

INCONTRO DI AGGIORNAMENTO IN
MEDICINA TRASFUSIONALE

EMOMETRIA IN MEDICINA TRASFUSIONALE E MANIPOLAZIONE CELLULARE

Atti del Convegno, 10 marzo 2010, Roma



Con il patrocinio di:



SIMTI



SIDEM

Evento promosso da HORIBA Medical

INCONTRO DI AGGIORNAMENTO IN
MEDICINA TRASFUSIONALE

**EMOMETRIA
IN MEDICINA TRASFUSIONALE
E MANIPOLAZIONE CELLULARE**

Atti del Convegno

10 marzo 2010, Roma

Nel 2007 Horiba Medical Italia ha costruito una preziosa collaborazione con SIMTI e SIdEM Lazio per la realizzazione di un progetto sull'Emometria in pre-donazione su sangue capillare per la selezione e la gestione del donatore.

Nel corso dei due precedenti eventi patrocinati dalle due Società Scientifiche, un gruppo di lavoro si è adoperato per definire delle Linee di Indirizzo Regionali sugli intervalli di accettabilità delle conte emometriche nel donatore di sangue.

Allo scopo di promuovere una valida riflessione sugli esiti dell'adozione di tale strategia e valutare i risultati dell'introduzione di questa indagine pre-donazionale, è stato realizzato un nuovo incontro rinnovando l'impegno nel proseguire il percorso iniziato insieme a SIMTI e SIdEM Lazio.

Inoltre, visto il crescente interesse nascente intorno alla ricerca nel campo della Terapia Cellulare, in questa occasione è stata dedicata una sessione all'Emometria nell'ambito della Manipolazione Cellulare, nella quale sono stati mostrati studi di valutazione per il raggiungimento di standard di qualità nei laboratori di processazione cellulare.

APPLICAZIONE DELLE LINEE DI INDIRIZZO REGIONALI PER GLI INTERVALLI EMOMETRICI DI IDONEITÀ PER LA SELEZIONE DEL DONATORE E LA VALIDAZIONE DELLE UNITÀ RACCOLTE

M. Miceli

SIMT- DMT "Roma Ovest" AO S. Camillo-Forlanini

Premessa

Le alterazioni dei diversi parametri emometrici forniscono preziosi elementi diagnostici e prognostici su eventuali stati morbosi di organi e apparati, espressione di una emopatia primitiva o di una patologia non ematologica. Un importante criterio di orientamento è anche l'entità e la durata dell'anomalia numerica. La legislazione vigente in ambito trasfusionale prevede l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico ad ogni donazione senza obbligo di valutazione dei suoi parametri ai fini della validazione biologica degli emocomponenti. Tuttavia questi valori rappresentano degli indicatori di riferimento per l'intero processo trasfusionale. A sostegno di ciò nel 2007 la SIMTI Lazio e la SIDEM in una Consensus Conference hanno proposto delle linee di indirizzo regionali, al fine di definire ed uniformare i parametri di riferimento per l'arruolamento del donatore e la qualificazione biologica degli emocomponenti. Questo lavoro raccoglie ed analizza i dati riferiti al 2009 e relativi ai parametri emometrici utilizzati secondo tali linee.

Strutture partecipanti alla raccolta dati:

- SIMT A.O. S.Camillo-Forlanini
- SIMT Policlinico Umberto I°
- SIMT O. Pediatrico Bambino Gesù
- SIMT Policlinico Tor Vergata
- SIT IFO-Regina Elena
- SIMT A.O. S.Giovanni Addolorata

LINEE DI INDIRIZZO

Selezione del donatore	Globuli bianchi
Hb (g/dL)	LEUCOCITI (x 10 ⁶ /ml)
Femmina: $\geq 12.5 \leq 17.5$	$\geq 3.0 \leq 12.0$
Maschio : $\geq 13.5 \leq 17.5$	NEUTROFILI (x 10 ⁶ /ml)
MCV (fl)	$\geq 1.0 \leq 8.5$
$\geq 80 \leq 100$	LINFOCITI (x 10 ⁶ /ml)
eccezione trait-talassemico	$\geq 1.0 \leq 4.5$
	MONOCITI (x 10 ⁶ /ml)
Validazione unità	≤ 1.0
Hb (g/dL)	EOSINOFILI (x 10 ⁶ /ml):
Femmina: $\geq 11.5 \leq 17.0$	≤ 1.5
Maschio : $\geq 12.5 \leq 18.0$	BASOFILI (x 10 ⁶ /ml)
MCV (fl)	≤ 0.2
$\geq 75 \leq 100$	
eccezione trait-talassemico	

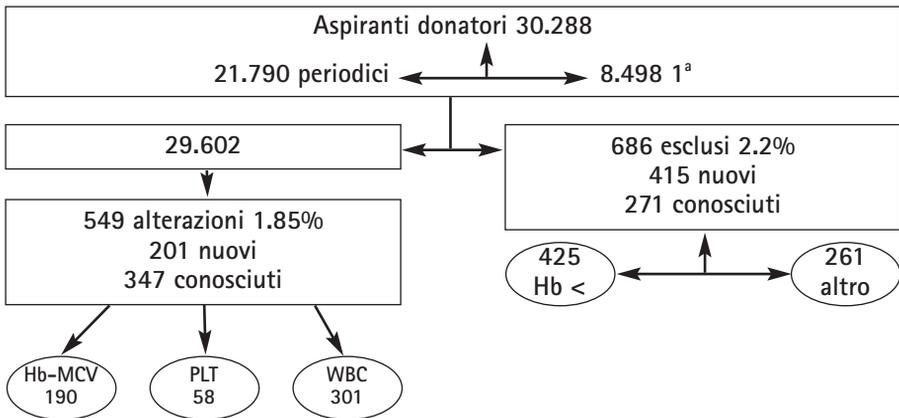
Materiali e metodi

Delle 6 ST laziali partecipanti, in pre-donazione 2 hanno effettuato il dosaggio della sola Hb (HEMOCUE), le rimanenti hanno eseguito l'emocromo completo su sangue capillare sul sistema emometrico ABX Micros 60 (HORIBA ABX). Tutte hanno effettuato l'esame completo post-donazione con rilevazione dei parametri indicati dalle linee guida ed è stato eseguito il CQ dell'emocomponente per valori < alla norma di Hb ed MCV secondo le indicazioni della R 95/15 13 ed.

4

Risultati

Sono stati analizzati gli emocromi di 30.288 donatori, di cui 686 esclusi in fase pre-donazione: 425 per Hb < alla norma e 261 per alterazione di altri parametri. L'analisi dei 29.602 donatori reclutati, mostra che: bassi valori dell'Hb escludono il 75% delle unità di EC mentre bassi valori di MCV rendono trasfondibile il 83% delle unità di EC; le alterazioni relative alle popolazioni dei globuli bianchi si riscontrano più frequentemente nelle raccolte sulle UM dove, per la selezione, non viene eseguito l'emocromo completo; le alterazioni della conta piastrinica non confermate da ulteriori controlli sono presumibilmente imputabili a difficoltà nel prelievo, al ritorno di anticoagulante al campione, alla presenza di microcoaguli per insufficiente agitazione del campione. Dei 149 donatori che hanno effettuato un emocromo di controllo dopo adeguato intervallo, 108 hanno mostrato miglioramento/risoluzione dell'alterazione, 41 hanno mantenuto i parametri fuori range e in questi casi sono stati richiesti approfondimenti specifici.



Hb g/dL	17.0 < Hb < 18.0	11.5 < Hb < 12.5	Esito CQ Hb unità
	3	70*	17 valide 53 eliminate

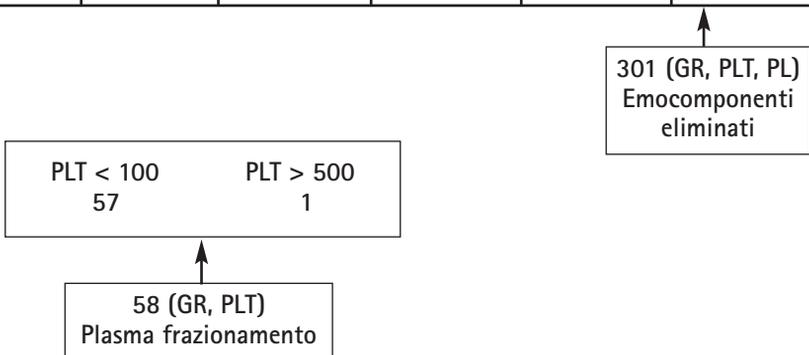
*Esecuzione CQ unità

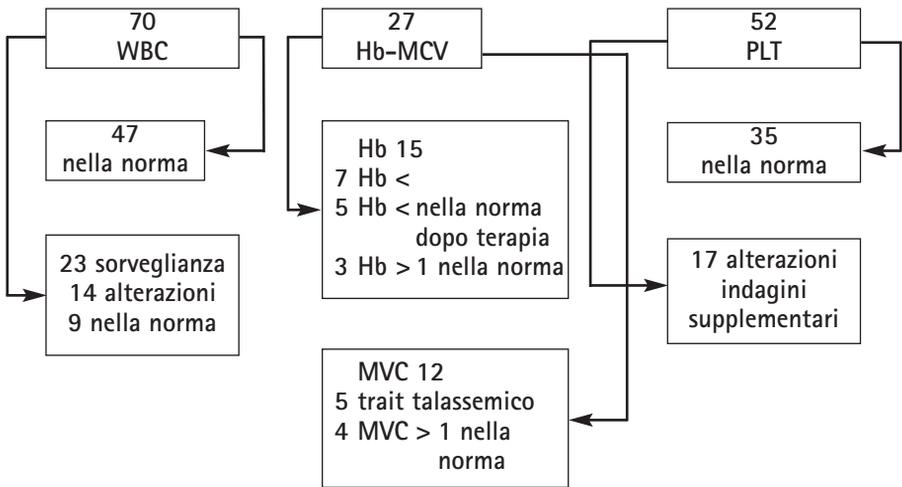
MCV fL	MCV > 100	MCV < 75	Esito CQ Hb unità
	19	98*	82 valide 16 eliminate

Alterazioni Multi parametriche	WBC > 12.000* < 3.000^	NEU# > 8.500 * < 1.000 ^	LYM# > 4.500 * < 1.000 ^	MON# > 1.000	EO# > 1.500
100* 6^	55* 6^	29* 2^	33 * 34^	24*	12*

* Valori >

^ Valori <





Conclusioni

Da questi dati emerge che una semplice anomalia dei parametri emometrici può consentire un generico ma tempestivo inquadramento diagnostico già a livello della selezione del donatore: due patologie ematologiche importanti tuttora in trattamento e altre sindromi in osservazione. La valutazione di laboratorio dei singoli parametri riferiti ai diversi emocomponenti consente di individuare elementi di qualità ed efficacia dei prodotti da assegnare.

SISTEMA EMOMETRICO MULTIPARAMETRICO SU SANGUE CAPILLARE

D. Patti
Horiba Medical, Italia

Premessa

L'esame emocromocitometrico viene indicato come un'analisi da eseguire ad ogni dono sul donatore di sangue ed emocomponenti con la valenza di un esame obbligatorio a protezione dello stato di salute del donatore in corso di arruolamento.

Il processo di arruolamento del donatore di sangue è solitamente basato sulla valutazione univoca dell'emoglobina (Hb) su sangue capillare, mentre i donatori di piastrinoaferesi che necessitano della valutazione della conta piastrinica (Plt) devono avvalersi di un'analisi emometrica multiparametrica attraverso venopuntura. La valutazione estemporanea monoparametrica del dosaggio della sola Hb, impedisce una selezione accurata del donatore; non prevedendo l'analisi di tutti i parametri, non si preserva il donatore da una donazione effettuata in condizioni ematologiche non note e/o sub-ottimali.

In tale contesto, la valutazione della sola concentrazione emoglobinica non fornisce alcun parametro aggiuntivo circa lo stato morfologico degli eritrociti, circa le alterazioni della componente leucocitaria e della conta piastrinica; alterazioni in questo ambito dovrebbero portare ad un approfondimento clinico e all'esclusione temporanea dal dono.

In questo contesto sono state valutate le performances del sistema emometrico ABX Micros 60, un analizzatore ematologico portatile che consente la determinazione di un emocromo completo con l'utilizzo di 10 µl di sangue capillare.

Materiali e metodi

In questo studio sono stati analizzati 549 donatori.

Il sangue capillare è stato analizzato su ABX Micros 60 (HORIBA ABX) e su emoglobinometro HaemoCue.

I campioni di sangue venoso sono stati raccolti dal sampling-site del bag-system di raccolta di sangue intero o dalla linea di prelievo del sistema aferetico, ed analizzati su AcT 5diff (Beckman-Coulter) come sistema di riferimento con screening della formula leucocitaria a 5 popolazioni e su ABX Micros 60.

Sul sistema in studio, la determinazione quantitativa dei WBC avviene per Impedenza (analisi volumetrica), successivamente ad un processo di lisi selettiva a carico dei reagenti che agiscono sulle membrane citoplasmatiche determinando una differen-

ziazione leucocitaria a 3 sottopopolazioni (3 part DIFF): Linfociti (% e #), Mononucleari (% e #), Granulociti (% e #).

Un sistema di flag è dedicato all'analisi dei WBC. Specifici allarmi corrispondono alla percentuale di elementi basofili ed eosinofili contati in un'area determinata rispetto al numero di granulociti. In tale contesto, la comparazione dell'analisi differenziale leucocitaria è stata limitata alla sola popolazione linfocitaria in assoluto e percentuale.

È stata analizzata una prima serie di 413 donatori arruolati in un arco di tempo di 20 giorni (profilo emometrico completo su sangue capillare); i primi 161 campioni di sangue capillare sono stati processati anche su HaemoCue (valutazione monoparametrica per Hb).

Variable	Obs	Mean	Std.De.	Min	Max	Mean Diff.
emoglobino~o	161	15.17	1.08	12.6	17.2	
Micros	161	14.81	0.98	12.2	16.8	-0,36
AcT 5diff	161	14.80	0.98	11.5	17.3	-0,37

Per 254 casi l'emocromo su sangue venoso è stato analizzato anche su ABX Micros 60. In tutti i casi i campioni di sangue venoso sono stati processati sul sistema di riferimento.

È stata analizzata una seconda serie di 136 donatori dopo introduzione in routine di 3 mesi del sistema in studio.

Risultati

L'emoglobinometro sovrastima il valore dell'Hgb in media di 0,36 unità rispetto allo strumento in studio su sangue capillare e di 0,37 unità rispetto al sistema di riferimento su sangue venoso.

Nella serie in studio di 254 donatori è stato analizzato l'allineamento tra le conte ottenute da Micros 60 su sangue capillare e sistema di riferimento su sangue venoso in termini di mean differences e correlation coefficient: WBC (0,24; $r=0,91$), RBC (-0,04; $r=0,94$), Hb (-0,1; $r=0,94$), Hct (-0,32; $r=0,90$), Plt (-31,65; $r=0,84$) anticipando i risultati dell'intera serie presa in esame.

L'analisi comparativa ed i test di regressione lineare sulla serie di 413 donatori hanno generato dati ad elevatissima correlazione e differenze medie tra le conte mai clinicamente rilevanti, fatta eccezione per il parametro della conta piastrinica dove, nel prelievo da sangue capillare è emersa una sottostima di circa $37 \times 10^9/L$ che si ridu-

ce a $10 \times 10^9/L$ nella seconda serie di dati derivati dall'analisi di 136 donatori dopo introduzione in routine di 3 mesi del sistema in studio.

ABX Micros 60 capillary (study)							AcT 5diff Coulter (reference)						
Param	Obs	Mean	SD	CV%	Min	Max	Mean	SD	CV%	Min	Max diff	Mean	r
wbc	413	6,31	1.6	25.36	1,2	13,8	6.13	1.48	24,14	2,83	12.04	0,18	0.91
rbc	413	5,09	0.4	7.86	3,85	6.31	5.02	0.41	8.17	3,61	6.21	0,07	0.91
hb	413	14.87	1.1	7.4	11.6	18,1	14.78	1.00	6.77	11.5	17.5	0.09	0.89
ht	413	43.24	3.1	7.17	34	52,8	42.89	2.93	6.83	33	51.7	0.35	0.87
mcv	413	85.09	3.5	4.11	72	96	85.65	3,98	4.65	70.2	98.1	-0.55	0.95
mch	413	29.28	1.4	4.78	23.9	33.6	29.52	1.44	4.88	23.8	33.8	-0.25	0.92
mchc	413	34.39	0.5	1.45	32,6	36,7	34.47	0.50	1.45	33	35.9	-0.08	0.23
plt	413	195,84	40,5	20,68	108	340	233,73	51.63	22.09	123	428	-37,89	0.82
Ly%	413	35,01	6.9	19.7	12,5	58,5	34.17	7,26	19.34	11,7	52.9	0,84	0.89
lym#	413	2,13	0.6	28,17	0.4	4.3	2.06	0.52	25.24	0.8	4,27	0,07	0.81

ABX Micros 60 (study)						AcT 5diff Coulter (reference)					
Param.	Obs	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	r	Mean diff
plt	136	206.9	45.15	123	386	216.95	46.25	116	393	0,86	-10.05

Sono stati valutati il numero di mancati arruolamenti al dono per criteri di idoneità riguardanti il parametro Hb; di questi vengono esclusi 13 donatori (3.1%) per il sistema di riferimento e 11 di 13 per il sistema in studio.

Considerando il sistema AcT 5diff come gold standard, ABX Micros 60 ha una Sensibilità dell'85% ed una Specificità del 99%.

Sono stati, inoltre, valutati il numero di mancati arruolamenti al dono per criteri di idoneità non riguardanti il parametro Hb; nella stessa serie presa in analisi, sono stati esclusi per parametri non riguardanti l'Hb (WBC, Plt, MCV e formula leucocitaria) 12 donatori pari al 2.9% per il sistema di riferimento e 10 di 12 per il sistema in studio.

Con le stesse premesse di cui sopra, il sistema ABX Micros 60 ha una Sensibilità dell'83% ed una Specificità del 99%.

Conclusioni

L'analisi dei dati relativi all'utilizzo dell'emoglobinometro, ha messo in evidenza una sovrastima dell'Hb > 0,35g/dL.

Nella prima serie di dati studiati è emersa una sottostima sistematica di circa $35 \times 10^9/L$ dovuta alle criticità del prelievo da digitopuntura, che si è ridotta nella seconda serie dopo la dedizione e l'abilità acquisita sul campo dagli operatori del settore.

L'ABX Micros 60 si è dimostrato un sistema emometrico accurato ed affidabile, in grado di generare rapidamente un profilo emometrico multiparametrico da sangue capillare in cui non si sono riscontrate differenze emometricamente significative tra le determinazioni degli stessi parametri effettuate in pre-donazione su sangue capillare ed in post-donazione su sangue venoso, fatta eccezione per il parametro della conta piastrinica che risente della manualità dell'operatore.

I dati ottenuti sono in linea con i risultati di esperienze già pubblicate in letteratura suggerendo l'utilità e l'aspetto costo/efficacia di questo approccio analitico rispetto al comune processo che si avvale di una valutazione uniparametrica della sola Hb in pre-donazione su sangue capillare e la conta completa su sangue venoso a donazione avvenuta.

Con questo tipo di strategia, diventa possibile valutare la crisi ematica del donatore in tempo reale anticipandola, quindi, al momento dell'arruolamento; ciò permetterebbe la momentanea esclusione di soggetti affetti da alterazioni ematologiche reversibili, preservando la disponibilità del donatore con un'esclusione momentanea, e consentendo il recupero e l'avvio alla donazione successivamente al periodo di reversibilità.

Questo studio è stato pubblicato su *Vox sanguinis*: Evaluation of the analytical performances of a portable, 18-parameter hemometric system using capillary blood samples for blood donor enrolment

L. Pierelli,¹ F. Zennaro,¹ D. Patti,² M. Miceli,¹ P. Iudicone¹ & E. Mannella¹

¹*Immunohematology and Blood Transfusion Department Roma Ovest, S. Camillo Forlanini Hospital, Rome, Italy*

²*Horiba ABX Italia, Rome, Italy*

EMOMETRIA E DONAZIONE NELLA REGIONE ABRUZZO: L'ESPERIENZA DEL CRCCS AZIENDA USL DI PESCARA.

A. Iacone – O. Iuliano
SIMT - Ospedale Civile di Pescara

Come previsto dal Decreto Ministero Salute del 05 marzo 2005, l'esame emocromocitometrico pur non essendo un esame imprescindibile per la validazione biologica degli emocomponenti, rientra comunque tra gli esami obbligatori ad ogni donazione. In considerazione del numero e della diversità delle informazioni che questo esame può fornire rispetto alla sola determinazione dei valori emoglobinici da prelievo di sangue capillare, appare evidente come l'esecuzione dell'emocromo in fase pre-donazione rivesta un ruolo fondamentale per la sicurezza di donatore e ricevente.

La determinazione dell'emoglobina (Hb) pre-donazione da digitopuntura è sicuramente un test semplice, economico, rapido, che prevede maggiore compliance da parte del donatore ed è ovviamente finalizzato a "prevenire" stati anemici indotti o aggravati dalla donazione stessa, oltre che per tutelare la salute del donatore, per assicurare prodotti terapeutici adeguati garantendo che ad ogni trasfusione sia somministrata una "dose terapeutica" di emoglobina. Va peraltro sottolineato che una delle principali cause di sospensione temporanea dalla donazione è il rilievo di valori di Hb al di sotto dei limiti stabiliti per la donazione stessa.

Tuttavia tale determinazione resta un'indagine monoparametrica che non consente una valutazione complessiva dello "stato ematologico" del donatore non evidenziando la presenza di possibili problemi attivi, non garantendo quindi un'adeguata tutela del donatore. Peraltro la determinazione eseguita su sangue capillare tende a sovrastimare i livelli di emoglobina, con il rischio reale di accettare alla donazione soggetti che hanno invece valori inferiori al limite stabilito esponendoli al rischio di anemia e compromettendo la qualità dell'emocomponente.

L'esame emocromocitometrico di contro, essendo un'indagine multiparametrica, consente una valutazione più ampia dello stato di salute del donatore e rappresenta un importante strumento di prevenzione e/o diagnosi precoce a vantaggio sia del donatore che del ricevente.

In tal senso, l'esecuzione del suddetto esame in fase pre-donazione, permette da un lato di evitare la raccolta di unità che potrebbero risultare non idonee e quindi successivamente invalidate, e dall'altro di consentire il recupero della donazione dopo regressione dell'alterazione della crasi ematica che il più delle volte è transitoria. Si ha il vantaggio ulteriore di eseguire in fase donazionale un solo esame rispetto alla valutazione dell'emoglobina pre e l'esecuzione dell'emocromo post-donazione e resta comun-

que un esame imprescindibile per la valutazione dell'idoneità alla donazione multi-component.

Il ruolo che riveste l'esame emocromocitometrico in fase di donazione è molteplice, consente infatti non solo di indirizzare il donatore verso la tipologia di donazione ottimale ma anche di orientare verso la tipologia più efficiente ed efficace di lavorazione delle unità di sangue intero al fine di ottimizzare la qualità degli emocomponenti prodotti.

Non ultima resta la possibilità di monitorare l'efficacia trasfusionale utilizzando lo stesso sistema emometrico per donatore, prodotto e ricevente.

Il Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale (SIT) Abruzzesi e la quasi totalità dei centri raccolta effettuano l'esame emocitometrico in predonazione. Un solo SIT, le autoemoteche ed alcuni centri raccolta continuano ad eseguire invece la determinazione dell'emoglobina da sangue capillare in predonazione e l'emocromo viene valutato in postdonazione.

Il SIT di Pescara effettua l'esame emocromocitometrico in predonazione dal 1994 con un'esperienza ormai consolidata.

Vengono riportati di seguito i dati relativi agli accessi per donazione nel nostro SIT del 2008 e del 2009 con riferimento alle donazioni non effettuate per alterazioni della crasi ematica e a quelle "recuperate" nei sei mesi successivi (Tab. 1 e Tab. 2)

Tab. 1

Accessi per donazione	Donazioni non effettuate		Donazioni effettuate nei 6 mesi successivi
	Cause varie	Alterazioni emocitometriche	
2008 (n° 13436)	365 (2.71%)	155 (1.15%)	84 (54.19%)
2009 (n° 14164)	397 (2.80%)	211 (1.48%)	146 (69.19%)

Tab. 2

	Hb <12.5 g/dl (F)	Hb <13.5 g/dl (M)	GB >12.000/μl	GB <3.500/μl	Plt >450.000/μl	Plt <130.000/μl
2008 (n° 155)	66 (42.58%)	36 (23.22%)	31 (20%)	15 (9.67%)	66 (1.29%)	66 (3.22%)
2009 (n° 211)	105 (49.76%)	43 (20.37%)	44 (20.85%)	10 (4.73%)	3 (1.42%)	6 (2.84%)

"IL PUNTO DI VISTA DEI DONATORI E DELLE ASSOCIAZIONI DEL VOLONTARIATO DEL SANGUE"

V. Saturni
Presidente Nazionale AVIS

L'obiettivo principale del sistema trasfusionale italiano ed al perseguimento del quale concorrono anche le Associazioni, è garantire a tutti i pazienti che ne presentano la necessità, una terapia trasfusionale adeguata, sicura e di qualità, grazie al contributo di donatori periodici, volontari, anonimi, non retribuiti, responsabili, associati.

Negli ultimi anni la medicina trasfusionale ha subito una notevole evoluzione, comportando un evidente e significativo miglioramento degli standard qualitativi e di sicurezza di emocomponenti ed emoderivati.

Tali argomenti rivestono un'importanza così strategica da essere sostenuti da numerose direttive, normative, indicazioni anche di letteratura, internazionali, europee e nazionali.

Ai fini della presente relazione farò riferimento principalmente al "Decreto 3 marzo 2005: "Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti", G. U. Serie Generale, n° 85 del 13 aprile 2005, che individua le modalità per la selezione del donatore finalizzata alla tutela della sua salute e di quella del ricevente.

In tale Decreto, vengono illustrati i percorsi da seguire per una corretta selezione, le cause di esclusione temporanea e permanente e le indagini da effettuarsi (vedi Tab. 1).

Tab. 1.

Allegato 7

emocromo completo*;
ALT*;
sierodiagnosi per la lue o sifilide;
HIVAb 1 – 2;
HBsAg;
HCVAb;
HCVNAT.
HCV/HIV/HBVNAT
*non obbligatorio per la validazione

Attualmente un esame emocromocitometrico completo ci consente di analizzare almeno i seguenti parametri: numero totale dei globuli rossi, emoglobina, ematocrito,

volume corpuscolare medio, numero delle piastrine e dei leucociti totali con relativa formula.

L'interpretazione dei risultati di un emocromo può darci un numero elevato di informazioni, che possono essere considerate patologiche o comunque meritevoli di approfondimento (Tab. 2).

Tab. 2

Condizioni potenzialmente patologiche
Anemia/microcitemia/macrocitosi
Poliglobulia
Variazione morfologia eritrocitaria
Leucopenia/linfopenia
Neutrofila/neutropenia
Linfocitosi/linfopenia
Eosinofilia
Monocitosi
Piastrinopenia/piastrinosi

Quindi, la sua valutazione rappresenta uno strumento importante per la sicurezza del donatore. In particolare, infatti, ci consente di seguirne lo stato di salute, in quanto in grado di fornirci indicazioni per l'individuazione precoce di alterazioni o stati patologici (es. anemia, piastrinopenia, leucocitosi, eosinofilia, trombocitosi), ma anche di proporre una migliore personalizzazione della tipologia di donazione.

Inoltre, anche se non è considerato esame obbligatorio per la validazione biologica degli emocomponenti, ci consente di aumentare la sicurezza per il paziente trasfuso, non prelevando unità di emocomponenti che andrebbero poi eliminate perchè presentano alterazioni significative (es. leucocitosi, neutrofilia, monocitosi, ...).

Considerati gli aspetti positivi sottolineati sopra, risulta necessaria una riflessione relativa alla scelta di effettuare l'emocromo completo prima della donazione, anche in funzione di un ulteriore miglioramento della qualità degli emocomponenti (es. non "produzione" di concentrati piastrinici in caso di piastrinopenia).

La decisione però deve tenere conto delle criticità collegate con tale scelta, con attenzione anche alle unità di raccolta associative, tra cui:

- **Organizzazione.** L'esecuzione dell'emocromo prima della donazione, la sua interpretazione e le conseguenti decisioni e comunicazioni al donatore possono rappresentare elementi critici nella gestione dell'afflusso dei donatori e del regolare svolgimento di tutte le fasi donazionali. Tempi prolungati di attesa possono determinare disaffezione nel donatore, pertanto è necessaria una puntuale azione di comunicazione che sia in grado di motivare la scelta ai fini della

salute del donatore, della sicurezza per il paziente, della qualità degli emocomponenti.

- Costi. Anche l'aspetto economico va affrontato sia per stabilire se l'esecuzione pre donazione rappresenta l'unico esame e che quindi non debba essere ripetuto, se non per decisioni particolari per il singolo donatore, sia per adeguare i rimborsi alle associazioni che gestiscono la raccolta in via convenzionale.
- Uniformità. L'esecuzione pre donazione dell'emocromo deve chiaramente essere sostenuta da una adeguata formazione del personale addetto alla selezione del donatore, al fine di uniformare i criteri di idoneità alla donazione, l'avvio a tipologie diversificate di donazione.
- Informazione. È necessaria un'attività di informazione puntuale e capillare ai donatori per renderli edotti dell'eventuale introduzione di questo percorso nella fase di selezione che li tutela maggiormente, che garantisce un ulteriore miglioramento della qualità degli emocomponenti, che aumenta la sicurezza per il paziente trasfuso, ma che può comportare una non idoneità temporanea ed il conseguente rinvio della donazione.
- Valutazione esiti e restituzione al donatore. Questi sono momenti fondamentali per la relazione con il donatore. Un esame alterato può causare uno stato di apprensione al donatore relativamente al suo stato di salute. È quindi indispensabile un puntuale e continuo aggiornamento di tutto il personale, compreso chi opera nelle unità di raccolta associative sull'accurata interpretazione – in tempi ristretti – dell'esame con le eventuali alterazioni. Inoltre non va trascurata la possibilità di coinvolgere specialisti e l'invio al medico di medicina generale per l'ulteriore presa in carico. Infine la conoscenza di parametri alterati deve essere inserita in un contesto più ampio di prevenzione.

Le associazioni di donatori svolgono alcuni compiti essenziali a partire dalla promozione della donazione periodica, volontaria, non remunerata, associata, fino alla selezione del donatore ed alla raccolta degli emocomponenti e sono inserite a pieno titolo nel sistema trasfusionale italiano. È pertanto indispensabile che tutti i percorsi vengano condivisi al fine di affrontare le possibili criticità legate all'introduzione di questa indagine pre donazionale.

IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE (CSE): AUTOTRAPIANTO, TRAPIANTO ALLOGENICO E FONTI DI CSE

A. Bosi

*Professore Ordinario di Malattie del Sangue
nell' Università di Firenze*

*Presidente del GITMO, Gruppo Italiano Trapianti
di Midollo Osseo, Cellule Staminali Emopoietiche
e Terapia Cellulare*

Il trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (CSE) rappresenta la terapia di elezione od è una importante opzione in numerose patologie, congenite o acquisite, neoplastiche o non neoplastiche. Il Trapianto Autologo od Autotrapianto consiste nel prelievo di CSE dal paziente, effettuazione di chemioterapia ad alte dosi per trattare la malattia di cui il paziente è affetto e reinfusione delle CSE congelate al fine di evitare una aplasia midollare irreversibile indotta dalla precedente chemioterapia. Il Trapianto Allogenico consiste invece nell' infusione di CSE provenienti da un donatore compatibile per il sistema umano di compatibilità per i trapianti (HLA), dopo aver preparato il paziente con trattamento di radio/chemioterapia anti tumorale ed immunosoppressiva. Le figure 1 e 2 mostrano il numero dei trapianti effettuati in Italia. Le indicazioni cliniche al trapianto, sia per il trapianto autologo sia per il trapianto allogenico, vengono periodicamente riviste, sia per tipo di malattia sia per fase di malattia, da un gruppo di esperti della Società Europea per il Trapianto di Midollo Osseo (EBMT) e pubblicate, e costituiscono una indicazione molto utile per la comunità scientifica.

17

La disponibilità di un donatore compatibile nell'ambito familiare si verifica con una frequenza del 25% nei fratelli (in una coppia di fratelli c'è una probabilità su quattro che i due siano istocompatibili). La bassa natalità tipica dei paesi industrializzati comporta l'assenza di un donatore in molti pazienti. Parallelamente, il continuo affinarsi delle tecniche trapiantologiche e l'estendersi delle osservazioni, ha progressivamente ampliato il campo di applicazione di questa procedura. Questo fenomeno, di per se positivo, ha comportato l'acuirsi del problema del reperimento dei donatori. Per ovviare a questa situazione sono stati creati dei registri nazionali collegati fra loro su base mondiale, in cui vengono inseriti dei donatori volontari; quando un paziente, affetto da una patologia in cui l'indicazione terapeutica primaria è rappresentata dal trapianto di CSE e non ha donatori compatibili nella fratria, viene ricercato un donatore volontario nei registri. Tali organizzazioni costituiscono delle vere e proprie banche dati che, collegate tra di loro da una rete internazionale mediante un sistema computerizzato, rendono accessibile ad un singolo paziente un pool di donatori estremamente ampio, permettendo così che la ricerca venga estesa in tempo reale sui registri nazionali ed esteri. La difficoltà di reperire in alcuni pazienti un donatore o la necessità

di un intervento terapeutico rapido (la ricerca di un donatore infatti può avere dei tempi molto lunghi) ha spinto a ricercare delle fonti alternative di cellule staminali rispetto al midollo. L'osservazione che il sangue placentare contiene cellule staminali emopoietiche, ha determinato una serie di studi e sperimentazioni, prima su animali da laboratorio e poi sull'uomo, che hanno confermato la possibilità di utilizzare il sangue placentare come fonte alternativa di progenitori emopoietici a scopo trapiantologico; in altre parole le cellule staminali cordonali sono perfettamente in grado di ricostituire un midollo osseo dopo la sua distruzione ad opera di un trattamento radio-chemioterapico ad alte dosi. Questa osservazione e la nozione che il sangue che permane nella placenta al termine del parto (50-100 mL nella maggior parte dei casi) non è utile al neonato, tanto da venire usualmente gettato con la placenta, ha stimolato la creazione di programmi di bancaggio del sangue placentare a scopo di trapianto allogenico. Il sangue placentare raccolto immediatamente dopo il parto consente così di impiegare fruttuosamente un elemento biologico considerato "a perdere", dal momento che viene gettato dopo il parto, eliminando al tempo stesso tutte le problematiche relative al prelievo d'organo; la relativa immaturità immunologica delle cellule placentari consente inoltre di superare le tradizionali barriere di compatibilità permettendo di effettuare il trapianto anche tra soggetti non perfettamente HLA-identici. Le unità di sangue placentare raccolte vengono congelate e conservate per molti anni, risultando quindi disponibili in tempi brevi e permettendo una più rapida ricerca di un donatore rispetto a quella di un donatore da registro, dal momento che le unità bancate sono già caratterizzate.

L'utilizzo di questa fonte emopoietica alternativa determina quindi indubbi vantaggi di natura pratica e biologica, sia per il donatore che per il ricevente:

- 1) il donatore non deve essere sottoposto ad una anestesia;
- 2) le unità conservate possono essere una fonte di cellule staminali per pazienti appartenenti a quelle minoranze etniche poco rappresentate nei registri di donatori volontari;
- 3) permettono una più rapida ricerca di un donatore non correlato rispetto a quella di un donatore da registro dal momento che le unità bancate sono già caratterizzate;
- 4) assenza di rischi per la madre e per il neonato;
- 5) minore necessità di grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente
- 6) minor rischio di gravi reazioni immunologiche post-trapianto, come la malattia da trapianto contro l'ospite (Graft versus Host Disease, GvHD), responsabile di un'alta morbilità e mortalità post-trapianto.

A fronte di tali vantaggi, il sangue placentare presenta il limite di numero limitato di cellule, e per questo le Banche tendono a conservare solo quelle unità particolarmente ricche di cellule che consentono di trapiantare anche pazienti con peso corporeo quale quello degli adolescenti o di giovani adulti. Questo ha consentito di poter trapiantare anche questi pazienti mentre inizialmente venivano trapiantati solo i pazienti pediatrici ed anzi negli ultimi anni vengono trapiantati in Italia da questa sor-

gente di CSE un numero maggiore di pazienti adulti rispetto ai pediatrici (Fig. 3). Nel contempo si è sviluppata anche la tecnica del trapianto allogenico da donatore "aploidentico" ovvero un donatore identico a metà reperito in ambito familiare. Questa tecnica consente di effettuare un trapianto rapido, laddove le condizioni cliniche lo richiedano, e trova particolare indicazione nella leucemia mieloide acuta ad alto rischio. La Figura 4 mostra la distribuzione numerica dei trapianti allogenici da donatore fratello HLA-identico, donatore familiare e donatore compatibile da Registro. Il trapianto di CSE costituisce una opzione terapeutica molto valida; il trapianto allogenico è però associato a mortalità e morbidità e pertanto è stato riservato a pazienti di età giovane-adulta ed in buone condizioni generali. Più recentemente sono stati messi a punto regimi di preparazione al trapianto ad intensità ridotta. Tali regimi hanno consentito di portare l'età al trapianto fino a 65 anni (Fig. 5), oltre che offrire il trapianto anche soggetti in condizioni cliniche non ideali.

Fig 1 - Autotrapianto

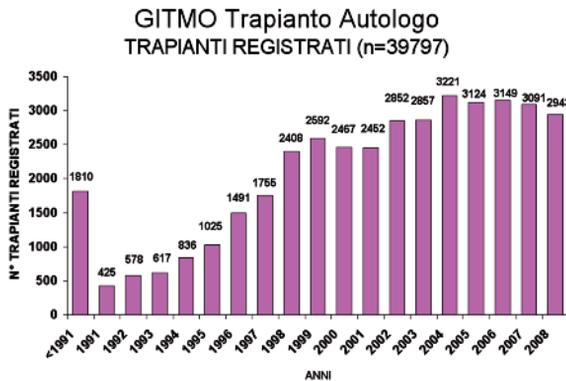


Fig. 2 - Trapianto Allogenico

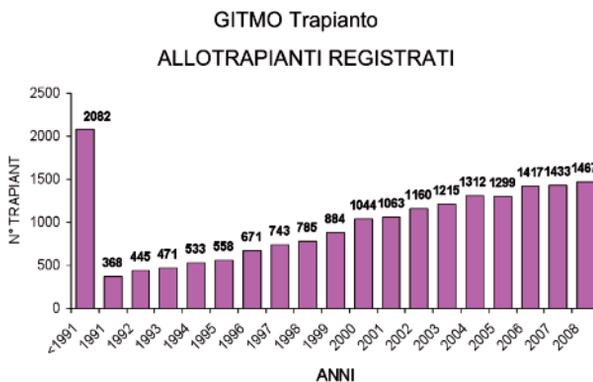


Fig. 3 - Trapianti da sangue cordonale in adulti e in pediatria

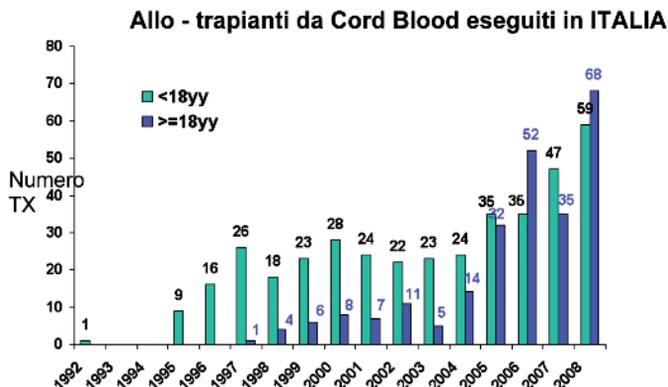


Fig 4 - Trapianto allogenico da donatore fratello HLA-identico, da consanguineo e da Donatore da Registro HLA-compatibile

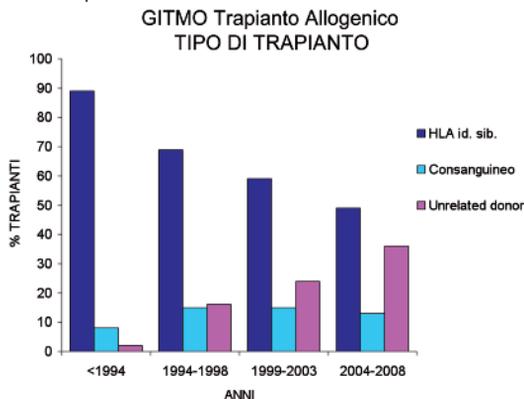
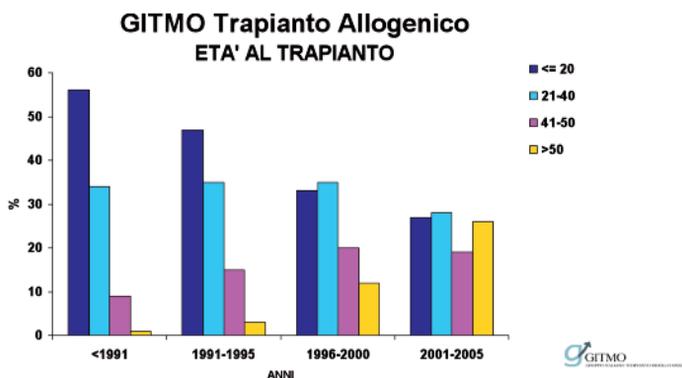


Fig 5 - Distribuzione del numero dei trapianti allogenici in base all'età



PROFILI DEDICATI PER L'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO DI DONATORI DI CELLULE STAMINALI E CONCENTRATI DI HPC-APHERESIS.

L. Pierelli

Unità di Raccolta di Cellule Staminali e di Terapie Cellulari, SIMT, A.O.S.S. Camillo Forlanini, Roma

Premessa

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) periferiche è una procedura utilizzata con successo negli ultimi 30 anni per il trattamento di neoplasie ematologiche ed è a tutt'oggi l'approccio terapeutico d'elezione considerato il ridotto rischio di effetti collaterali severi rispetto al trapianto di midollo osseo sia autologo che allogenico. Il protocollo di base prevede la stimolazione del midollo osseo con fattori di crescita, preceduta in caso di trapianto autologo da un trattamento chemioterapico.

La stimolazione con fattori di crescita induce la mobilitazione di progenitori emopoietici dalla sede midollare al circolo periferico con conseguente aumento della popolazione dei leucociti arricchita di CSE CD34+ e precursori immaturi delle diverse linee di differenziazione delle cellule ematiche. Pertanto il sangue periferico di soggetti sottoposti a trattamento mobilizzante e i concentrati aferetici di CSE sono caratterizzati dalla presenza di elementi cellulari qualitativamente e quantitativamente diversi da quelli che si identificano in soggetti non trattati. Quindi l'analisi emometrica accurata delle popolazioni cellulari di interesse costituisce un vantaggio di rilievo nel contesto trapiantologico.

In condizioni usuali le soglie separano in maniera netta le diverse popolazioni, ma in presenza di campioni con caratteristiche quali-quantitative non-convenzionali, i diversi citotipi possono essere individuati in maniera non idonea e, allora è utile disporre di un software che preveda lo spostamento/adattamento da parte dell'operatore delle soglie di separazione per ottimizzare la circoscrizione dei cluster cellulari e, quindi, il conteggio differenziale.

Scopo

Lo scopo di questo studio è la determinazione della conta leucocitaria totale e dell'analisi differenziale nelle diverse sottopopolazioni, in campioni di sangue specifici per i quali si è proceduto a realizzare dei profili dedicati avvalendosi di un software a soglie mobili in dotazione sull'analizzatore ABX Pentra DX120.

Le conte cellulari ed i profili dei diversi cluster leucocitari ottenuti dal sistema analitico, sono stati comparati con quanto ottenuto in analisi citofluorimetrica me-

dante l'utilizzo e l'elaborazione degli "scatter" SSC e delle marcature con anticorpo monoclonale CD45 in corso di conta di analisi per CD34 con protocollo ISHAGE.

Sono stati analizzati campioni di sangue periferico di pazienti mobilizzati, sangue cordonale con conta eritroblastica $< 0,5 \times 10^3 / \text{mm}^3$, campioni derivati da raccolte di leucoaferesi e costruiti su misura dei profili in base alla distribuzione dei cluster cellulari con il settaggio di soglie di separazione appropriate.

L'analisi della formula leucocitaria è stata effettuata in due modalità:

- una a tre popolazioni in cui i granulociti vengono considerati insieme ai loro precursori immaturi (linfociti, LYM; monociti, MON; granulociti, GRA+precursori, LIC)
- una a due in cui si analizza oltre alla popolazione GRA+LIC, la popolazione linfo-mononucleata nel suo insieme (LYM+MON).

Risultati

L'analisi di regressione e la comparazione tra dati nelle tre tipologie di campioni ha evidenziato una sostanziale sovrapposizione della conta assoluta leucocitaria e della quantificazione percentuale delle popolazioni di interesse ottenute mediante i due diversi sistemi di conta. In particolare, nell'analisi a tre popolazioni si è riscontrato un forte allineamento relativamente alla conta dei linfociti, del cluster dei granulociti e loro precursori ed un lieve disallineamento per quanto riguarda la popolazione dei monociti; al contrario, l'analisi in due raggruppamenti cellulari, è risultata accurata e fortemente correlata alla rispettiva conta citometrica.

			Leucoaferesi	
	Parametri	R	Mean diff	Mean diff %
37	Wbc	0,98	-6	1,8
37	Lym	0,99	0	0,0
37	Mon	0,87	-1,3	6,9
37	Mononucleate	0,96	-1,4	4,7
37	Gra+Lic	0,96	2,6	3,7

			Periferico Mobilizzato	
	Parametri	R	Mean diff	Mean diff %
46	Wbc	0,99	0,8	5,2
46	Lym	0,99	0,3	2,9
46	Mon	0,92	1,4	13,6
46	Mononucleate	0,99	1,8	8,8
46	Gra+Lic	0,97	-0,3	0,38

		Sangue di cordone		
	Parametri	R	Mean diff	Mean diff %
16	Wbc	0,98	-0,2	2,7
16	Lym	0,97	1,4	4,0
16	Mon	0,7	0,8	8,08
16	Mononucleate	0,95	2,2	4,9
16	Gra+Lic	0,91	1,3	2,4

Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che la possibilità di disporre di analizzatori che consentano la costruzione di profili emometrici specifici e l'uso di soglie mobili di analisi, per un eventuale ulteriore aggiustamento rispetto alla distribuzione dei diversi cluster leucocitari, come sul sistema ABX PentraDX120, consente la realizzazione di conte cellulari accurate in tempo reale su campioni comunemente anomali, come quelli contenenti CSE, che di routine vengono analizzati da un laboratorio di processazione cellulare.

