

PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO ASSISTENZIALE

per la Genotipizzazione di RHD fetale su

DNA fetale libero nel circolo materno

- GENIC -

Responsabile del progetto GENIC: Dr.ssa Tamara Stampalija, SDR Medicina Fetale e Diagnostica Prenatale, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste.

Partecipanti del gruppo di lavoro multidisciplinare:

- Dr. Vincenzo De Angelis, Direttore del Dipartimento di Medicina Trasfusionale, ASUI Udine;
- Dr.ssa Lorenza Driul, specialista in Ginecologia ed Ostetricia, SC Clinica Universitaria di Ginecologia ed Ostetricia ASUI Udine;
- Dr.ssa Ilaria Fantasia, specialista in Ginecologia ed Ostetricia, SDR Medicina Fetale e Diagnostica Prenatale, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste;
- Dr.ssa Donatella Londero, specialista in Medicina Trasfusionale, Dipartimento Immuno-trasfusionale, ASUI Udine;
- Dr. Luca Giovanni Mascaretti, specialista in Medicina Trasfusionale, ASUI Trieste;
- Dr.ssa Monica Piccoli, specialista in Ginecologia ed Ostetricia, SSD Gravidanza a Rischio, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste;
- Prof Giuseppe Ricci, Direttore SC Clinica Universitaria di Ginecologia ed Ostetricia, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste;
- Dr.ssa Tamara Stampalija, Responsabile di SDR Medicina Fetale e Diagnostica Prenatale, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste;

Premessa

Il fattore RhD, oltre ad essere importante nei processi trasfusionali, svolge un ruolo fondamentale nell'incompatibilità materno-fetale alla base della malattia emolitica del feto e del neonato. Per questo motivo è stata introdotta l'immunoprofilassi con immunoglobuline anti-D nelle donne RhD negative, con conseguente significativa riduzione dell'isoimmunizzazione anti-D e dell'incidenza di malattia emolitica del feto e del neonato. Tuttavia, circa il 40% di donne RhD negative porta il feto RhD negativo. Pertanto, la somministrazione indiscriminata ante-partum dell'immunoprofilassi anti-D implica che circa il 40% delle donne RhD negative riceverà emoderivati (immunoglobuline anti-D) in modo inappropriato. E' stimato che in Inghilterra e Wales circa 40,000 donne all'anno ricevono l'immunoprofilassi anti-D inappropriata (*Soothill 2015*).

I vantaggi di una immunoprofilassi anti-D mirata sarebbero molteplici: ridurre il numero di gravide esposte ad emoderivati potenzialmente a rischio di infezioni da prioni e da nuovi virus emergenti, e ridurre l'utilizzo di immunoglobuline anti-D con un vantaggio economico che si aggiunge all'aspetto della carenza, sempre più diffusa, di tali emoderivati.

La scoperta di DNA fetale libero nel circolo materno (cffDNA, cell free fetal DNA) ha reso possibile la determinazione del genotipo RHD fetale su sangue materno. Sono numerosi gli studi che hanno dimostrato l'alta performance di questo test. In una recente revisione della letteratura, che ha messo insieme gli studi più importanti, è stata riportata la sensibilità del test del 99,9% se eseguito dopo la 25-a settimana di gestazione (*van der Schoot 2017*), mentre sono necessari ulteriori studi per stabilire l'accuratezza del test nel I trimestre. I falsi positivi sono possibili (per esempio pseudo gene RhD Ψ , o variante d(C)ce aplotipo, entrambi presenti soprattutto nella popolazione Africana). Tuttavia, il riscontro di un falso positivo risulterebbe al massimo in un over-treatment, come spesso succede al momento attuale. I falsi negativi sono molto rari, ma possibili, specialmente nelle popolazioni meno studiate. Per questo motivo il test amplifica più di una regione. Inoltre, la probabilità di un falso negativo aumenta al diminuire della frazione fetale e, pertanto, in epoche gestazionali molto precoci. Per ovviare a questo problema è indicato eseguire il test in epoche gestazionali più avanzate.

Queste premesse hanno portato a considerare eticamente non-accettabile il fatto di continuare a somministrare emoderivati ottenuti da donatori multipli a donne gravide che non lo necessitano e che potrebbero evitare tale esposizione (*Kent 2014*). Infatti, la genotipizzazione RHD fetale su cffDNA nel circolo materno per guidare la somministrazione dell'immunoprofilassi anti-D è stata introdotta con successo in alcuni paesi a livello nazionale, in Danimarca dal 2010, in Olanda dal 2011 e in Finlandia dal 2014 (*Clausen 2012; Wikman 2012; de Haas 2012*), nonché a livello regionale, in Wales dal 2013, Stoccolma dal 2009, ed alcune parti di Francia e Belgio. Infine, numerosi altri paesi, tra cui il Canada, hanno espresso la necessità di implementare l'immunoprofilassi anti-D mirata nei protocolli clinico-assistenziali.

In Italia, al momento attuale, l'immunoprofilassi anti-D viene somministrata in modo indiscriminato a tutte le donne RhD negative:

- a) in presenza di perdite ematiche nel corso della gravidanza;

- b) in occasione dell'esecuzione di procedure invasive quali villocentesi ed amniocentesi;
- c) di routine come profilassi a 28 settimane;
- d) nel post-partum se confermato lo status RhD positivo del neonato su sangue cordonale.

Una donna RhD negativa potrebbe ricevere, pertanto, più di una somministrazione di immunoglobuline anti-RhD nel corso della gravidanza pur portando in grembo il feto RhD negativo, e pertanto da ritenersi inutile ed inappropriato. A livello nazionale il test è offerto a pagamento da alcune aziende private e non esiste un programma nazionale.

Progetto GENIC

Con queste premesse è nato il progetto GENIC, finanziato dal grant regionale relativo ai contributi per la ricerca clinica, traslazionale, di base, epidemiologica e organizzativa, di cui all'articolo 15, comma 2, lettera b), della legge regionale 17/2014, sotto la responsabilità della dr.ssa Tamara Stampalija, SSSR Medicina Fetale e Diagnostica Prenatale, IRCCS Burlo Garofolo, e in collaborazione con la Dr.ssa Donatella Londero, Dipartimento Immunotrasfusionale, ASUI-Udine.

L'obiettivo del progetto era la messa a punto e la validazione della tecnica di genotipizzazione di RHD fetale su cff-DNA nel sangue materno con il rationale di introdurre a livello Regionale un protocollo multidisciplinare condiviso sull'utilizzo mirato ed appropriato dell'immunoprofilassi anti-D alle sole donne RhD negative con feto RhD positivo.

Su 190 donne reclutate 96 campioni sono stati analizzati per un totale di 368 test di genotipizzazione, tramite metodo di estrazione di DNA fetale automatico e manuale, su campioni di plasma freschi e congelati. La genotipizzazione è stata eseguita mediante tecnica PCR (polymerase chain reaction) sugli esoni 5, 7 e 10. I risultati sono stati comparati con Rh fetale su sangue cordonale prelevato dopo la nascita. La sensibilità e la specificità del test è stata del 100% con nessuna differenza tra campioni freschi e congelati e tra tecnica manuale e automatizzata, nei tre trimestri di gravidanza. La validazione della metodica automatizzata su campioni di cffDNA congelato permette di standardizzare la tecnica di tipizzazione del cffDNA aumentandone la riproducibilità tra laboratori diversi. Nella nostra coorte, 23% (22/96) di donne RhD negative portava un feto RhD negativo, condizione in cui l'immunoprofilassi anti-D poteva essere evitata (*Londero et al 2018*, manoscritto in peer-review).

Proposta di PDTA

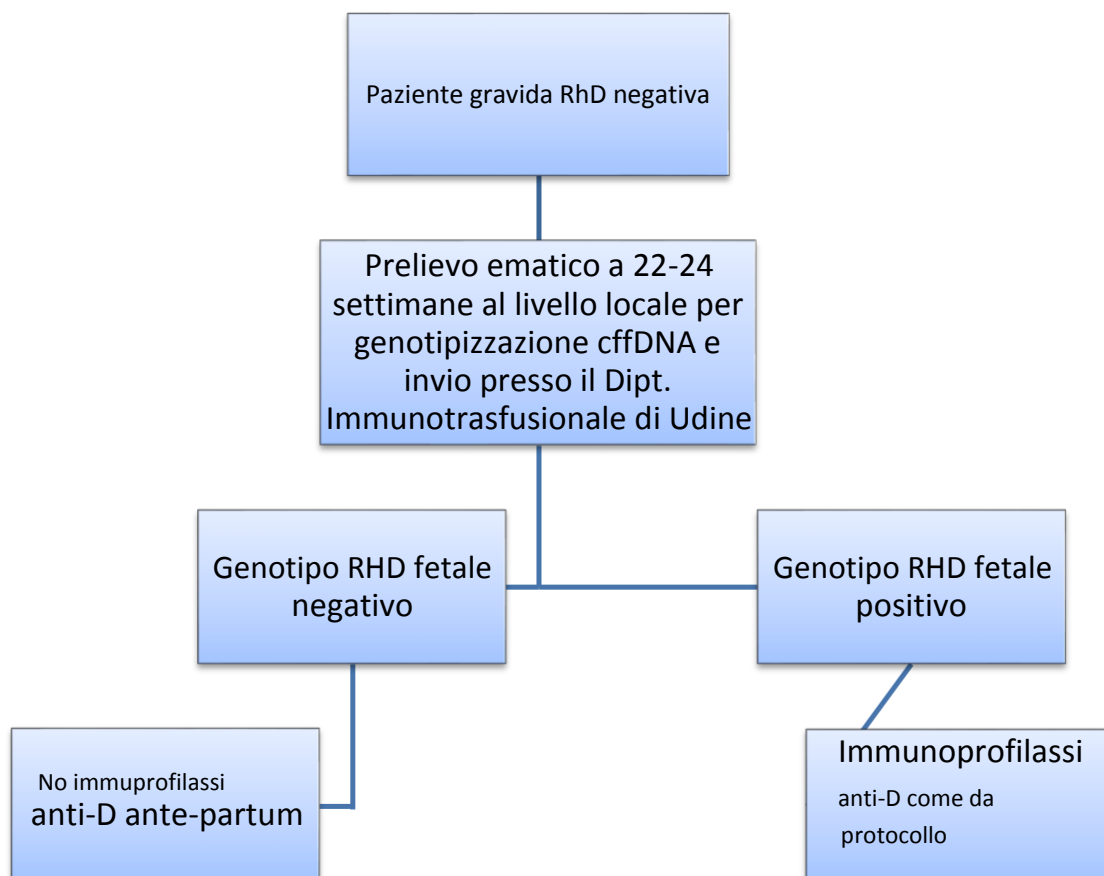
In data 29.03.2018, presso IRCCS Burlo Garofolo, si è riunito un gruppo di lavoro multidisciplinare (in calce la lista dei professionisti che hanno preso parte) con lo scopo di revisionare i dati di letteratura, analizzare i dati ottenuti con lo studio GENIC, valutare i vantaggi dell'immunoprofilassi anti-D mirata a livello Regionale e di concordare un protocollo operativo da proporre alla Regione. I dati della letteratura indicano, senza alcun dubbio, i vantaggi offerti da una immunoprofilassi anti-D mirata: le donne gravide non vengono esposte in modo inappropriato, in somministrazione singola o ripetuta, agli emoderivati. Questo comporta una riduzione dell'utilizzo di immunoglobuline anti-D. E' importante sottolineare come le

immunoglobuline anti-D vengono prodotte tramite somministrazione di emoprodotti a volontari sani (maschi) e successivi prelievi. Oltre ad una sempre più accentuata carenza di immunoglobuline anti-D, si pone anche il problema sull'eticità di questa procedura laddove si potrebbe ovviare al problema soprassedendo alla somministrazione di immunoprofilassi anti-D in seguito alla genotipizzazione RHD fetale su cffDNA nel circolo materno.

La messa a punto e la validazione della tecnica di genotipizzazione RHD fetale su cffDNA da parte del Dipartimento Immunotrasfusionale di Udine permette la centralizzazione e l'esecuzione di tale test in Regione, nonché possibile collaborazione con Regioni limitrofe.

La finestra identificata per eseguire il prelievo ematico è il periodo di gravidanza compreso tra 22° e 24° settimana allo scopo di ottenere il risultato della tipizzazione del cffDNA prima della 28° settimana di gravidanza, periodo in cui viene eseguita routinariamente la somministrazione di immunoprofilassi anti-D. Si propone, inoltre, di introdurre la genotipizzazione RHD su cffDNA nel circolo materno tra la 22°-24° settimana di gestazione come LEA regionale per le donne gravide residenti in FVG.

Nei casi in cui il risultato del test mostri la presenza di un genotipo fetale RHD negativo non sarà eseguita l'immunoprofilassi anti-D. Di seguito la proposta di algoritmo operativo.

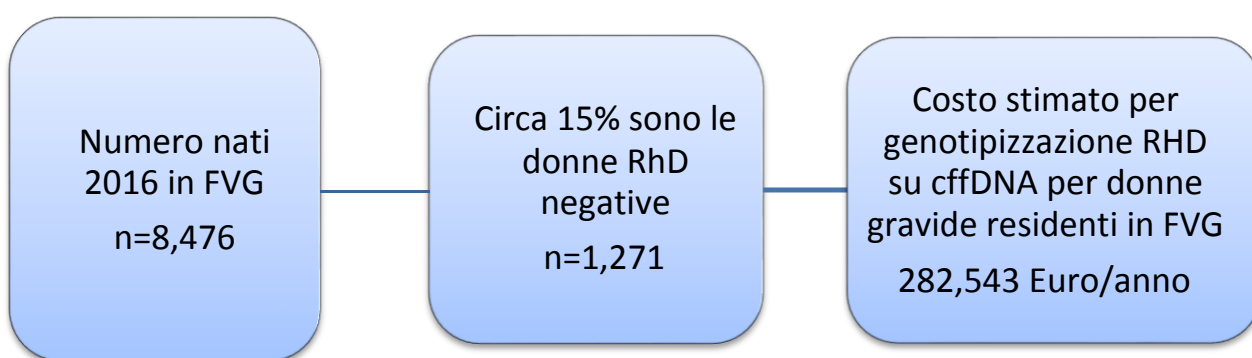


Determinazione del genotipo RHD fetale

Presso il Laboratorio di Immunoematologia del Dipartimento di Medicina Trasfusionale di Udine, in

seguito ad una gara Regionale, sono stati aggiudicati l'apparecchiatura e i kit necessari per l'esecuzione di tale test. La messa a punto della metodica e la convalida sono stati eseguiti con successo nell'ambito del progetto GENIC. Pertanto, la Struttura è in grado di rispondere alle domande di prestazioni citate sia Regionali che extra-Regionali. E' in corso la formalizzazione amministrativa dei costi (stimata intorno a 222,30 Euro).

Stima dei costi Regionali per la genotipizzazione RHD su cffDNA a donne residenti in FVG



Proposte derivanti dal progetto GENIC e del gruppo di lavoro:

- Introdurre la genotipizzazione RHD su cffDNA nel circolo materno tra la 22°-24° settimana di gestazione per la somministrazione appropriata di immunoprofilassi anti-D;
- Introdurre tale prestazione come LEA Regionale per le donne residenti in FVG.

Vantaggi:

- Somministrazione di emoderivati a donne gravide appropriata;
- Capacità di governo della spesa connessa al consumo di Immunoglobuline Anti-D in costante riduzione la disponibilità sul mercato ed aumento del costo;
- Un approccio qualitativamente più appropriato nel percorso gestazionale;
- Prima Regione in Italia ad eseguire tale esame di routine;
- Attrazione extra-Regionale.

Bibliografia

Clausen 2012

Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* 2012;52:752–8.

de Haas 2012

de Haas M, van der Ploeg CPB, Scheffer PG, Verlinden DA, Hirschberg H, Abbink F, et al. A nationwide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Sci Ser* 2012;7:164–7.

Kent 2014

Kent J, Farrell A-M, Soothill P. Routine administration of anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014; 14:87.

Soothill 2015

Soothill PW, Finning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G. Use of ccfDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG* 2015;122:1682-1686.

Wikman 2012

Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single- exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012;120:227–34.

Van der Schoot 2017

van der Schoot CE, de Haas M, Clausen FB. Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Curr Opin Hematol.* 2017 Nov;24(6):544-550.