



Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana
Scuola di Specializzazione in Ginecologia e Ostetricia
Direttore Prof. Giovanni Battista Nardelli

Isoimmunizzazione Rh

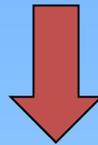
Dott.ssa Anna Strzelecka

Isoimmunizzazione Rh

- Paziente P.G. , 22 anni
- Emogruppo : A Rh negativo ccdeekk
- Emogruppo coniuge: 0 Rh positivo
- PARA 1001, PS nel 2007 in Moldavia a 42 sg, maschio 3050 g, emogruppo 0 Rh positivo
- *Non eseguita immunoprofilassi*
- Viene in ambulatorio delle gravidanze a rischio a 11 sg per test di Coombs indiretto positivo con titolo *anti D 1:256*
- Monitoraggio TCl ogni 15 gg
- Il titolo anti D risulta stabile fino a 23+4 sg

Isoimmunizzazione Rh

- A 23+4 sg il titolo anti D sale a 1:2048
- Al controllo ecografico accrescimento regolare al 60° percentile, non segni di ascite/idrope fetale, MCA PSV nella norma



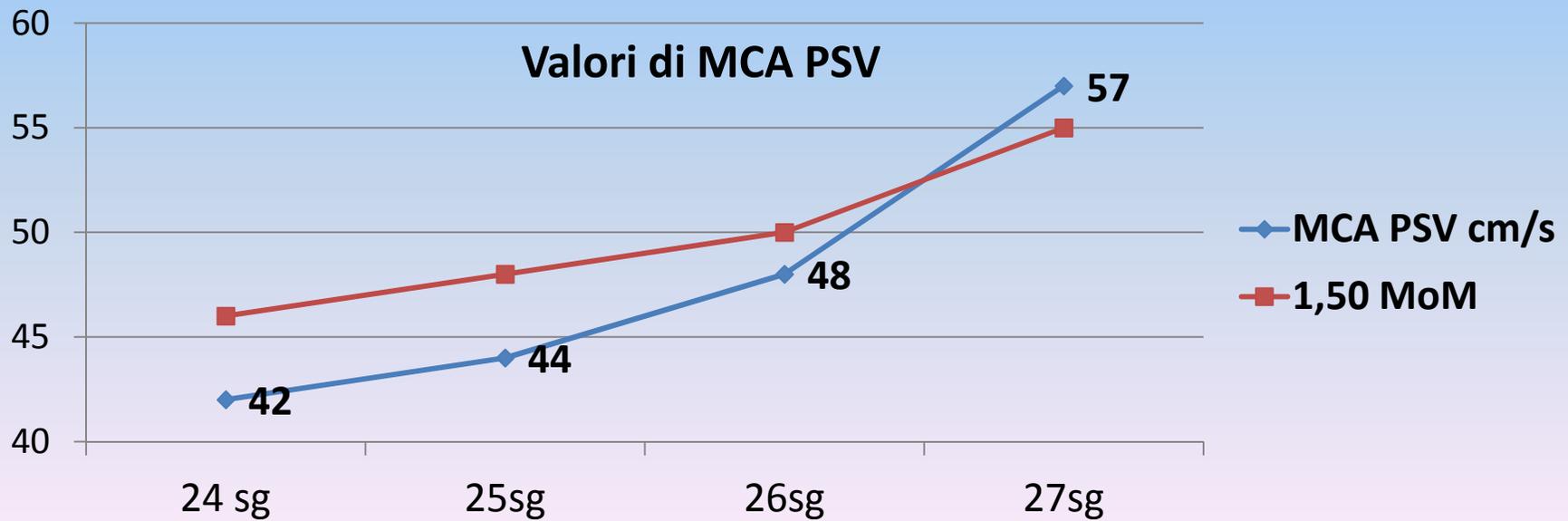
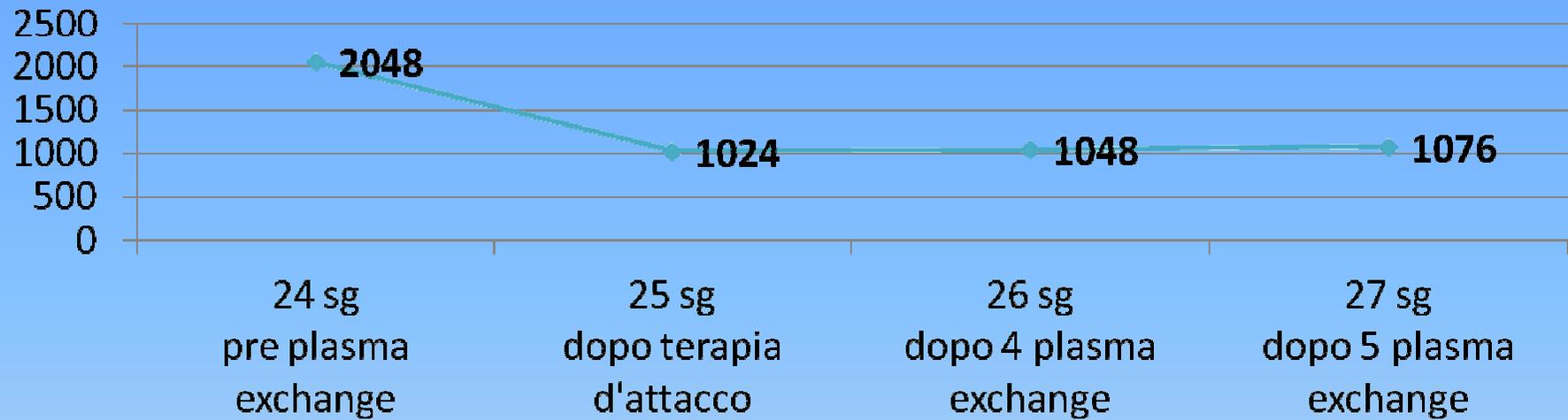
- ✓ Controlli settimanali picco della velocità a. cerebrale media + controllo titolo anti D ogni 14gg
- ✓ Visto aumento del titolo anticorpale si decide per plasmaferesi

PROTOCOLLO PLASMAFERESI

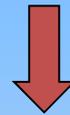
- 3 plasma exchange a giorni alterni: terapia d'attacco poi 1 volta alla settimana.
- Ogni 15 gg boli ev di Ig RhD a infusione lenta (1g/kg, 5g/40 min)

Isoimmunizzazione Rh

Titolo anticorpale anti D



- A 27 sg *valore MCA PSV > 1,50 MoM*, lieve versamento pericardico.
- Titolo anti D in salita 1: 1076



MATURAZIONE POLMONARE
TRASFUSIONE FETALE INTRAUTERINA

Emotrasfusioni	Hb pre(g/dL)	Hct pre	IUT	Hb e Hct post	
27 sg	5,9	16%	60 ml	16,1	Hct 46%
29 sg	7	20,5%	80 ml	16,9	Hct 49%

Isoimmunizzazione Rh

- A 29 e a 30 sg MCA PSV nella norma, accrescimento al 30° percentile, CTG normoreattivo, non segni ecografici di ascite fetale



titolo anticorpale in salita 1:4000



- Si ripete ciclo completo di terapia con Bentelan e si programma plasmaferesi
- Al controllo eco pre plasma exchange a 30+2 sg

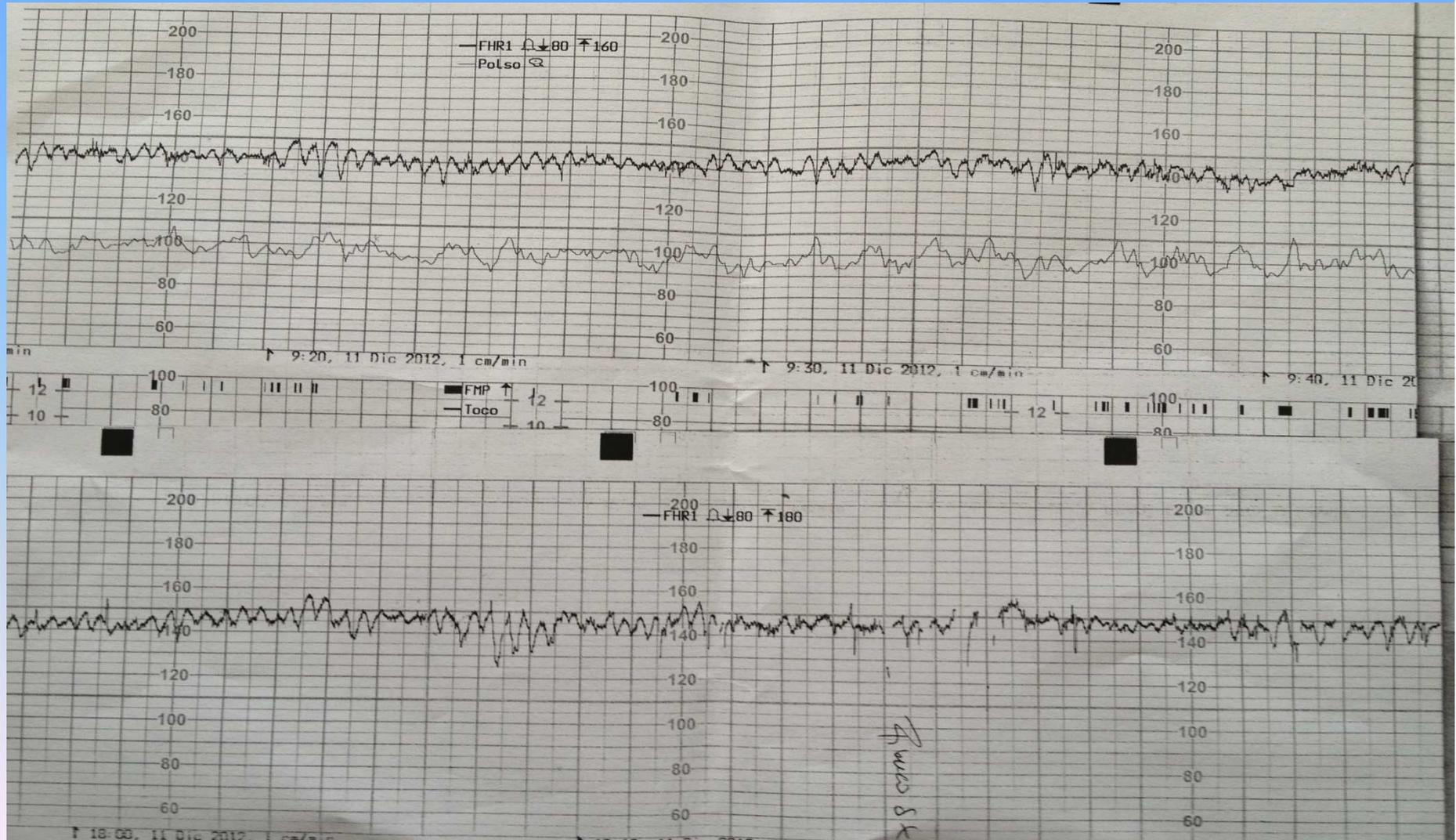


MCA PSV > 1,50 MoM (65 cm/sek)

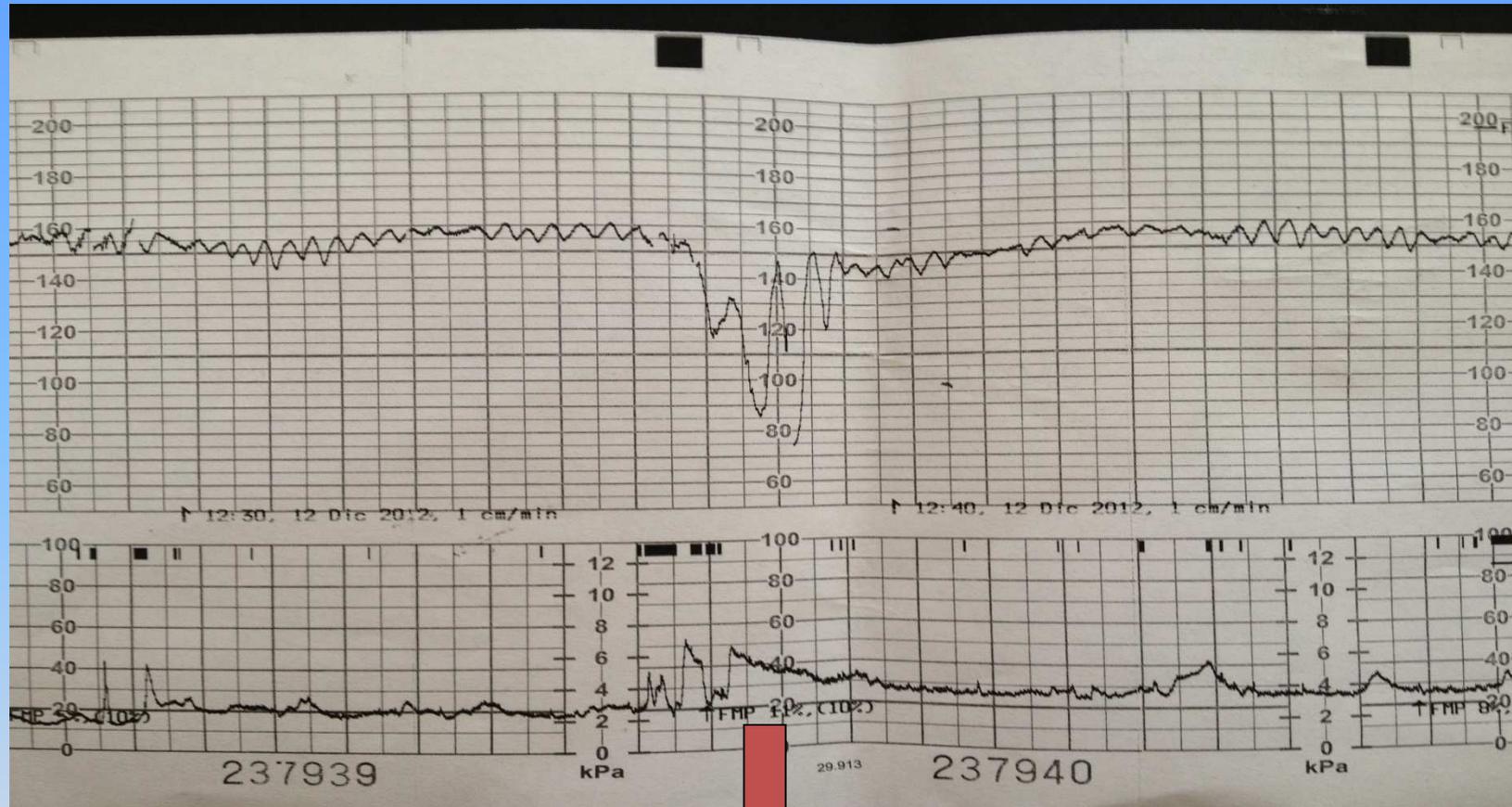


- Non segni ecografici di ascite/idrope fetale
- Paziente riferisce ***ridotti movimenti fetali*** nelle ultime 12 ore

CTG sinusoidale



Isoimmunizzazione Rh



Taglio cesareo urgente

Nasce femmina, peso 1550 g, Apgar 3-5-7, Hb 6,2 g/dL

CAUSE DI ANEMIA FETALE

✓ *Isoimmunizzazione materno fetale che causa malattia emolitica di neonato :*

- immunizzazione sistema Rh
 - **anti-D** 61% di tutte anemie fetali,
 - raramente altri antigeni del sistema Rh
- sensibilizzazione ad altri antigeni eritrocitari (Kell,Duffy)

0,05% delle nascite

✓ *Virale:*

- parvovirus B19
- citomegalovirus
- coxackie
- toxoplasma

✓ *Emorragia materno - fetale (FMH)*

✓ *Trasfusione feto fetale nelle gravidanze gemellari monocoriali*

✓ *Corioangioma placentare*

✓ *Emoglobinopatie:*

- Alfa talassemia major

✓ *Genetiche:*

- Anemia Fanconi
- Aase Syndrome
- Diamond- Blackfan anemia
- Trisomie 21,13,18

✓ *Tumori fetali:*

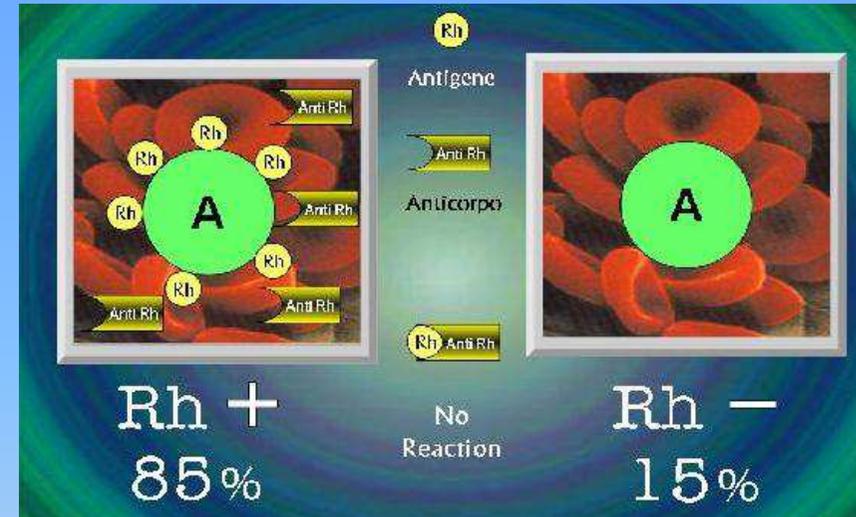
- Leucemia congenita
- Fibrosarcoma congenito

ANTIGENE RH

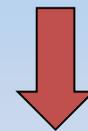
- Scoperta sistema Rh **nel 1939 Levine e Stetson**
- Antigene Rh è determinato da un complesso di geni costituiti da 8 alleli: **CDe, cde, cDE, cDe, Cde, cdE, CDE, CdE**
- Il genotipo è indicato da una copia di geni: **CDe/cde**
- Il locus genetico è sul braccio corto del **cromosoma 1**, costituito da 2 strutture distinte ed adiacenti l'una all'altra
RhCcEe RhD
- Un gene codifica antigene Cc ed Ee ed uno D
- **Antigene D**
 - ✓ Più importante
 - ✓ Fenomeni di immunizzazione
 - ✓ Espresso dall'embrione dalla 5-6 settimana di vita
- Gli individui **D-Negativi** mancano del gene RhD su entrambi i cromosomi (delezione del gene D).

INCIDENZA RH NEGATIVO

- Bianchi **15%**
- Neri **5-8%**
- Asiatici e Indiani **1-2%**



Una donna europea Rh negativa ha una probabilità dell'85% di sposare un uomo Rh positivo: 60% eterozigote (Dd), 40% omozigote (DD)



Senza conoscere il genotipo del padre una donna Rh Negativa ha la probabilità del **70% di avere un figlio Rh Positivo**

Incidenza dei casi di MEN da anti-D rispetto alle nascite totali annuali (dati ISTAT)

Anni 60	0.9 - 1 % delle nascite, circa 7000 casi al anno
Anni 80	0.07 – 0.13 % delle nascite
Anni 2000	0.01 – 0.03 % delle nascite

- Riduzione dell' incidenza grazie a:
 - introduzione di **profilassi anti D post partum** dal 1968-75
 - introduzione di **profilassi antenatale alla 28 sg** nel 2000
(ca 1,8 % di donne Rh- si sensibilizza già nella prima gravidanza a causa di piccole emorragie transplacentari)
- Negli ultimi anni causa immigrazione, l'incidenza **sta aumentando** e nel anno 2010 si attestata attorno a 6 casi ogni 1000 nascite.

Isoimmunizzazione Rh

- Il *feto* eritrociti **Rh Positivi** e la *madre* eritrociti **Rh Negativi**, esposta al antigene D può immunizzarsi
- Un numero sufficiente di eritrociti fetali deve entrare nella circolazione materna (almeno **0.25 ml di sangue fetale Rh +**)
- La madre deve avere **una immunocompetenza** a produrre anticorpi diretti contro l'antigene D
- Di solito è di origine **gravidica**
- Immunizzazione clinicamente significativa richiede **due esposizioni all'antigene**: *risposta primaria IgM*,
risposta secondaria IgG, dopo la 2° esposizione anche di volumi 0,1 ml di sangue fetale)
- Protezione incompatibilità ABO

Situazioni cliniche che determinano immunizzazione

- Aborto spontaneo (> 6 sett.) 3%
- Aborto indotto 5%
- Gravidanza extrauterina 1%
- Placenta previa 1%
- CVS, amniocentesi 3-5%
- III trimestre 1,6%
- Trasfusione di GR non comp. 55-80%

Parto 15-50%

Isoimmunizzazione Rh

- Rischio di isoimmunizzazione

- I gravidanza

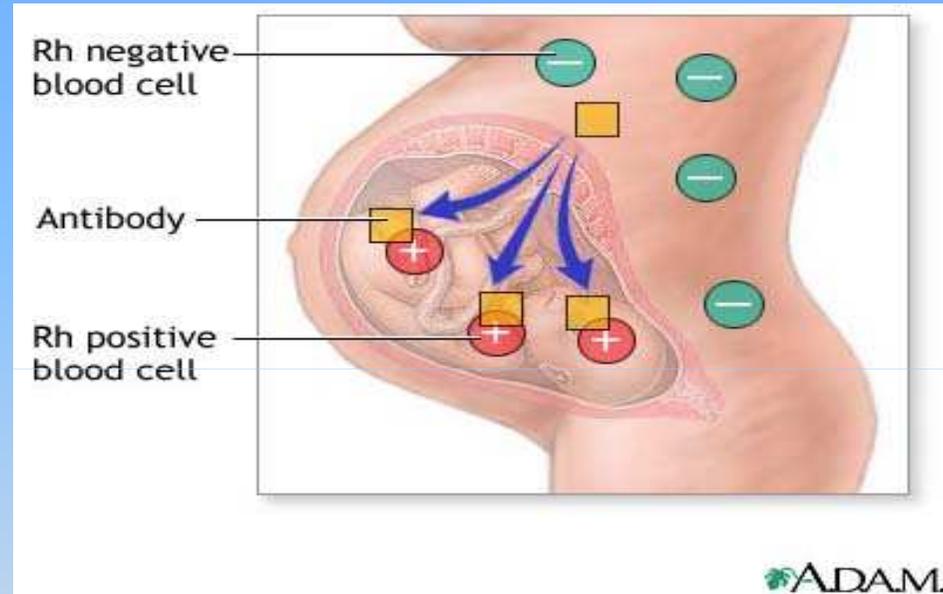
- 15%

- II gravidanza

- 45%

- III gravidanza

- 75%



- Fattori favorenti

- taglio cesareo

- secondamento manuale

- revisione uterina postpartum

- gravidanza multipla

Prima gravidanza feto Rh positivo

**Risposta immune primaria (IgM che non attraversano placenta)
madre immunizzata RhD **Negativa** - **Ab Positiva****

Presenza di AgRhD fetale nella seconda gravidanza

Intensa risposta anticorpale secondaria

Passaggio trasplacentare di IgG



Anemia

Emolisi

Prodotti di degradazione

Ittero nucleare

- Nuclei della base cerebrale
- Encefalopatia da bilirubina

Bilirubina indiretta

- Glicorono-coniungazione assente
- Eliminata tramite placenta

Isoimmunizzazione Rh

**Anemia fetale
Severa (0,65 MoM)**

Anossia cronica

**Scompenso cardiaco ad
alta gettata**

Eritopoiesi epatica e placentare

Danno epatico

**Cardiomeglia
Effusione pericardica**

Riduzione sintesi proteica

Edemi

Versamenti

IDROPE FETALE E MORTE

Profilassi con immunoglobuline anti D

- Introdotte **nel 1968** con riduzione drastica dell'incidenza di immunizzazione ma non eliminata (l'incidenza di immunizzazione si è **ridotta allo 0.3%**)
- Ig anti D da plasma donatori immunizzati sottoposti a controlli sierologici
- Somministrazione **e.v o i.m** (sensibilizzazione passiva di anticorpi che prevengono la sensibilizzazione attiva per soppressione della risposta immune anticorpo-mediata)
- 1000 UI IgG anti-D neutralizzano 20 ml di emazie fetali Rh+
- Nel caso di emorragia feto materna massiva necessità di dosi supplementari di Ig per assicurare profilassi efficace . Per valutare gli eritrociti fetali nel sangue materno e la loro percentuale si utilizza test di eluzione acida secondo **Kleihauer-Betke** basato sulla resistenza che l'emoglobina fetale offre all'eluzione acida.
- **TCI a 6 mesi** post profilassi, se + per Ab anti D sospetto di natura attiva

Protocollo di protezione

Somministrare RhIG

- entro **72 ore** dall'evento:



- *Parto con feto Rh positivo (profilassi post natale)*
- *Gravidanza extrauterina*
- *Aborto*
- *Minaccia di aborto*
- *Sanguinamenti placentari*
- *Diagnosi prenatale invasiva*
- *Morte intrauterina*

- alla **28 sg** (profilassi pre natale)

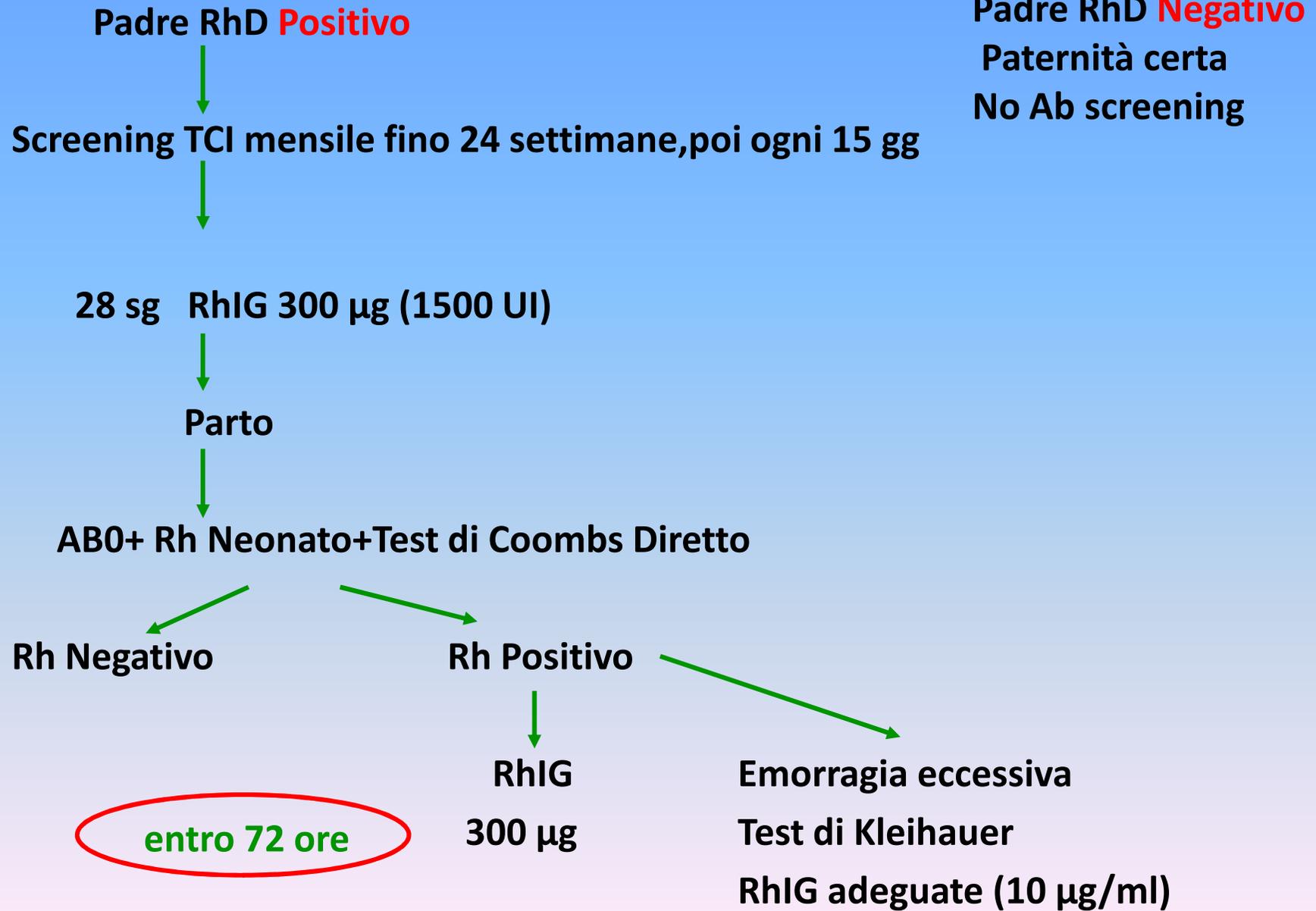
(Prima di somministrare RhIG ricerca negativa o debolmente positiva per presenza di anticorpi anti D)

Dosaggio



- 300 μ g (1500UI)
- > 300 μ g *nel caso di emorragia transplacentare massiva o trasfusione con Gr non compatibili*

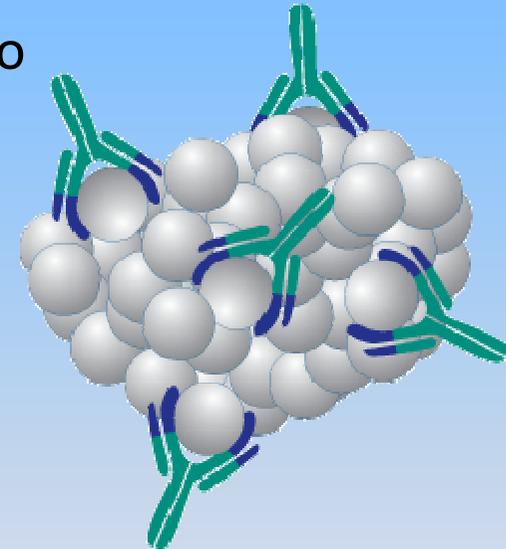
Madre RhD Negativa-Ab negativa



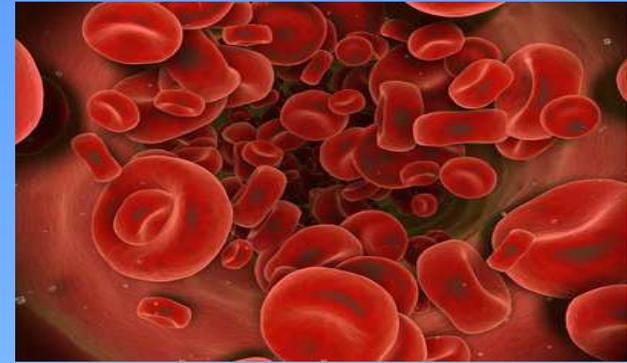
Padre RhD Negativo
Paternità certa
No Ab screening

Diagnosi di Immunizzazione Rh

- Stabilire **emogruppo materno** (esami preconcezionali o entrò 9 sg)
- Se Rh negativo, stabilire **emogruppo paterno**
- Dimostrazione **anticorpi anti-D** nel siero materno
- Test di Coombs indiretto
 - Variazione del **titolo anticorpale**
 - Livello anticorpale critico **1:16**
- Se inferiore: follow up con TCI e eco mensilmente
- Anamnesi remota materna è importante: **pregresso MEN, idrope?**



Sorveglianza anemia



- TCI con titolo anticorpale
- Ecografie seriate: segni di ascite/idrope, MCA PSV
- Amniocentesi per diagramma di Liley per rivelazione bilirubina

Fetal Hemoglobin (g/dl) by Gestational Age

Weeks <u>Gestation</u>	Hgb Values	Multiples of the Median				
		1.16	1.00	0.84	0.65	0.55
18		12.3	10.6	8.9	6.9	5.8
20		12.9	11.1	9.3	7.2	6.1
22		13.4	11.6	9.7	7.5	6.4
24		13.9	12.0	10.1	7.8	6.6
26		14.3	12.3	10.3	8.0	6.8
28		14.6	12.6	10.6	8.2	6.9
30		14.8	12.8	10.8	8.3	7.1
32		15.2	13.1	10.9	8.5	7.2
34		15.4	13.3	11.2	8.6	7.3
36		15.6	13.5	11.3	8.7	7.4
38		15.8	13.6	11.4	8.9	7.5
40		16.0	13.8	11.6	9.0	7.6
				mild anemia	moderate anemia	severe anemia

Mari, et al. N Eng J Med 2000.

Ecografie seriate – Rilevazione segni indiretti di anemia fetale

- Idrope feto-placentare (Hb di circa 7 g/dL inferiore al valore medio per età gestazionale, *Todros 2006*)
 - Versamento pleurico e/o peritoneale
 - Epatosplenomegalia
 - Placenta di spessore aumentato per edema
 - Edema sottocute
 - Ritardo di accrescimento
 - Flussimetria alterata per anemia (aumentata nella v. ombelicale, dotto venoso, aorta toracica,arteria splenica, a. cerebrale media-*Mari,2000*)

(Whitecar et al: Sonographic methods to detect fetal anemia in red blood cell alloimmunization, Obst Gyn 2002)

Ascite/idrope fetale

GARCIA, EVANGELINA 826928P 17 Jul 98 Tib 0.1 MI 0.6
UTMB-GALVESTON, TX RM1 C4-2 40R OB/LY 9:24:29 am Fr #85 23.0cm

Map 6
DynRg 50dB
Persist Low
Fr Rate High
2D Opt:Gen



ROSALES, MARLA 107112Q 01 Feb 99 Tib 0.4 MI 1.0
UTMB GALVESTON/ RM#2 C4-2 40R OB/CMS 4:08:48 pm Fr #85 19.9cm

Map 6
DynRg 50dB
Persist Med
Fr Rate Med
2D Opt:Res



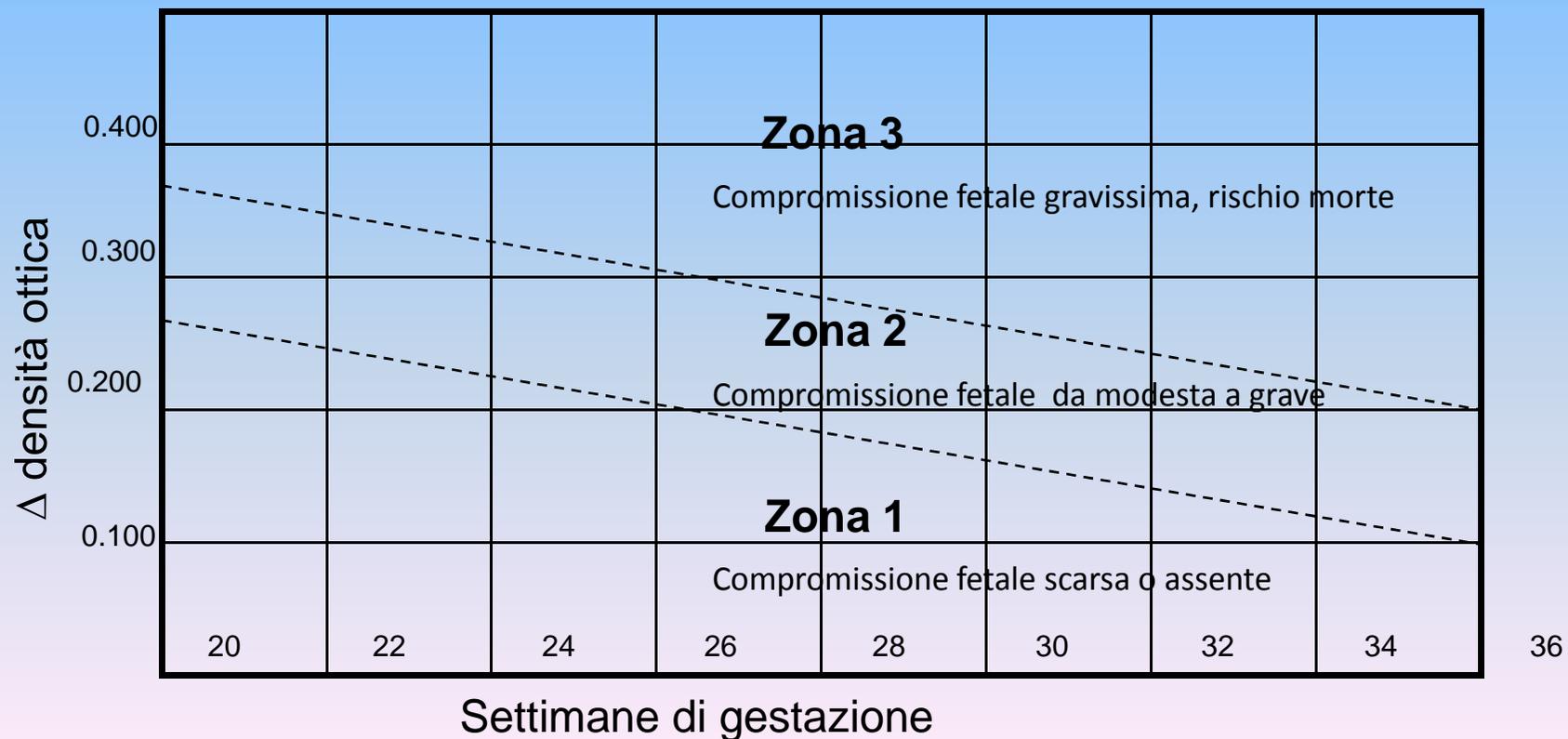
ROSALES, MARLA 107112Q 01 Feb 99 Tib 0.2 MI 0.9
UTMB GALVESTON/ RM#2 C4-2 40R OB/CMS 4:04:47 pm Fr #37 16.5cm

Map 6
DynRg 50dB
Persist Med
Fr Rate Med
2D Opt:Res



Diagramma di Liley per rivelazione bilirubina

- Liley ('61): determinato densità ottica del normale LA
- La bilirubina causa uno aumento densità spettrofotometrica ottica a alla lunghezza d'onda 450 millimicron
- $\Delta OD_{450}^{0.500}$ è usato per stimare l'emolisi fetale



Anemia fetale e MCA PSV

- 2000 G. Mari et al. NEJM : **velocità di picco sistolico aumentato nella arteria cerebrale media nella anemia fetale. Cut off per la velocità patologica è di 1,50 MoM**
- **Altri studi che confermano l'accuratezza diagnostica della dopplervelocimetria a. cerebrale media nel riconoscere anemia fetale nel caso di alloimmunizzazione**

Sensitivity 87-90%

Teixeira et al. Ultrasound Obstet Gynecol 2000;15:205-8.

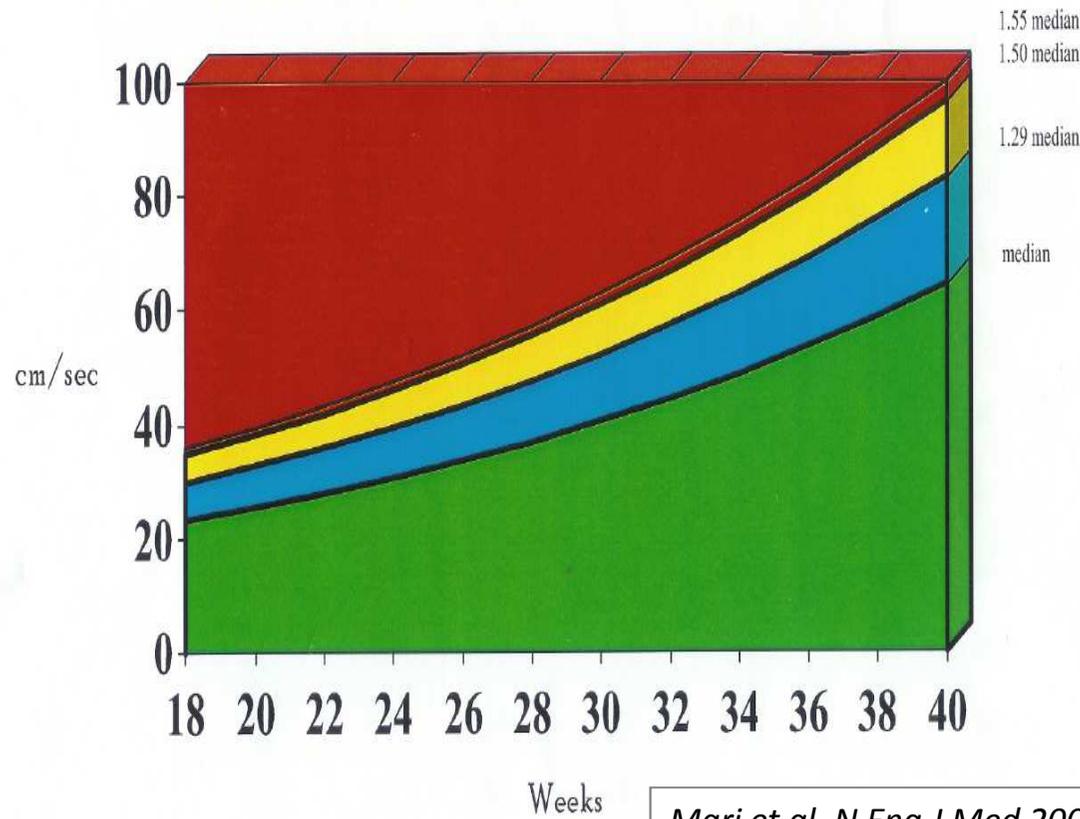
Mari et al. N Eng J Med 2000;342:9-14.

Specificity 88-100%

Zimmermann et al. Br J Obstet Gynecol 2002;109:746-52.

Mari et al. Ultrasound Obstet Gynecol 2002;99:589-93.

EXPECTED PEAK VELOCITIES OF SYSTOLIC BLOOD FLOW IN THE MIDDLE CEREBRAL ARTERY AS A FUNCTION OF GESTATIONAL AGE*



Mari et al. N Eng J Med 2000

■ <1.00 median ■ median to 1.29 median ■ 1.29 to 1.50 median
■ 1.50 to 1.55 median ■ >1.55 median

*Axial section of the brain including the cavum septum pellucidum and thalami. Middle cerebral artery close to the origin at 0 degrees. Highest point of waveform is recorded

TABLE 3. EXPECTED PEAK VELOCITY OF SYSTOLIC BLOOD FLOW IN THE MIDDLE CEREBRAL ARTERY AS A FUNCTION OF GESTATIONAL AGE.

WEEK OF GESTATION	MULTIPLES OF THE MEDIAN			
	1.00 (MEDIAN)	1.29	1.50	1.55
	cm/sec			
18	23.2	29.9	34.8	36.0
20	25.5	32.8	38.2	39.5
22	27.9	36.0	41.9	43.3
24	30.7	39.5	46.0	47.5
26	33.6	43.3	50.4	52.1
28	36.9	47.6	55.4	57.2
30	40.5	52.2	60.7	62.8
32	44.4	57.3	66.6	68.9
34	48.7	62.9	73.1	75.6
36	53.5	69.0	80.2	82.9
38	58.7	75.7	88.0	91.0
40	64.4	83.0	96.6	99.8

Prediction of fetal anemia by MCA-PSV Doppler compared to Amniocentesi

4 Comparative Studies

Scheier M et al Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. (Ultrasound Obstet Gynecol. 2004)

Pereira L et al. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. (Am J Obstet Gynecol 2003. (N=28)

Bullock R, et al. Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. (Ultrasound Obstet Gynecol 2005, N=38)

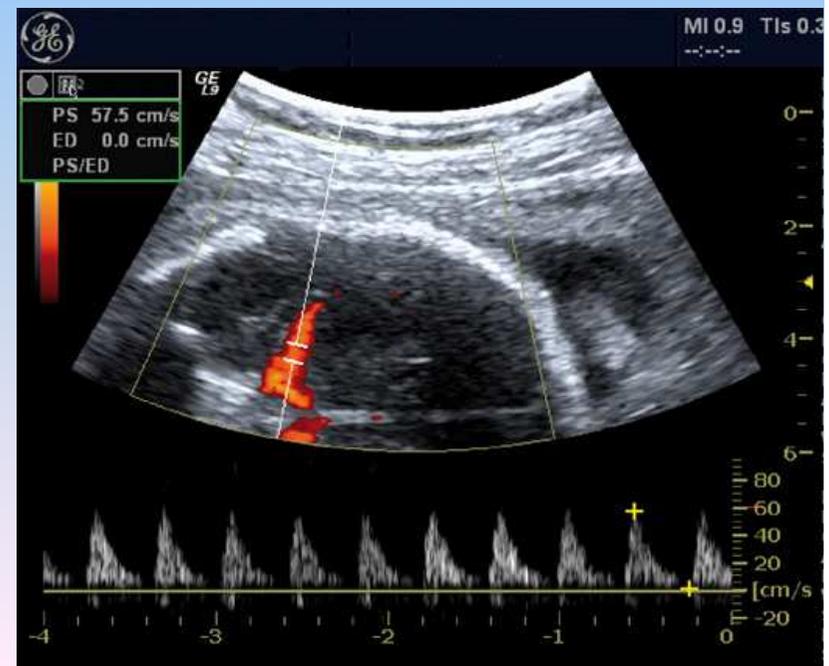
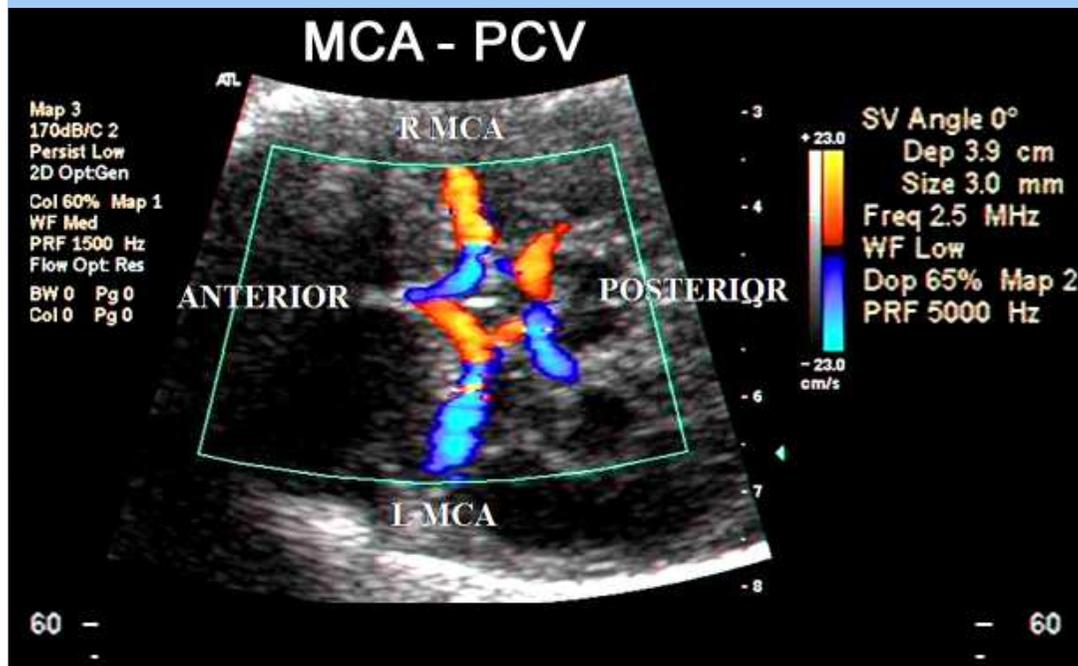
Oepkes D et al. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. (N Engl J Med. 2006 (N=164)

MCA PSV ha sensitività e accuratezza nella diagnostica di anemia fetale moderata-grave nei casi di alloimmunizzazione più alta rispetto amniocentesi con management convenzionale.

Corretta Misurazione MCA PSV

- l'identificazione del Poligono di Willis con Color Doppler;
- l'identificazione dell'arteria cerebrale media e l'ingrandimento dell'immagine, tale da occupare più del 50% dello schermo;
- il campionamento del vaso (volume campione 1 mm) vicino all'origine dell'arteria cerebrale media dalla carotide comune con un angolo vicino allo zero;
- la ripetizione per almeno 3 volte. Il valore da tenere in considerazione è il maggiore.

I risultati sono quindi valutati in funzione dell'età gestazionale ed il riscontro di valori sopra 1,50 MoM costituisce indicazione al prelievo di sangue fetale.



BENEFICI:

Management con MCA-PSV potrebbe eliminare necessità di amniocentesi e riduzione di numero di funicolocentesi nelle gravidanze con alloimmunizzazione Rh, con **diminuzione di rischio** correlato a queste procedure

LIMITAZIONI:

- Angolo di insonazione e MCA distale: sottostima MCA Scheier,2006
- Viscosità di sangue: diminuzione di sensibilità dopo le 2 trasfusioni
- Diminuzione specificità dopo 35 sg
- Dipendente dal operatore,
- Costrizione vascolare intermittente: sovrastima MCA
- Dipende da normale output ventricolare (idropo, cardiomegalia)

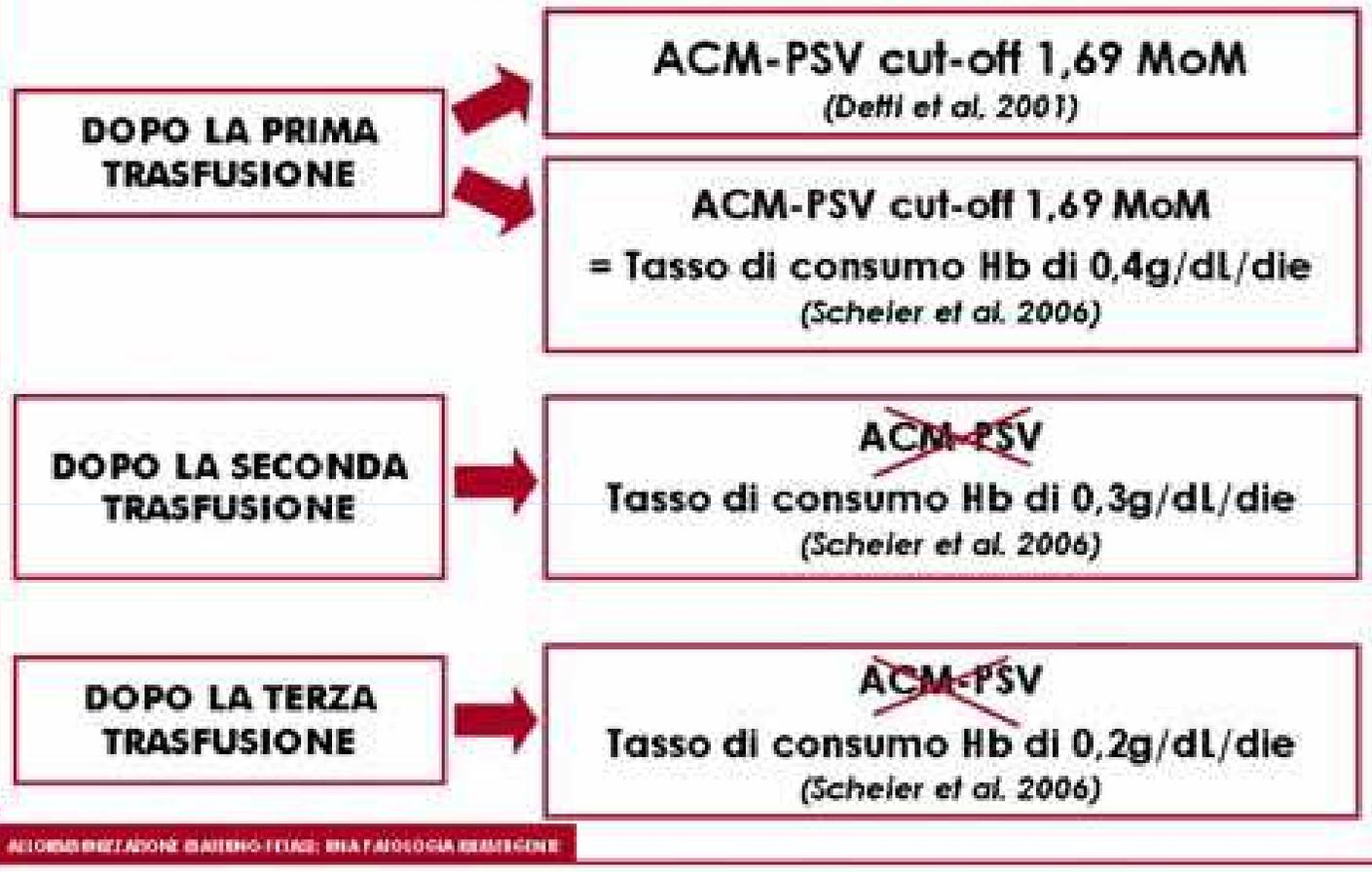
(Middle cerebral artery peak systolic velocity: is it the standard of care for the diagnosis of fetal anemia? J Ultrasound Med. 2005 May;24(5):697-702. Review)

Trasfusione fetale

- Emazie **Rh negative**, prove crociate negative con il siero materno, lavate, filtrate e irradiate, siero e CMV neg
- Emazie concentrate con **ematocrito >85%** per ridurre volume totale infuso
- Solo 10% di gravidanze affette necessità di IUT, 90% buon monitoraggio con MCA PSV
- **MCA PSV >1,50 MoM** (o ascite) → funicolocentesi → $HCT \leq 30\%$
→ **1° trasfusione**

Mari et al Non invasive diagnosis by doppler of fetal anemia due to red blood cell alloimmunization, N Engl J Med 2000

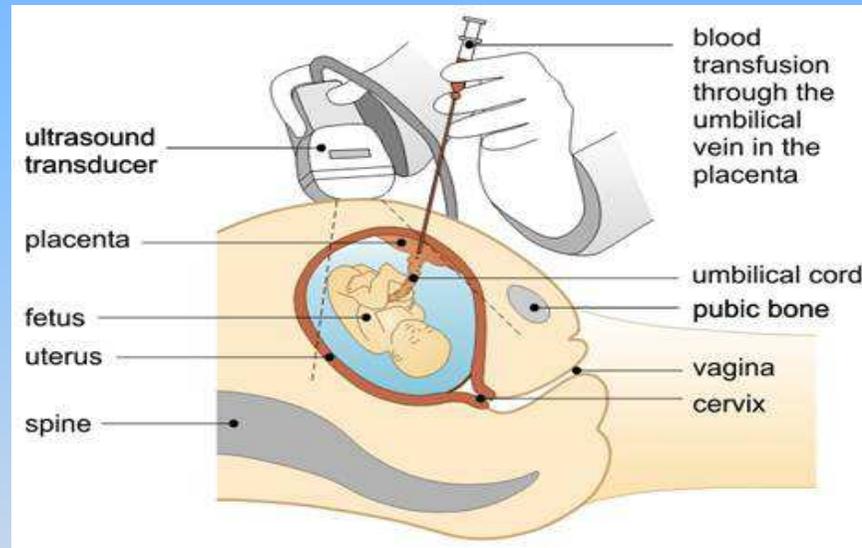
MONITORAGGIO SUCCESSIVO ALLA PRIMA TRASFUSIONE INTRAUTERINA



- Intervallo di trasfusione 15-20 giorni (la sopravvivenza di emazie trasfuse)
- HCT scende di 1% al giorno

Trasfusione fetale

- Funicolocentesi ecoguidata, direttamente nella vena ombelicale (Rodeck et al. 1981)- inserzione cordone vs ansa libera, sedazione fetale



- Programmazione del parto controversa 32-35 sg, sulla base di eco, CTG e MCA PSV
- Sopravvivenza fetale - **88%** totale, **96%** se non idrope (Winnipeg data, Creasy & Resnik, 2005)

Quantità da trasfondere

- Numerose formule che includono età gestazionale, peso fetale, ematocrito iniziale e desiderato, coefficienti di trasfusione
- Trasfondere fino raggiungimento di Ht > 50 %, meno nel caso di feto idropico (badare alla tolleranza del feto)
- Circa 50 cc/kg, da 30-120 ml

Trasfusione intraperitoneale

- Primi anni 60, Liley, oggi usata raramente
- Sopravvivenza superiore con trasfusione intravasale (Harman *et al*, 1990)
- Prove di combinazione di trasfusioni iv e ip (Moise *et al*, 1989)
- Vantaggio : lento assorbimento che porta a HCT più stabile
- Da considerare terapia di seconda linea



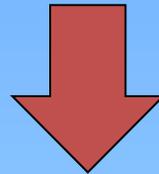
Rischi/complicazioni funicolocentesi

- *Morte fetale* (**1-3%** ogni procedura, van Kamp et al 2006): rischio più alto con feto idrope
 - *Ematoma* intrafunicolare da compressione sui vasi ombelicali;
 - *Bradycardia* fetale (frequente ma di solito transitoria)
 - *Emorragia fetale* irrefrenabile da lacerazione del vaso incanalato;
 - *Emorragie fetali tardive*
 - *Distacco intempestivo di placenta*
 - *PPROM* (**0,1%** per procedura, van Kamp et al 2006)
 - *Corion amniotite* (**0,3%** per procedura, van Kamp et al 2006)
 - *Fallimento* procedura
- 
- Parto prematuro

Maternal plasma exchange

Ripetute plasmaferesi + alte dosi di RhIG ev

(Ruma MS, et al. Combined plasmapheresis and intravenous immune globulin for the treatment of severe maternal red cell alloimmunization. Am J Obstet Gynecol. 2007)



riduzione di titolo anticorpale materno e immunomodulazione materna

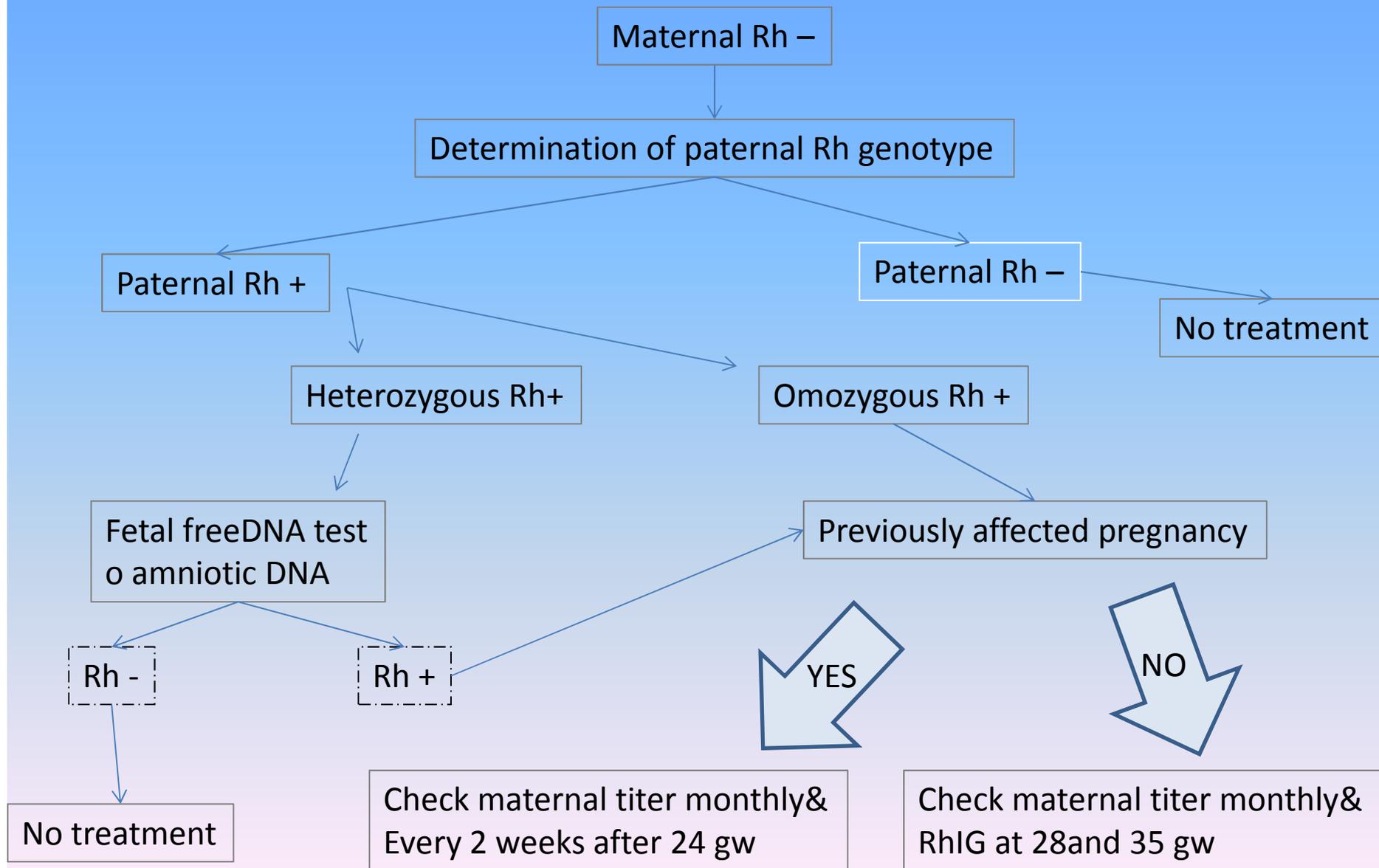
Alonso JG et al. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh haemolytic disease. J Perinat Med 1994

Isojima S et al. Early plasmapheresis followed by high-dose γ -globulin treatment saved a severely Rho-incompatible pregnancy. J Clin Apher. 2011

- Da considerare da 7-20 sg (2007 Guidelines American Society of Apheresis)
- Raramente usata come terapia unica, associata ad IUT

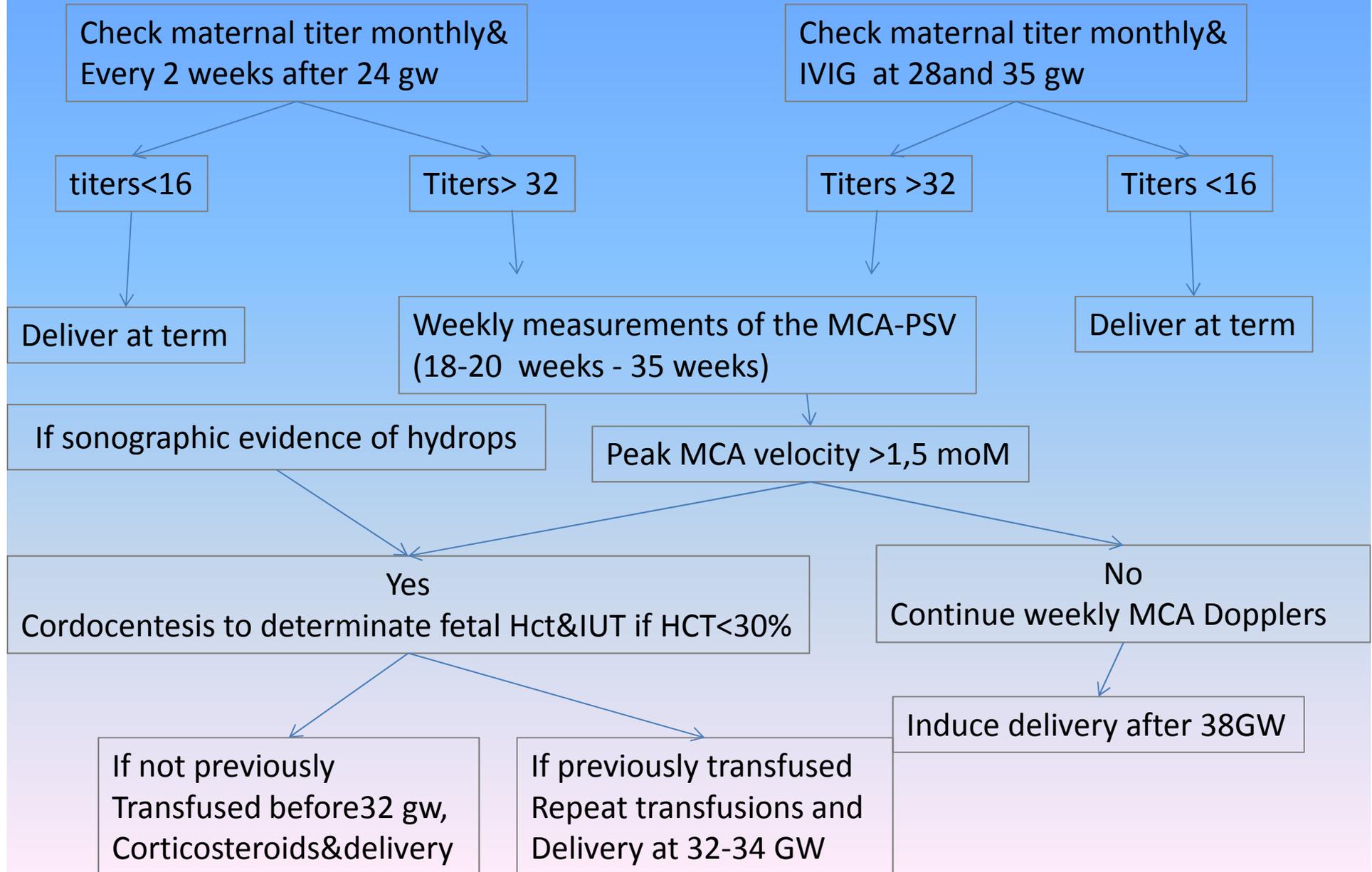
Algoritmo per management di anemia fetale

(Papantoniou et al, Therapeutic management of fetal anemia J. Perinat. Med 2013)



Algoritmo per management di anemia fetale

(Papantoniou et al, Therapeutic management of fetal anemia J. Perinat. Med 2013)



CONCLUSIONI

- Potenziare tecniche non invasive per diagnosi e monitoraggio della anemia con ecografisti esperti:
 - ✓ **MCA PSV** (*Papantoniou et al Increasing the non invasive management of Rh isoimmunization Int J Gyn Obs 2008*)
 - ✓ **Free fetal DNA** nella circolazione materna per stabilire emogruppo fetale (*Tounta et al PCR for non invasive fetal RHD genotyping using cell free fetal DNA J Perinat Med 2011*)
- Standardizzazione dei protocolli per plasma exchange (dosaggio Ig, intervalli plasmateresi, precise indicazioni per inizio e fine della terapia)
- IUT solo nei centri specializzati con personale esperto
- Programma profilassi post partum e antinatale standardizzato e introdotto in tutti i paesi
- Introduzione RhIG ricombinante

Isoimmunizzazione Rh

Revert back to “conventional management” if: ≥ 3 intrauterine transfusions, or one of the cases mentioned previously where reliability of MCA-PSV not yet established

Titolo anticorpale maggiore 1:32 →

Amniocentesi / spettrofotometria se OD 450 seriate

- Zona 1 Liley diagramma
 - Controllo dopo 2-3 settimane
 - Espletamento del parto a termine
- Zona 2
 - Controllo ogni settimana
 - Eventuale trasfusione o espletamento del parto (epoca gestazionale)
- Zona 3
 - Espletamento del parto
 - Trasfusione fetale