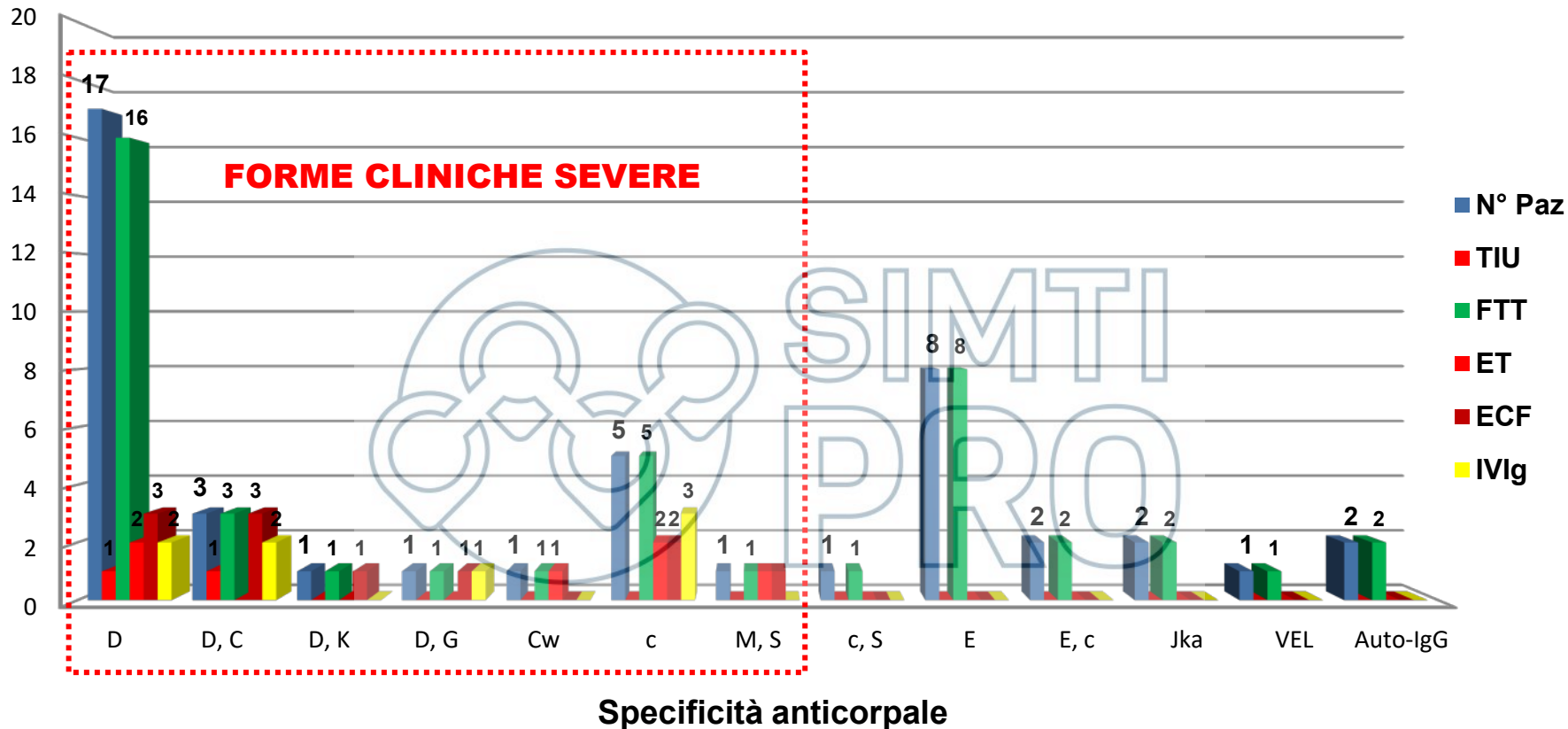
Ab	Titolo Ab	MCA-PVS	TIV	TAD	FTT	ET	ECF	IVlg	MEFN
E	NO (TCI <3+)	NO	NO	POS 3	SI (2 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	NO (TCI <3+)	NO	NO	POS 1	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	16	NO	NO	POS 4	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	16	NO	NO	POS 2	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	16	NO	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	32	Neg	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	32	Neg	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E	64	Pos	NO	POS 2	SI (2 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
C ^w	128	Pos	NO	POS 3	SI (5gg)	SI (1)	NO	NO	SEVERA
JK ^a	NO (TCI <3)	NO	NO	POS 1	SI (3 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
JK ^a	8	NO	NO	POS 1	SI	NO	NO	NO	LIEVE
Vel	4	NO	NO	POS 2	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
D, C	32, 8	Neg	NO	POS 3	SI (7gg)	NO	SI (2)	SI	SEVERA
D, C	256, 4	Neg	SI	NEG	SI (25 gg)	NO	SI (6)	SI	SEVERA
D, C	256, 16	Neg	NO	POS 4	SI (9 gg)	NO	SI (2)	NO	SEVERA
D, G	2048, 2	Pos	NO	POS 4	SI (16 gg)	NO	SI (2)	SI	SEVERA
D, K	8, 16	Pos	NO	POS 3	SI (4 gg)	NO	SI (1)	NO	SEVERA
c, S	16, 4	Neg	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	MODERATA
E, c	8, 1	NO	NO	POS 2	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
E, c	64, 4	Pos	NO	POS 4	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
M, S	32, 16	Pos	NO	POS 3	SI (7 gg)	SI (1)	SI (1)	NO	SEVERA
Auto-IgG	16	NO	NO	POS 2	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE
Auto-IgG	64	Pos	NO	POS 3	SI (1 gg)	NO	NO	NO	LIEVE

Titolo (specificità singola) e TAD score



Specificità e severità clinica

N° neonati



TITOLO ANTICORPALE



❑ **MEN non-ABO**

Fondamentale perché in grado di predire il rischio di anemia fetale ed aiutare il clinico nel prendere una decisione su quando iniziare il monitoraggio del feto con mezzi strumentali

✓ **Correla con la positività del TCD (a titoli più elevati corrispondono TCD positivi con scores di reattività più alti)**

✓ **Permette il monitoraggio del «movimento anticorpale» dopo eventi potenzialmente immunizzanti e durante la gravidanza (passaggio transplacentare delle IgG dalla 18°-20° sett. e al termine della gravidanza)**

❑ **MEN ABO**

✓ **Il titolo non sempre è correlato con la severità del quadro clinico ma un titolo elevato è predittivo di MEN**

✓ **NON raccomandata in gravidanza la ricerca e titolazione IgG anti-A/B (la MEN ABO non è una malattia fetale!!)**



..... non solo TITOLO ANTICORPALE

Forme gravi di MEN possono essere correlate a titoli anticorpali elevati ma la severità del quadro clinico dipende in particolare da:

- **Specificità anticorpale**
- **Sottoclasse IgG (IgG₁ e IgG₃)**
- **Presenza di miscele anticorpali pericolose (ad es. D+C, D+K)**
- **Struttura e densità dell'antigene in causa**
- **Storia ostetrico/ginecologica della gestante**
- **Altri fattori (maturità funzionale della milza, influenza delle citochine)**



**Outcomes favorevoli soltanto se ottenuti
in modalità “TEAM WORK”**

