

IL SERVIZIO TRASFUSIONALE OGGI: CRITERI EMOMETRICI PER LA SELEZIONE E LA GESTIONE DEL DONATORE

Atti del Convegno, 6 novembre 2007, Roma



Con il patrocinio di:



SIMTI Lazio



SIDEM Lazio

Evento promosso da HORIBAABX Diagnostics

**IL SERVIZIO TRASFUSIONALE OGGI:
CRITERI EMOMETRICI PER
LA SELEZIONE E LA GESTIONE
DEL DONATORE**

Atti del Convegno
6 novembre 2007, Roma

Il dono del sangue e degli emocomponenti rappresenta un processo sanitario complesso che muove dall'iniziale disponibilità e motivazione consapevole di un potenziale donatore o donatrice e procede poi, lungo un percorso di puntuale informazione e di successiva valutazione del relativo stato d'idoneità, alla donazione sotto la conduzione e la vigilanza dei professionisti delle attività specialistiche di medicina trasfusionale. Sia nella donazione periodica che nella donazione occasionale (o sostitutiva) il processo di valutazione dell'idoneità del donatore presenta caratteri di estemporaneità che devono tuttavia garantire un adeguato approfondimento dei parametri ematologici dello stesso donatore. Il dono sottrae componenti ematiche in quantità compatibile con il pronto ripristino di una capacità ossiforetica ed emostatica appropriate alle normali attività quotidiane di un dato individuo ma ciò si realizza in presenza di condizioni ematologiche e cardiocircolatorie di base normali e conservate. Generalmente la concentrazione emoglobinica del sangue periferico di un dato individuo, valutabile anche con emoglobimetri su prelievi di sangue capillare, esprime in maniera semplificata ed uniparametrica la capacità ossiforetica di un dato donatore; tale valutazione analitica consente in pochi minuti di valutare la capacità di un donatore non affetto da patologie che escludano la donazione di emocomponenti di poter tollerare con sicurezza e possibilità di compenso ossiforetico la sottrazione di un unità di sangue intero (circa 450 ml). Approssimativamente, il decremento di emoglobina determinato da un dono di 450 ml di sangue intero può essere ottenuto attraverso la seguente formula: $Hb \text{ g/dL post-dono} = Hb \text{ g/dL pre-dono} - (450 * Hb \text{ g/dL pre-dono} / 70 * Kg \text{ peso corporeo})$ che dimostra come in un soggetto di 50 kg e 12,5 g/dL di Hb (tali parametri costituiscono i minimi valori accettabili per l'arruolamento al dono di sangue intero in un soggetto di sesso femminile) il dono produca il raggiungimento di un valore di Hb post-dono di 10,6 g/dL. Valori prossimi ad una concentrazione di 10 g/dL di Hb post-dono rappresentano ancora condizioni di trasporto d'ossigeno adeguate per un'attività fisica di base e per un'attività psichica congrua a condizione che il donatore possa contare su di un rapido recupero della concentrazione emoglobinica attraverso una rigenerazione appropriata e rapida dell'eritrono, al fine di riacquisire una capacità ossiforetica che consenta l'esercizio fisico al di là delle attività di base ed una prestazione psichica adeguata ad ogni circostanza. In tale contesto, la valutazione univoca ed isolata della concentrazione emoglobinica non fornisce alcun parametro aggiuntivo circa lo stato morfologico degli eritrociti del sangue periferico che potrebbe svelare preco-

cemente fatti carenziali associabili a significativi rallentamenti dell'attività di recupero eritropoietico. Un esempio significativo di tale evenienza è la precoce comparsa di una riduzione del volume globulare (MCV) associato a riduzioni del contenuto e della concentrazione emoglobinici medi (MCH e MCHC, rispettivamente) con incremento di fenomeni di anisocitosi documentabili dal parametro RDW in soggetti con iniziale stato sideropenico i quali, se sottoposti ad un ulteriore dono di sangue intero o emocomponenti includenti un'unità di emazie concentrate, perderebbero un ulteriore quantitativo di ferro pari a circa 250 mg per dono su un patrimonio corporeo di ferro totale oscillante tra i 3-5 g. Appare chiaro come una valutazione non estemporanea di tali parametri predittivi ed a dono avvenuto, non possano in alcun modo consentire di preservare il donatore con iniziale carenza dall'ulteriore perdita del componente carente, in circostanze per le quali la condizione di carenza dovrà essere comunque indagata per le possibili cause con successiva istituzione di una terapia appropriata basata sul supplemento farmacologico del componente con astensione temporanea dal dono di sangue intero o emocomponenti includenti emazie concentrate. L'incremento significativo dell'MCV rappresenta un'evenienza più rara ma comunque costituisce una condizione suggestiva e predittiva di eritropoiesi inefficace per fatti carenziali o altre alterazioni della filiera eritroide. Anche in tal caso il donatore dovrà poter giovare di una valutazione emometrica multiparametrica estemporanea per essere prontamente escluso dal dono in condizioni ematologiche come quelle descritte. Similmente, altri parametri forniti dall'esame emometrico multiparametrico estemporaneo possono segnalare alterazioni che impongano una esclusione temporanea dal dono. In particolare in condizioni di neutrofilia assoluta (neutrofili $\geq 8500/\mu\text{L}$) o neutropenia assoluta (neutrofili $\leq 1000/\mu\text{L}$) il donatore deve beneficiare di una sospensione temporanea dalla donazione e devono essere approfonditi ed indagati possibili motivazioni cliniche che possano essere alla base dell'alterazione emometrica osservata con controllo a distanza sia per le condizioni cliniche generali sia per il quadro emometrico. Analogamente, un atteggiamento di assoluta prudenza con conseguente sospensione dal dono va adottato, sempre essendosi precedentemente avvalsi dell'emometria estemporanea multiparametrica del donatore, nei casi in cui sia evidenziabile una conta monocitaria che presenti un valore superiore ai 1000 elementi per μL di sangue periferico o in quei casi in cui si osservi una conta linfoide ≥ 4500 o ≤ 1000 elementi $/\mu\text{L}$. Lo studio emometrico di secondo livello dei donatori che dovessero presentare un quadro monocitario o linfoide come quello descritto dovrebbe prevedere un immediato studio citomorfologico dello striscio di sangue periferico e, nei casi in cui sia presente un'alterazione della componente linfoide, un'analisi percentuale od assoluta delle sottopopolazioni linfocitarie in citometria a flusso, associata o meno alla sierologia per agenti microbiologici con tropismo linfoide. L'analisi emometrica multiparametrica estemporanea permette, inoltre, la valutazione della conta piastrinica che indica la capacità di un dato donatore, in assenza di trombocitopatie, di poter garantire una fisiologica attività del processo emostatico primario. Sebbene il dono del sangue intero non determini decrementi significativi della conta piastrinica, il donatore arruolabile a tale procedura do-

vrebbe avere una conta non inferiore a 120.000 elementi/ μL e comunque non superiore a 500.000 per μL , dato che incrementi del conteggio di tale entità potrebbero suggerire un processo flogistico in atto od un'iniziale alterazione ematica associabile a fenomeni di mieloproliferazione primaria. In tale contesto ed ove siano evidenziabili casi di piastrinopenia dovrebbe essere sempre indagata l'evenienza di una pseudopiastrinopenia da EDTA, con scrupoloso studio dello striscio periferico per la ricerca di aggregati piastrinici e con la riesecuzione della conta piastrinica su un nuovo prelievo raccolto in citrato. Una valutazione a parte merita il caso del donatore di emocomponenti in aferesi con procedure uni- o multi-componente, includenti la raccolta di uno o due concentrati piastrinici, dove il donatore può essere validamente arruolato solo nei casi in cui si sia in presenza di conte piastriniche che garantiscano una concentrazione pre-donazione non inferiore alle 150.000 piastrine per μL , nel caso della raccolta di un singolo concentrato, ed alle 250.000 piastrine μL ove vengano raccolti contemporaneamente due concentrati piastrinici. Pertanto, la donazione di concentrati piastrinici in aferesi, che rappresenta la metodologia d'elezione per l'approvvigionamento piastrinico data la capacità di tale strategia di produrre unità terapeutiche a maggior valore quali/quantitativo, non è realizzabile in assenza di una valutazione emometrica multiparametrica estemporanea ed in tale contesto, ove la conta estemporanea non venga eseguita con sistemi che consentano l'esecuzione dell'esame su sangue capillare dopo digitopuntura, si rende necessario il prelievo di sangue venoso pre-donazione attraverso un'iniziale venipuntura, alla quale farà seguito inevitabilmente la seconda venipuntura per la raccolta del dono. Quanto detto dimostra i potenziali vantaggi dell'uso di sistemi emometrici multiparametrici per l'esame estemporaneo su sangue capillare in corso di digitopuntura che generano un emocromo multiparametrico immediato e consentono di evitare sia un'addizionale venipuntura del donatore d'aferesi piastrinica, sia l'esame emometrico post-donazione e quest'ultima circostanza riguarda sia il donatore d'aferesi piastrinica che il donatore di sangue intero. D'altra parte, il Decreto 3 marzo 2005 "Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti" indica l'esame emocromocitometrico come una valutazione 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 a tale procedura. Pertanto una legittima interpretazione della base clinico-trasfusionale che ha guidato il legislatore indicherebbe che il processo di arruolamento al dono in senso generico, e ciò sia di sangue intero che di emocomponenti in aferesi, dovrebbe prevedere l'esame preliminare e propedeutico di tutti i parametri classicamente analizzati dall'esame emocromocitometrico con la definizione di intervalli emometrici, oltre quelli specificatamente definiti dal legislatore nel suddetto decreto, entro i quali (e non oltre) arruolare il donatore, in un contesto di assoluta tutela, che in tal modo sarebbe preservato da una donazione effettuata in condizioni ematologiche non note e talvolta subottimali. Una strategia emometrica come quella descritta si dimostrerebbe in linea con la base scientifica che ha ispirato il legislatore, massimamente conservativa in termini di tutela dello stato di salute del donatore che potrebbe essere immedia-

tamente indagato su tutti i parametri emometrici che devono confermare la sua eleggibilità al dono e sicuramente costo/efficace in quanto diverrebbe l'unico momento di analisi emometrica dell'intero processo, non costringendo a venipunture addizionali, ad esami emometrici post-dono ed all'esecuzione di doni giudicati successivamente non idonei e quindi da eliminare, in quanto raccolti da donatori portatori di alterazioni rilevanti di un dato parametro emometrico.

"Il controllo emometrico del donatore di emocomponenti"

Luca Pierelli

*Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Ovest
Azienda Ospedaliera San Camillo - Forlanini*

L'EMOCROMO DA DIGITOPUNTURA PRE-DONAZIONE, SISTEMA DI QUALITÀ E SODDISFAZIONE DEL PAZIENTE

Lazzaro Di Mauro

U.O. Medicina Trasfusionale

Ospedale "Casa sollievo della sofferenza"

Istituto di Ricovero e Cura a carattere Scientifico S. Giovanni Rotondo (FG)

Il D.M. 26.1.01 prevede (all.5) che "prima di ogni donazione, il candidato donatore deve essere sottoposto all'esame per la determinazione dell'Hb o dell'Hct", e che (all.7) "ad ogni donazione deve essere sottoposto ad emocromo completo".

In base alle indicazioni dettate dalle attuali normative in materia trasfusionale, presso la nostra struttura, si procedeva alla determinazione dell'Hb pre-donazione mediante digitopuntura ed il prelievo per l'emocromo completo al termine della donazione insieme agli altri esami di legge.

Spesso sono state osservate divergenze, a volte anche nette, tra il valore dell'Hb pre e post donazione, inoltre, era evidente che un processo così definito prevedeva una doppia spesa relativa all'ulteriore determinazione dell'esame emometrico post-dono.

In virtù di quanto illustrato, abbiamo cominciato in via sperimentale ad utilizzare il sistema ABX Micros 60 per la valutazione pre-donazione, prima nel SIT e poi anche nelle raccolte esterne. È stato scelto questo sistema, perché lo stesso permette la determinazione di 18 parametri da sangue intero proveniente da digitopuntura senza pre-diluzione, utilizzando solo 10 µl di sangue, in un tempo di circa 1 minuto.

Prima di rendere operativo il sistema, abbiamo controllato 186 donatori ai quali è stato chiesto il consenso di effettuare un doppio prelievo: una digitopuntura ed un prelievo per emocromo in K3EDTA.

Il prelievo, dopo essere stato esaminato su ABX Micros 60, è stato inviato al Laboratorio per un confronto con lo strumento BAYER ADVIA 120.

Il confronto statistico tra i risultati non ha messo in evidenza differenze significative da un punto di vista emometrico.

Le discrepanze sono state in media di 0,15 g/dl per l'Hb, di $0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ per gli eritrociti e di $0,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ per le piastrine.

In base a questi risultati, abbiamo attivato il sistema ABX Micros 60, sia nel SIT che per le raccolte esterne, consolidando una strategia che ci consentiva di ovviare così a due non conformità evidenziate dal nostro sistema di qualità: una relativa alla spesa e l'altra relativa alle discrepanze sui risultati di Hb pre e post donazione.

La compattezza e la maneggevolezza dello strumento ha permesso un facile utilizzo all'esterno del Servizio, dimostrandosi inoltre, particolarmente utile per le donazioni di piastrine da noi eseguite anche nelle sedi periferiche, ottenendo la conta piastrinica senza utilizzare gli accessi vascolari del paziente donatore.

Attualmente lo strumento è interfacciato con il gestionale del Servizio, permettendo il trasferimento e la memorizzazione automatica dei dati nella cartella personale software del donatore.

LA RAZIONALIZZAZIONE DEL PERCORSO DI DONAZIONE E DEI COSTI

Emilio Mannella

UOSD Raccolta, Produzione e
Validazione Emocomponenti, DMT
Roma Ovest, Azienda Ospedaliera
S. Camillo Forlanini - Roma

Nel corso degli ultimi decenni le varie normative relative alla selezione del donatore di sangue e/o emocomponenti, hanno introdotto criteri più stringenti e appropriati in modo da rendere la terapia trasfusionale sempre più sicura e allo stesso tempo tutelare la salute del donatore. Il DM 27/12/90 prevedeva, per il donatore periodico, l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico completo solo ogni 3 donazioni per gli uomini e ogni 2 per le donne.

Successivamente il DM 3-04-2001 ha introdotto l'obbligo di eseguire l'emocromo ad ogni donazione, includendo di fatto tale indagine fra gli esami necessari per la validazione biologica dell'unità di sangue; inoltre ha previsto, per il donatore periodico, il dosaggio della ferritinemia almeno una volta l'anno. Questa specifica indicazione se da una parte ha lo scopo di garantire una buona qualità del prodotto in termini di incremento della sicurezza e dell'efficacia terapeutica, dall'altra consente di porre maggiore attenzione nella prevenzione di eventuali disordini ematologici per il donatore stesso.

8

Le attuali normative in materia trasfusionale, nazionali (Legge n. 219/05 – *Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati*) e comunitarie (DL 191/95 – *Attuazione della direttiva 2002/98/CE che stabilisce norme di qualità e sicurezza per la raccolta, il controllo, la lavorazione, la conservazione e la distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti*), nonché i DM attuativi 03/03/2005 (*Protocolli per l'accertamento dell'idoneità del donatore di sangue ed emocomponenti. – Caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti*) ridefiniscono le norme e le modalità per la tutela e la sicurezza dei donatori di sangue, dei prodotti del sangue e dei riceventi "al fine di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana"

Riferendosi all'esame emocromocitometrico non vi è alcun dubbio che l'indagine sullo stato ematologico del donatore, soprattutto se periodico, costituisca uno strumento cardine nel processo della donazione per entrambi i soggetti coinvolti all'inizio e alla fine della catena trasfusionale: il donatore e il ricevente. L'esecuzione dell'emocromo completo pre-donazione mostrando i valori multiparametrici, emoglobina, eritrociti, leucociti, piastrine, consente una valutazione accurata dell'idoneità del candidato donatore e può rilevare una eventuale precoce alterazione dei valori diventando un efficace strumento di prevenzione. In particolare, in caso di donatore di emocom-

ponenti mediante procedure aferetiche o mediante donazione multicomponente, l'emocromo pre-donazione rappresenta uno strumento diagnostico indispensabile ai fini della valutazione dell'idoneità del donatore che deve accedere alle diverse tipologie di procedura di raccolta.

Lo sviluppo delle tecnologie ha consentito già da tempo di abbandonare la determinazione dell'emoglobina pre-donazione mediante solfato di rame, pur essendo tale tecnica nella sua semplicità molto affidabile ma sicuramente incapace di evidenziare incrementi patologici della concentrazione ematica della stessa. In sostituzione la scelta più diffusa è stata l'impiego di emoglobinometri portatili che consentono, in genere mediante tecniche colorimetriche, il dosaggio dell'emoglobinemia. L'ulteriore sviluppo ha reso disponibili strumenti più complessi ma nello stesso tempo maneggevoli ed attendibili che consentono l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico completo da prelievo capillare. In linea con un diverso approccio organizzativo all'interno di moderne realtà ospedaliere basato sul concetto di "point of care" che prevede l'esecuzione di esami emodiagnostici al letto del malato sono stati valutati diversi analizzatori capaci di coniugare tecnologie avanzate e strumentazioni di piccole dimensioni da utilizzare per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico in pre-donazione.

Si tratta, quindi, di strumenti di piccole dimensioni, ben standardizzati, di facile impiego e in grado di fornire in tempi brevi risultati affidabili e completi. In particolare per ciò che concerne l'area ematologica consentono l'esecuzione dell'emocromo completo in brevissimo tempo (da 1 a 2 minuti), utilizzano microvolumi di sangue anche capillare, e forniscono un profilo di parametri più o meno esteso. La loro utilizzazione nell'area trasfusionale offre, quindi, la possibilità di eseguire durante la procedura di valutazione di idoneità del donatore un'analisi multiparametrica (emocromo completo da capillare) anziché monoparametrica (dosaggio dell'emoglobina) mediante digitopuntura senza aumento dei tempi d'attesa, anzi con riduzione degli stessi per le donazioni in aferesi e in multicomponent. Inoltre la valutazione globale dei dati dell'emocromo in tempo reale consente maggiore appropriatezza nella definizione dell'idoneità del donatore per le diverse tipologie di approccio alla donazione stessa.

La continua disponibilità di tecnologie avanzate applicabili anche ai processi trasfusionali e il contemporaneo e consequenziale aumento degli standard di qualità di prodotto e servizio richiesti dalle normative vigenti, impongono sempre più una revisione costante ed una razionalizzazione dell'organizzazione del servizio per renderlo adeguato alle nuove necessità in termini di efficacia, sicurezza ed economicità. Sempre più con il passare del tempo il servizio trasfusionale e gli emocomponenti sono assimilabili ad una produzione di tipo farmaceutico con standard cogenti di servizio e di prodotto.

Nell'ottica di un miglioramento dell'approccio alla selezione del donatore, soprattutto ai fini della tutela della sua salute e dell'affidabilità dei dati critici per l'idoneità alla donazione quali quelli riferibili alla crasi ematica, presso il nostro centro, abbiamo iniziato sperimentalmente ad effettuare l'esame emocromocitometrico completo da

sangue capillare pre-donazione mediante digitopuntura, cercando di valutare anche l'impatto sull'organizzazione del servizio.

Metodologia

Inizialmente è stata effettuata la valutazione comparativa fra gli analizzatori ematologici, che utilizzano sangue capillare ottenuto mediante digitopuntura, prendendo quale riferimento il contaglobuli in uso nella nostra struttura. Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- dimensioni dell'apparecchiatura
- agibilità di trasporto soprattutto in relazione all'impiego in strutture mobili di prelievo e in sale estemporanee
- autonomia di funzionamento mediante batteria
- volume del campione richiesto
- tempo di esecuzione del test
- numero di parametri analizzati
- dati tecnici connessi all'affidabilità dei risultati (ripetibilità, linearità, accuratezza della misura, ecc.).

Successivamente è stato valutato l'impatto dell'introduzione del test multiparametrico sull'organizzazione delle attività.

Il profilo ematologico di circa 500 donatori di sangue è stato analizzato in fase pre-donazione eseguendo un esame emocromocitometrico da prelievo capillare e utilizzando inizialmente l'analizzatore ematologico Abacus junior (Diatron) a 18 parametri (250 donatori) e successivamente l'analizzatore ABX Micros 60 (250 donatori). Sugli stessi donatori è stato eseguito al termine della donazione un emocromo completo da prelievo venoso utilizzando rispettivamente l'analizzatore ematologico Cell-Dyne 3500 (Abbott) e successivamente ACT5 Diff Coulter della IL. Nella fase pre-donazione i valori dell'Hb sono stati valutati anche mediante emoglobinometro (HemoCue, HemoCue AB)

I risultati dei profili ematologici ottenuti con le 2 diverse modalità di prelievo ed analisi sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test non parametrici per dati appaiati (Test di Wilcoxon) relativamente ai seguenti parametri: emoglobina (Hb), conta dei leucociti (WBC), dei globuli rossi (RBC) e delle piastrine (PLT).

Sono state inoltre effettuate misurazioni parallele su tutte le strumentazioni utilizzando gli stessi campioni di controllo con diversi profili, alto, medio, basso, al fine di poter paragonare la *performance* dei diversi analizzatori.

Risultati

Il confronto statistico tra i risultati del profilo ematologico pre-donazione mediante prelievo capillare e post-donazione da prelievo venoso utilizzando rispettivamente gli analizzatori Abacus junior (Diatron) e Cell-Dyne 3500 (Abbott) ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le 2 misurazioni effettuate per tutti i parametri presi in considerazione, in particolare, anche rilevanti da un punto di vista

emometrico, per i parametri globuli bianchi e piastrine. In dettaglio, sono risultati statisticamente più elevati i valori di Hb, WBC (per questo parametro, come già detto, la differenza appariva rilevante anche da un punto di vista emometrico) e RBC e significativamente inferiori i valori di PLT (anche per tale parametro la differenza assumeva anche rilevanza emometrica) misurati da digitopuntura prima della donazione rispetto a quelli misurati successivamente alla donazione. Non sono state invece riscontrate differenze emometricamente significative (seppur statisticamente significative) fra le misurazioni degli stessi parametri effettuate in pre-donazione con l'apparecchio ABX Micros 60 e in post donazione con l'analizzatore AcT5 Diff Coulter IL, fatta eccezione per il parametro della conta piastrinica ove il sangue capillare genera una sottostima sistematica di circa 35.000/40.000 unità/ul.

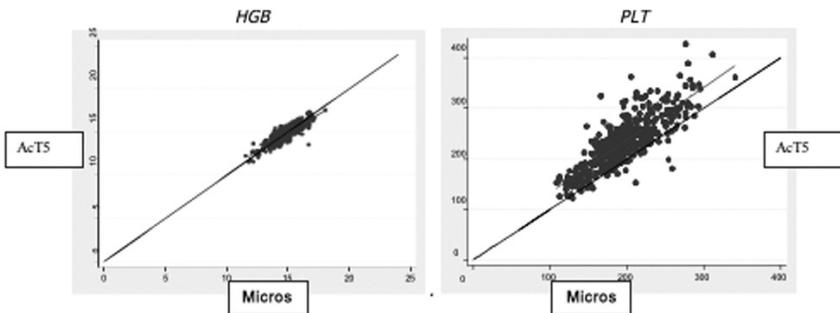
parametro	n	r	p
wbc	413	0.91	***
rbc	413	0.91	***
hb	413	0.89	***
ht	413	0.87	***
mcv	413	0.95	***
mch	413	0.92	***
mchc	413	0.20	***
plt	413	0.82	***
n	413	0.86	***
l	413	0.89	***
m	413	0.48	*
n #	413	0.95	***
l #	413	0.81	***
m #	413	0.59	***

#conta assoluta

*p<0.05

**p<0.01

***p<0.001



ABX Micros 60 su sangue capillare

AcT5 Diff su sangue venoso

parametro	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Min	Max	p
wbc	413	6.31	1.6	1.2	13.8	6.13	1.48	2.83	12.04	***
rbc	413	5.09	0.4	3.85	6.31	5.02	0.41	3.61	6.21	***
hb	413	14.87	1.1	11.6	18.1	14.78	1.00	11.5	17.5	***
ht	413	43.24	3.1	34	52.8	42.89	2.93	33	51.7	***
mcv	413	85.09	3.5	72	96	85.65	3.98	70.2	98.1	***
mch	413	29.28	1.4	23.9	33.6	29.52	1.44	23.8	33.8	***
mchc	413	34.39	0.5	32.6	36.7	34.47	0.50	33	35.9	***
plt	413	195.84	40.5	108	340	233.73	51.63	123	428	***
n	413	57.86	7.4	35.6	80.2	54.19	7.26	28.9	77.2	***
l	413	35.01	6.9	12.5	58.5	34.17	6.61	11.7	52.9	***
m	413	7.12	1.5	3.1	12.6	7.92	1.74	4.2	15.7	***
n #	413	3.78	1.2	0.7	10.7	3.36	1.10	1.41	8.73	***
L #	413	2.13	0.6	0.4	4.3	2.06	0.52	0.8	4.27	***
m #	413	0.39	0.1	0.1	0.7	0.48	0.15	0.16	1.52	***

conta assoluta

* p<0.05

**p<0.01

***p<0.001

Risultati di regressione lineare tra le conte emometriche ottenute su sangue capillare in pre-donazione con ABX Micros 60 ed in post-donazione su sangue venoso con AcT5 Diff Coulter in una stessa popolazione di donatori di sangue ed emocomponenti

Risultati di comparazione statistica per dati appaiati tra le conte emometriche ottenute su sangue capillare in pre-donazione con ABX Micros 60 ed in post-donazione su sangue venoso con AcT5 Diff Coulter in una stessa popolazione di donatori di sangue ed emocomponenti.

Le misurazioni dei campioni di controllo effettuate contemporaneamente e ripetutamente su entrambe le strumentazioni hanno mostrato risultati paragonabili e ripetibili.

Complessivamente da questa sperimentazione è emerso che:

- I contatori cellulari utilizzano diverse aliquote di sangue capillare anche in funzione del numero di parametri che sono in grado di eseguire, da 18 a 26. Solo l'analizzatore ABX Micros 60 necessita di soli 10µl per l'analisi di 18 parametri.
- Il tempo di esecuzione dell'emocromo completo compresa la stampa del referto varia da 2 min (Abacus Junior 5) ad 1 min (ABX Micros 60)
- I 2 contatori cellulari che utilizzano sangue capillare si sono dimostrati affidabili per la misurazione dei vari parametri dell'emocromo e hanno fornito risultati in linea con quelli forniti dal sistema utilizzato in laboratorio per prelievi di sangue venoso, tuttavia i medesimi sottostimano sistematicamente il numero delle piastrine. L'ABX Micros 60 ha fornito risultati emometricamente comparabili per tutti i parametri eccetto la conta piastrinica ove l'analisi su sangue capillare determina una sistematica ma riproducibile sottostima (la differenza appare ascrivibile alle

caratteristiche del sangue capillare dato che lo stesso strumento produce conte piastriniche emometricamente comparabili al sistema di riferimento qualora vengano utilizzati campioni di sangue venoso).

- I valori di Hb misurati mediante emoglobimetri risultano sistematicamente sovrastimati rispetto ai valori misurati dagli analizzatori ematologici e la differenza nei valori riscontrati spesso risulta superiore a 0,8 g/100ml (vedi tabella e legenda sottostante).

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max	p
emoglobimetro	161	15.17	1.08	12.6	17.2	
ABX Micros 60	161	14.81	0.98	12.2	16.8	***
Act5 Diff Coulter	161	14.80	0.98	11.5	17.3	***

* p<0.05

**p<0.01

***p<0.001

Comparazione statistica per dati appaiati della concentrazione di Hb g/100ml ottenuta in pre-donazione su sangue capillare da analisi con emoglobimetro o ABX Micros 60 ed in post-donazione su sangue venoso con Act5 Diff Coulter

- L'emocromo eseguito da prelievo capillare necessita di un'attenta manualità da parte dell'operatore. La fase critica è costituita dal tempo di prelievo che deve essere il più breve possibile per evitare soprattutto l'aggregazione piastrinica e quindi la sottostima del numero di piastrine. La riduzione del volume di campione richiesto semplifica la procedura di prelievo capillare.
- Costituisce invece un vantaggio tecnico di rilievo l'esecuzione immediata del test dopo il prelievo capillare poiché ciò consente di evitare le problematiche connesse alla conservazione del campione.

Impatto dell'esecuzione dell'emocromo da sangue capillare pre-donazione sul percorso della donazione del sangue e sui costi.

L'esecuzione dell'emocromo completo pre-donazione anziché il semplice dosaggio dell'emoglobinemia, rappresenta un notevole vantaggio per le strutture trasfusionali, in quanto consente una selezione più accurata del donatore di sangue intero basata sull'analisi di più parametri ematologici e quindi una maggiore tutela della salute del donatore. Inoltre l'esecuzione immediata dell'esame emocromocitometrico mediante digitopuntura nel contesto della selezione del donatore si riflette anche in un aumento della *compliance* del donatore stesso che percepisce una maggiore attenzione al suo stato di salute. Vantaggi di tipo organizzativo ed economico derivano dal fatto che l'esecuzione dell'emocromo pre-donazione:

- consente di evitare il prelievo di unità di sangue che potrebbero risultare non idonee alla produzione di emocomponenti con una migliore economia di gestione;
- indirizza verso la tipologia di prelievo più idonea per le caratteristiche del donatore;
- indirizza verso la tipologia di lavorazione più efficiente delle unità di sangue intero migliorando la qualità degli emocomponenti prodotti;
- potrebbe permettere l'esecuzione di un solo test, emocromo completo da digito-

puntura, invece del doppio test, dosaggio dell'emoglobina pre-donazione ed emocromo post-donazione con vantaggi di tipo economico ed organizzativo, sebbene il prelievo venoso è ancora la modalità più idonea per garantire un campione adeguato alle esigenze analitiche

- qualora l'esame emocromocitometrico non venga eseguito nell'area validazione del SIMT permette di poter effettuare all'interno del servizio, e quindi con immediatezza, i controlli di qualità degli emocomponenti consentendo una migliore gestione della qualità
- infine, l'esecuzione dell'emocromo da sangue capillare, sia nelle sale prelievo fisse, che in quelle estemporanee e sulle autoemoteche, ha permesso di adottare criteri uniformi di selezione del donatore di sangue intero e di emocomponenti.

Considerazioni

La valutazione dei dati ottenuti dal confronto tra le varie apparecchiature indica che le strumentazioni utilizzate sono in grado di fornire risultati affidabili e ripetibili e che le differenze significative osservate tra i risultati dei due profili pre e post-donazione sembrerebbero riferibili soprattutto alla diversa modalità di prelievo e alle diversità reologiche tra sangue capillare e sangue venoso. In particolare il prelievo capillare è particolarmente critico e necessita di accuratezza e rapidità di esecuzione al fine di evitare l'aggregazione piastrinica. L'eliminazione dell'esecuzione dell'emocromo post-donazione potrebbe tuttavia risultare critica in considerazione del fatto che il prelievo venoso resta comunque la modalità più idonea per garantire un campione adeguato alle esigenze analitiche di tipo ematologico e, inoltre, va sottolineato che tutti gli analizzatori portatili sono strumenti con limitate potenzialità di analisi di cellule atipiche, aspetto che non deve essere trascurato nel contesto di protocolli di prevenzione della salute del donatore che si presenta come persona apparentemente sana.

Infine, si ritiene opportuno che vengano definite le linee guida per la individuazione di parametri ematologici condivisi ai fini della selezione del donatore ed ai fini della validazione biologica degli emocomponenti. L'esecuzione dell'emocromo nel contesto della selezione del donatore offre parametri di valutazione più accurati rispetto alle misurazioni della sola Hb mediante emoglobinometri con vantaggi per ciò che concerne la tutela della salute del donatore, la scelta della tipologia di donazione, la qualità degli emocomponenti da produrre.

Si ringraziano in particolare i collaboratori Dott. Francesco Zennaro, Dott.ssa Michelina Miceli ed i colleghi delle seguenti Aree di Specializzazione:

Area Donazione

Dott.ssa Roberta Pagnotta

Dott.ssa Filomena Terlizzi

Area Immunoematologia eritrocito-piastrinica

Dott.ssa Daniela Fioravanti

Dott.ssa Antonella Matteocci

Area Validazione e controllo qualità

Dott.ssa Adele Agresti

Dott.ssa Paola Iudicone

Dott.ssa Maria Palange

LINEE DI INDIRIZZO REGIONALI PER LA DEFINIZIONE DEGLI INTERVALLI DI IDONEITÀ DELLE CONTE EMATICHE NEL DONATORE DI EMOCOMPONENTI

S. Coluzzi, G. Girelli.
Dipartimento di Medicina
Trasfusionale Roma Centro
Azienda Policlinico Umberto I
Università "La Sapienza"

Premessa

L'esame emocromocitometrico rappresenta senza dubbio l'indagine da richiedere in prima istanza per verificare lo stato di salute di un individuo e rappresenta sicuramente un criterio di protezione del donatore di sangue, come recepito dalle norme che regolamentano la donazione del sangue nel nostro paese. Infatti, anche se non previsto tra gli esami per la validazione biologica degli emocomponenti, l'esame emocromocitometrico rientra tra gli esami obbligatori ad ogni donazione (Allegato 7 Decreto 3 Marzo 2005).

D'altra parte le norme e le linee guida nazionali e comunitarie richiedono che gli emocomponenti soddisfino requisiti minimi di qualità che a loro volta condizionano sia l'efficacia della terapia trasfusionale sia la tutela della salute del ricevente.

In considerazione della molteplicità di informazioni che l'analisi emometrica multiparametrica può fornire rispetto alla semplice determinazione dell'emoglobina capillare, ed in considerazione del fatto che tale analisi deve essere in ogni caso effettuata nel donatore di emocomponenti in aferesi in base alla normativa vigente, è auspicabile che i Servizi Trasfusionali prevedano l'esecuzione di un esame emocromocitometrico completo rispetto alla semplice determinazione dell'emoglobina capillare in fase di selezione del donatore.

Ciò consentirebbe di evidenziare stati iniziali di carenza marziale; inoltre anomalie della conta leucocitaria e piastrinica ed alterazioni della formula leucocitaria potrebbero sottintendere condizioni patologiche tali da condizionare l'esclusione, anche solo temporanea, del donatore.

Pur considerando le diverse difficoltà organizzative delle strutture trasfusionali regionali, si è ritenuto utile, alla luce di quelli che vengono considerati parametri di normalità nella popolazione e osservando la distribuzione delle frequenze di valori anomali in una popolazione di circa 10.000 donatori nell'arco di tempo di sei mesi, proporre degli intervalli normali di riferimento da utilizzare per l'arruolamento del donatore o in fase di validazione, nei casi in cui la selezione venga effettuata con la determinazione dell'emoglobina capillare.

Campo di applicazione

Tali linee di indirizzo si applicano alla valutazione dei parametri risultanti dall'esecuzione di una analisi emocromocitometrica multiparametrica nel donatore di sangue

e di emocomponenti in caso di esecuzione del prelievo:

- pre-donazione (per l'arruolamento del donatore)
- donazione (selezione effettuata con Hb capillare)

Scopo

L'inserimento delle suddette linee di indirizzo nelle procedure di selezione e/o di validazione dell'unità donata presso le strutture trasfusionali della regione Lazio si prefigge i seguenti obiettivi:

- rendere uniformi in ambito regionale le modalità di selezione/validazione
- migliorare l'accuratezza della selezione del donatore garantendo un maggiore controllo del suo stato di salute
- adattare la tipologia della donazione al singolo donatore implementando le procedure di donazione "multicomponent" in caso di alterazione di alcuni parametri (es. donazione di plasma/piastrine in caso di Hb lievemente < v.n.)
- verificare l'impatto dell'adozione delle linee di indirizzo in ambito regionale sul numero di donatori esclusi e di unità non validate al fine di valutare il possibile inserimento, in una fase successiva, dell'emocromo multiparametrico per l'arruolamento del donatore

Modalità operative

Alla luce di una disamina delle condizioni morbose che potrebbero associarsi ad alterazione numerica o qualitativa degli elementi cellulari del sangue, i valori di accettabilità proposti per i parametri emometrici sono i seguenti:

16

Hb (g/dL): Femmina (F) $\geq 12.5 \leq 17$
Maschio (M) $\geq 13.5 \leq 17.5$

da utilizzarsi per la selezione del donatore, eccezion fatta per il donatore portatore di trait talassemico, che può essere accettato, a discrezione del medico, con valori lievemente inferiori.

In caso di valori di Hb inferiori valutare il donatore per una donazione in aferesi non comprendente globuli rossi.

Nel caso in cui l'emocromo effettuato dopo la venipuntura ed all'inizio della donazione evidenzia un valore di Hb che si discosta da quanto previsto per la selezione, l'unità può essere validata se:

Hb (g/dL): F $\geq 11.5 \leq 17$
M $\geq 12.5 \leq 18$

purchè il controllo di qualità effettuato sulla singola unità di concentrato eritrocitario dia valori in linea con quanto previsto dalla R95(15) e successive modifiche.

MCV (fl): $\geq 80 \leq 100$

da utilizzarsi per la selezione del donatore, eccezion fatta per il donatore portato-

re di trait talassemico in cui il valore di Hb rientri nel range di accettabilità.

In caso di $MCV \geq 70 < 80$ il donatore può essere avviato ad una donazione di emocomponente non comprendente globuli rossi.

Nel caso in cui l'emocromo effettuato dopo la venipuntura all'inizio della donazione avvenuta evidenzi un valore di MCV che si discosta da quanto previsto per la selezione, l'unità può essere validata se:

MCV (fl): $\geq 75 \leq 100$; se $MCV < 75$ il controllo di qualità effettuato sulla singola unità di concentrato eritrocitario deve dare valori in linea con quanto previsto dalla R95(15) e successive modifiche.

Leucociti ($\times 10^9/L$) : $\geq 3.0 \leq 12.0$

Neutrofili ($\times 10^9/L$) : $\geq 1.0 \leq 8.5$

Linfociti ($\times 10^9/L$) : $\geq 1.0 \leq 4.5$

Monociti ($\times 10^9/L$) : ≤ 1.0

Eosinofili ($\times 10^9/L$) : ≤ 1.5

Basofili ($\times 10^9/L$) : ≤ 0.2

Tali parametri vanno considerati come riferimento sia in fase di selezione del donatore, sia in fase di validazione degli emocomponenti raccolti. Discostamenti dai range di accettabilità potrebbero sottintendere infatti una patologia infettiva, con rischio di contaminazione batterica/virale/ parassitaria dell'emocomponente, oltre ai ben noti effetti indesiderati di una elevata contaminazione leucocitaria residua (reazioni febbrili non emolitiche, alloimmunizzazione, ...). Accanto ad alterazioni numeriche dei leucociti, alterazioni della formula leucocitaria potrebbero essere associate a patologie ematologiche o immunologiche meritevoli di sospensione del donatore e di maggiori approfondimenti diagnostici.

PLT ($\times 10^9/L$): $\geq 120 \leq 550$

da utilizzarsi per la selezione del donatore di sangue.

Nel caso in cui l'emocromo effettuato dopo la venipuntura all'inizio della donazione avvenuta evidenzi un valore di PLT che si discosta da quanto previsto per la selezione, l'unità può essere validata se:

PLT ($\times 10^9/L$): $\geq 100 \leq 550$

In caso di $PLT (\times 10^9/L) < 100 > 550$, le unità di PLT e GR prodotte non possono es-

sere validate; se la struttura trasfusionale è convenzionata con industria per la produzione di plasmaderivati, il plasma raccolto può essere avviato al frazionamento industriale come plasma "C", altrimenti anche l'unità di PFC va eliminata.

Si raccomanda in caso di $PLT (x10^9/L) < 100$ di verificare che non si tratti di una pseudo-piastrinopenia da EDTA.

N.B. In tutti i casi nei quali si osservi uno scostamento dai criteri di accettabilità considerati, se la struttura trasfusionale è in grado di completare un percorso diagnostico standard che sveli una causa non rilevante entro i termini che mantengono valida un emocomponente, è possibile mettere l'emocomponente stesso in quarantena prima della decisione definitiva.

Il donatore che presenti uno scostamento rispetto al range di accettabilità dei parametri emometrici, definiti ed utilizzabili per la selezione in predonazione in base a quanto indicato dalle presenti linee d'indirizzo, deve comunque essere avviato ad accertamento diagnostico: se l'anomalia è evidenziata in fase di arruolamento, anche in caso di donatore alla prima donazione, è necessario impostare l'iter diagnostico-terapeutico; se l'alterazione dei parametri emometrici viene evidenziata a donazione avvenuta, il donatore va comunque richiamato per i necessari accertamenti e, se necessario, sospeso dalla donazione.

Riferimenti

- Legge 219/2005 Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti.
- DMS 03/03/2005 Caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti.
- Raccomandazione Consiglio d'Europa R(95)15 e modifiche successive "Preparazione, uso e garanzia di qualità degli emocomponenti".
- Standard di Medicina Trasfusionale, SIMTI 2007.

Stesura delle linee di indirizzo e modalità di verifica dell'applicazione

Il gruppo di lavoro si è consultato in via preliminare e ha formulato una bozza di documento riportante la proposta di intervalli di accettabilità delle conte emometriche nel donatore di sangue ed emocomponenti. Tali parametri sono stati quindi discussi nel corso di una Consensus Conference in occasione del convegno "Il Servizio Trasfusionale oggi: criteri emometrici per la selezione e la gestione del donatore" tenutosi a Roma il 6 Novembre 2007.

Le linee di indirizzo proposte e le considerazioni scaturite sono state raccolte in questo documento che verrà sottoposto alle strutture trasfusionali della regione Lazio.

Dopo l'adozione sarà eseguita, a distanza di circa quattro mesi, una verifica sull'applicazione delle linee di indirizzo, utilizzando come strumento la modulistica in allegato.

I risultati della verifica saranno resi noti alle strutture trasfusionali regionali in occasione di un incontro organizzato a tale scopo.

Allegati

Modulo per la valutazione dell'impiego delle linee di indirizzo regionali dei parametri emometrici nel donatore di sangue

Gruppo di lavoro:

- Dr. Serelina Coluzzi – Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Centro, Azienda Policlinico Umberto I, Università "La Sapienza"
- Prof. Giuseppe D'Onofrio – UOC Emotrasfusione, Policlinico Universitario "Agostino Gemelli"
- Prof. Gabriella Girelli – Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Centro, Azienda Policlinico Umberto I, Università "La Sapienza"
- Prof. Giancarlo Isacchi – Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Ospedale Bambini Gesù
- Dr. Emilio Mannella – U.O.S.D. Raccolta, Produzione e Validazione Emocomponenti, Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Ovest, Azienda San Camillo-Forlanini
- Prof. Giacomo Menichella – Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Nord, Azienda San Filippo Neri
- Dr. Michelina Miceli – U.O.S.D. Raccolta, Produzione e Validazione Emocomponenti, Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Ovest, Azienda San Camillo-Forlanini
- Prof. Luca Pierelli – Dipartimento di Medicina Trasfusionale Roma Ovest, Azienda San Camillo-Forlanini

INDICI ERITROCITARI NELLA VALUTAZIONE PRECOCE DELLA CARENZA DI FERRO

Claudio Gambetta

U.O. Laboratorio Analisi, Polo Ospedaliero
S. Spirito, Asl RM E

L'anemia da carenza di ferro è una condizione che riconosce come causa principale il ridotto apporto di ferro al midollo eritropoietico e la conseguente ridotta emoglobinnizzazione dei globuli rossi.

Il quadro clinico patologico dell'anemia da carenza di ferro è caratterizzato dall'instaurarsi di un'anemia microcitica ipocromica e dalle modifiche della concentrazione di alcuni parametri biochimici del sangue periferico tra cui le più affidabili sono ipoferritinemia, riduzione della percentuale di saturazione della transferrina e aumento della frazione solubile del recettore per la transferrina (sTfR).

Gli indicatori utilizzabili per la gestione clinica della carenza di ferro possono quindi essere sia dei marcatori indiretti quali la ferritina, la saturazione della transferrina ed il recettore solubile per la transferrina, sia dei marcatori diretti quali le variazioni di parametri misurabili nella popolazione eritrocitaria del sangue periferico.

Gli indicatori diretti comprendono tra l'altro i c.d. Indici Eritrocitari, parametri relativi alla misura di caratteristiche fisico chimiche dei globuli rossi e di loro sottopopolazioni (come i reticolociti) ed alle eventuali elaborazioni statistiche degli stessi. La misura di queste caratteristiche è un processo spesso fortemente influenzato dalla tecnologia di misura utilizzata, che quindi va sempre considerata tra le variabili analitiche interferenti. Alcuni indici eritrocitari non sono direttamente misurati ma vengono derivati da altri indici misurati.

I primi indici eritrocitari introdotti nella pratica clinico diagnostica erano infatti esclusivamente misure derivate dalle misure tradizionali delle cellule rosse nel sangue periferico: la conta dei globuli rossi effettuata in microscopia ottica, con l'ausilio di specifiche "camere" di conta dedicate, la misura relativa della massa eritrocitaria (ematocrito), ottenuta tramite centrifugazione in particolari tubi e la determinazione della concentrazione relativa dell'emoglobina in colorimetria.

Questi indici, introdotti da Maxwell M. Wintrobe, erano:

MCV: (mean corpuscular volume) volume cellulare medio dei globuli rossi ottenuto dal rapporto tra ematocrito e numero dei globuli rossi

MCH: (mean corpuscular hemoglobin) contenuto medio di emoglobina in peso nei globuli rossi calcolato dal rapporto tra concentrazione di emoglobina e numero dei globuli rossi

MCHC: (mean corpuscular hemoglobin concentration) concentrazione emoglobinica

media nella massa eritrocitaria relativa derivata dal rapporto tra emoglobina ed ematocrito.

L'introduzione di queste misure oltre a permettere una certa standardizzazione di alcune caratteristiche evidenziabili in microscopia ottica ha di fatto rivoluzionato i percorsi diagnostici delle anemie fornendo strumenti utili per nuove classificazioni di questi processi patologici.

Ad esempio l'anemia determinata dalla carenza di ferro, caratterizzata da una costante e significativa diminuzione di MCV e MCHC, poteva essere classificata, insieme ad altre condizioni, nel gruppo delle anemie "microcitiche" ed "ipocromiche" (MCV e MCHC al di sotto del limite inferiore degli intervalli di riferimento)

L'introduzione nella diagnostica di laboratorio di sistemi automatici di conta e misura ha consentito la misura diretta di alcuni di questi indici come il volume cellulare medio (metodica della resistività – Coulter) ed, invertendo la pratica consolidata, introdotto, quindi, la possibilità di derivare parametri storici come l'ematocrito utilizzando la stessa formula di calcolo introdotta da Wintrobe ($Ht = MCV \times RBC$).

Utilizzando questa tecnologia di misura ed applicandola alle anemie da carenze di ferro si poteva osservare che esse risultavano un po' più "microcitiche" e molto meno "ipocromiche", rispetto a quanto avveniva nell'era pre-automatica. Il fenomeno era imputabile principalmente ad una sovrastima dell'ematocrito misurato in centrifugazione per l'effetto del plasma "intrappolato" tra i globuli rossi. Nella derivazione dell'Ht dalla misura diretta in impedenziometria dell'MCV questa interferenza veniva ovviamente evitata con le conseguenze descritte (esempio di misure di parametri eritrocitari tecnologia dipendenti)

La misura diretta dei volumi cellulari permette anche di valutare la variabilità di distribuzione della misura e di esprimerla graficamente attraverso l'utilizzo di RDW (red cell volume distribution width) anch'essa misura tecnologia-dipendente e degli istogrammi di distribuzione, prima rappresentazione di un tentativo di morfologia "elettronica" dei globuli rossi.

L'utilizzo, accanto od in alternativa all'impedenziometria, della metodologia di rilevazione di segnali "ottici" applicato alla "citometria" ha ampliato la possibilità della misura di caratteristiche fisiche eritrocitarie permettendo di quantificare, oltre al volume della cellula, anche la sua "densità" e quindi nello specifico dei globuli rossi essenzialmente la concentrazione cellulare di emoglobina.

Oltre alla misura della concentrazione emoglobinica corpuscolare media è possibile come per l'MCV derivare l'indice di ampiezza di distribuzione delle concentrazioni emoglobiniche – HDW e la sua rappresentazione grafica – istogramma della distribuzione delle concentrazioni emoglobiniche.

La rappresentazione biparametrica di caratteristiche fisiche misurate, volume e concentrazione emoglobiniche, fornisce poi un citogramma che permette di suddividere le cellule esaminate in nove sottopopolazioni, a seconda del variare delle grandezze misurate in rapporto agli intervalli di riferimento fissati (GR microcitici-ipocromici, microcitici-normocromici, microcitici-iperocromici, normocitici-ipocromici etc.).

La misura "diretta" di alcune di queste sottopopolazioni come la percentuale di GR

ipocromici o di GR microcitici o di GR microcitici-ipo-cromici può rilevarsi uno strumento utile nella gestione clinica delle condizioni caratterizzate da carenza di ferro.

Alcuni degli indici esaminati hanno storicamente rivestito un ruolo importante nella valutazione della carenza di ferro consolidata (diagnosi dell'anemia da carenza di ferro); ai fini, invece, di una valutazione precoce di un'eritropoiesi ferro carenziale lo scenario diagnostico è un po' più complesso.

La misura di RDW in impedenziometria non sembra avere sensibilità e specificità ottimali (80 e 50% rispettivamente).

Maggior valore sembra avere la misura percentuale della quota di eritrociti ipocromici; il numero di eritrociti ipocromici, infatti, in un regime di normale apporto di ferro al midollo e di conseguente normale emoglobinnizzazione dei GR dovrebbe essere inferiore al 5 %.

Altro indice abbastanza promettente potrebbe essere il rapporto tra GR microcitici e GR ipocromici che utilizzando un limite decisionale al disotto di 0.9 sembrerebbe fornire sensibilità e specificità ottimali (> 90%)

È probabile comunque che la valutazione precoce di un ridotto apporto di ferro al midollo osseo non possa prescindere dall'utilizzo contemporaneo di parametri indiretti (ferritina e/o sTfR) e debba rivolgersi alle sottopolazioni eritrocitarie che più precocemente evidenziano modifiche ambientali del microambiente di produzione: reticolociti ed indici reticolocitari.

USO DEGLI INDICI RETICOLOCITARI PER L'ISTITUZIONE E IL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA MARZIALE NEL DONATORE SIDEROPENICO

Giuseppe D'Onofrio

Servizio di Emotrasfusione, Policlinico Gemelli,
Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Le modificazioni del metabolismo del ferro rappresentano il principale effetto collaterale della donazione di sangue e l'unico inconveniente a lungo termine della donazione che si presenti con frequenza tale da influenzare sia la qualità di vita dei donatori che l'efficienza dell'approvvigionamento di sangue da parte dei servizi trasfusionali. La perdita di ferro, causata dalla rimozione degli eritrociti dall'organismo con il salasso, produce una diminuzione netta delle riserve corporee del minerale, equivalente alla quantità contenuta nell'emoglobina. Il bilancio marziale, che è di solito regolato molto strettamente, viene quindi a modificarsi e a divenire negativo per l'aumento periodico delle perdite. Il recupero avviene in genere lentamente, in virtù di un significativo aumento dell'assorbimento delle molecole del metallo presenti negli alimenti, e la sua completezza dipende da numerosi fattori, tra cui in primo luogo la frequenza delle donazioni.

Nei donatori di sesso maschile questa condizione viene a riprodurre in termini generali quanto si verifica nelle donne in età fertile, che perdono periodicamente una piccola quantità di eritrociti con il ciclo mestruale. Nel sesso femminile, d'altra parte, la deplezione delle riserve marziali rappresenta una condizione già molto comune anche al di fuori della donazione di sangue. Gli effetti di quest'ultima, quindi, vanno a sommarsi a una situazione di base già precaria, con il rischio di effetti negativi sull'eritropoiesi e dello sviluppo di anemia sideropenica. La donazione determina la perdita di 450 ml di sangue, pari a circa 200 ml di globuli rossi: ciò produce una lieve riduzione della concentrazione di emoglobina, pari a 1,0-1,5 g/dl. Il successivo compenso fisiologico, basato sull'asse ipossia-eritropoietina, avviene in condizioni normali senza difficoltà, attraverso un'accelerata produzione di globuli rossi, tale da riportare la conta eritrocitaria, l'ematocrito e la concentrazione di emoglobina a livelli identici a quelli precedenti al salasso. L'unico fattore che limita questo compenso, negli individui sani, è la disponibilità di atomi di ferro necessari per la formazione di molecole emoglobiniche complete.

La possibilità di conoscere e valutare le dinamiche del bilancio marziale nei donatori di sangue appare particolarmente importante in seguito agli sviluppi più recenti di nuove tecniche di donazione multicomponente, soprattutto quelle che comportano la raccolta di due unità di emazie in una singola seduta, in cui sono necessarie cautele particolari e una specifica attenzione al bilancio marziale all'atto della selezione dei donatori.

Il bilancio marziale è basato su un equilibrio dinamico tra assorbimento, perdite, utilizzazione e deposito delle molecole di ferro. Il ciclo metabolico del ferro si realizza sotto forma di un flusso chiuso unidirezionale: la transferrina plasmatica trasporta il ferro al midollo eritropoietico, dove esso viene captato dagli eritroblasti e incorporato nelle nuove molecole emoglobiniche dei globuli rossi durante la loro differenziazione; questi, una volta maturi, lasciano il midollo osseo in forma di reticolociti e circolano nel sangue fino a quando, in media dopo 120 giorni, vengono rimossi dal circolo mediante fagocitosi ad opera dei macrofagi della milza, del midollo osseo e del fegato. Il ferro liberato dall'eme passa nuovamente dal citoplasma dei macrofagi alla transferrina plasmatica, ricominciando così il ciclo. Il compartimento funzionale comprende tutto il ferro contenuto nelle molecole emoglobiniche all'interno degli eritroblasti e dei globuli rossi (2000-2500 mg in un adulto di sesso maschile), più altri 300 mg circa distribuiti nella mioglobina e negli enzimi respiratori di tutte le cellule. I precursori eritroidi immaturi acquisiscono il ferro dalla transferrina plasmatica tramite legame con un recettore specifico per quest'ultima, presente sulla loro superficie. Ogni giorno circa 18-20 mg di ferro sono utilizzati per la formazione di nuovi globuli rossi. Al termine del loro periodo di vita i globuli rossi senescenti vengono fagocitati dai macrofagi e il loro ferro viene direttamente accumulato, senza passare nuovamente per la transferrina. Il compartimento di deposito, localizzato principalmente nei macrofagi della milza, del fegato e del midollo osseo, ammonta a circa 1000 mg nei maschi e nelle donne alcuni anni dopo la menopausa e a circa 250-500 mg nelle donne in età fertile, non donatrici di sangue. Il ferro di deposito esiste in due forme: la ferritina, facilmente mobilizzabile, è composta da un rivestimento proteico (apoferritina) capace di legare gli ioni ferrosi e di ossidarli; l'emosiderina, più stabile, è formata da aggregati di molecole di ferritina prive del rivestimento proteico e localizzate soprattutto nelle cellule del sistema reticolocitario. La quantità di ferritina nei depositi è in equilibrio con una piccola quantità di ferritina che circola nel plasma, dove può essere dosata con facilità. La ferritinemia rappresenta l'indicatore più efficace del patrimonio marziale dell'organismo: in caso di malattie infiammatorie croniche o neoplastiche, tuttavia, questo equilibrio si altera e la ferritina circolante aumenta indipendentemente dall'entità dei depositi.

Lo sviluppo della carenza marziale procede gradualmente attraverso stadi progressivi, caratterizzati da una diminuzione fino alla scomparsa dei depositi marziali e quindi dall'instaurarsi di un'eritropoiesi ferro-carenziale, fino alla vera e propria anemia. Nello stadio I (sideropenia pre-latente) il bilancio marziale è negativo, i depositi di ferro midollare evidenziati morfologicamente con la reazione di Perls sono ridotti e la ferritinemia è inferiore a 25 ng/ml; la saturazione della transferrina, la morfologia eritrocitaria e la concentrazione emoglobinica sono normali. Nello stadio II (sideropenia latente) il ferro midollare scompare, la ferritinemia scende sotto 12- ng/ml e la percentuale di saturazione della transferrina è inferiore a 15-16%: questa quantità di ferro è ormai insufficiente per mantenere l'eritropoiesi normale, ma la morfologia dei globuli rossi e la concentrazione emoglobinica sono ancora conservati. Indicatori precoci e sensibili di questa condizione di eritropoiesi ferro-carenziale possono essere, in base a

studi molto recenti, la proporzione delle emazie ipocromiche, il CHR (concentrazione emoglobinica dei reticulociti) e il recettore solubile per la transferrina. L'ultimo stadio è quello dell'anemia sideropenica, in cui le tipiche alterazioni eritrocitarie (microcitosi, anisocitosi e ipocromia) si instaurano in modo lentamente progressivo in associazione alla riduzione dell'emoglobina e dell'ematocrito.

La donazione di sangue rappresenta una delle più comuni cause di deplezione marziale nel mondo occidentale. Secondo le nozioni classiche, dopo una singola donazione un individuo sano, che segua una normale alimentazione, ha bisogno di circa tre mesi per ricostituire i depositi marziali ridotti dal salasso. Su queste basi è regolata la normativa della maggior parte dei paesi europei riguardante la frequenza annuale delle donazioni di sangue e gli intervalli minimi tra una donazione e l'altra. La conoscenza delle modificazioni del bilancio marziale prodotte dalle donazioni rappresenta un pre-requisito fondamentale sotto il profilo medico, etico e organizzativo. Una deplezione totale delle riserve, infatti, è incompatibile con la protezione del donatore, potendo facilmente evolvere in anemia sideropenica. Essa riduce inoltre in maniera determinante il numero e la frequenza dei salassi che possono essere praticati a ciascun donatore.

La donazione influenza in maniera molto significativa il bilancio marziale dell'organismo, causando una netta diminuzione dei depositi. Gli studi più recenti che hanno valutato l'incidenza della carenza marziale nella popolazione dei donatori di sangue hanno analizzato generalmente, come indicatori della deplezione delle riserve, la media o la mediana dei valori di ferritinemia. Solo alcuni hanno impiegato la percentuale di saturazione della transferrina o, più di recente, il dosaggio del recettore solubile della transferrina. La ferritina si riduce nettamente già dopo una o due donazioni, riflettendo il depauperamento delle riserve marziali. Dopo le prime due o tre donazioni i valori di ferritina tendono a stabilizzarsi in basso, riflettendo un nuovo equilibrio con depositi marziali esauriti ed aumentato assorbimento di ferro dalla dieta. Il livello plasmatico della ferritina non mostra poi ulteriori riduzioni dopo le prime cinque o sei donazioni nell'uomo e dopo le prime una o due nelle donne. Con il susseguirsi delle donazioni, l'assorbimento di ferro dagli alimenti si accresce, fino a un punto in cui il ferro assorbito tra due donazioni è sufficiente a rimpiazzare le perdite obbligate più quelle supplementari causate dai salassi. L'assorbimento del ferro dei maschi donatori tende a riprodurre fedelmente le modalità che caratterizzano normalmente i soggetti di sesso femminile. Le donne in età fertile sono più suscettibili allo sviluppo di sideropenia in seguito alla donazione di sangue, rispetto sia ai donatori maschi e che alle donatrici in menopausa, soprattutto in funzione della frequenza delle donazioni. La donazione anche di una sola unità di sangue da parte di una donna in età fertile comporta in media la mobilitazione della quasi totalità delle sue riserve di ferro. Al fabbisogno già di norma più elevato delle donne, pari a circa 1,4 mg/die, si viene infatti ad aggiungere nelle donatrici la quantità di ferro che viene perduta con le donazioni.

La carenza conclamata di ferro produce negli eritrociti circolanti una riduzione del contenuto di emoglobina e delle dimensioni, che possono essere riconosciute mediante osservazione microscopica dello striscio di sangue periferico colorato solo in una fase

tardiva, quando l'anemia è già presente. Gli indici eritrocitari sono stati studiati solo raramente nei donatori di sangue. Più precocemente rilevabile della microcitosi, secondo alcuni autori, sarebbe la maggiore eterogeneità volumetrica delle emazie prodotte in condizioni di sideropenia, misurata oggettivamente attraverso la determinazione citometrica automatica del parametro RDW (Red cell Distribution Width), che esprime nei termini di un coefficiente di variazione o di una deviazione standard l'ampiezza della curva di distribuzione dei volumi eritrocitari.

Particolarmente utile per individuare precocemente la deplezione dei soggetti marziali è la possibilità di misurare direttamente la percentuale delle emazie microcitarie (volume inferiore a 60 fl) e ipocromiche (concentrazione emoglobinica intraeritrocitaria inferiore a 26 g/dl). La percentuale delle emazie ipocromiche misurate dai sistemi citometrici di tipo ottico, in particolare, rappresenta un marcatore sensibile e ottimale di eritropoiesi ferrocarenziale.

I reticolociti presenti nel circolo periferico hanno lasciato generalmente il midollo osseo nelle ultime 24 ore e possono fornire informazioni molto tempestive sulle caratteristiche della funzionalità eritropoietica. La conta totale dei reticolociti, espressa sia come percentuale che come valore assoluto, non ha tuttavia alcuna utilità per l'individuazione della carenza marziale, risultando per lo più normale o appena ridotta in presenza di sideropenia latente o di anemia sideropenica. La frazione dei reticolociti più immaturi (IRF o RMI) aumenta in condizioni di eritropoiesi accelerata, come sotto stimolazione eritropoietinica, e può aumentare anche in caso di carenza marziale. La possibilità di misurare in modo preciso e accurato, in citometria a flusso con analisi laser, le proprietà dei reticolociti circolanti, come il volume medio (MRV), il contenuto emoglobinico medio in pg (CHR) e la concentrazione emoglobinica media (CHCMr), rende disponibili informazioni preziose in tempo reale sulle modifiche dello stato funzionale dell'eritropoiesi indotte molto precocemente dalla mancata disponibilità di ferro per esaurimento delle riserve. Il parametro più studiato per la diagnosi di carenza marziale è il CHR, che si correla con elevata sensibilità e specificità ai depositi midollari di ferro. Parametri reticolocitari potenzialmente equivalenti al CHR quali il Ret-He (reticulocyte hemoglobin equivalent) sono stati ottenuti anche con tecnologie differenti. Le modificazioni degli indici reticolocitari sono state utilizzate per diagnosticare la carenza funzionale di ferro conseguente a stimolazione eritropoietinica in soggetti normali sottoposti a salasso. Fino ad oggi non è stato pubblicato nessuno studio sull'utilità dello studio degli indici reticolocitari nei donatori di sangue. Si può ritenere che la loro misurazione possa fornire, come già in altri contesti, informazioni utili e tempestive sull'incombere della sideropenia e, quindi, sull'opportunità di procedere ad uno studio più approfondito del bilancio marziale prima di effettuare ulteriori donazioni.

In uno studio effettuato presso il Servizio di Emotrasfusione del Policlinico Gemelli abbiamo valutato gli indici eritrocitari e reticolocitari su 263 donatori di sangue. I risultati hanno confermato che la donazione di sangue porta nei donatori periodici ad una deplezione delle scorte marziali. I valori della ferritina correlano con il numero e la frequenza delle donazioni. È stata inoltre verificata la possibilità di predire l'esauri-

mento delle scorte marziali in base ai parametri reticolocitari. Nella popolazione esaminata in questo lavoro il valore medio dei reticolociti era pari all'1,6% nei donatori periodici (sia maschi che femmine) e nei "first time" di sesso maschile e all'1,5% nelle donatrici "first time". I valori medi di MRV riscontrati nei donatori periodici, tanto nel sesso maschile quanto nel sesso femminile, erano effettivamente maggiori rispetto a quelli rilevati nei "first time donors". Un valore di CHr inferiore a 26 pg è descritto come un indicatore di deplezione dei depositi marziali, ma in nessuna donatrice, né periodica né "first time", è stato riportato un valore di tale parametro inferiore alla soglia indicata.

Alla luce dei risultati ottenuti e dell'assenza di pubblicazioni sull'utilità dello studio degli indici reticolocitari in questo contesto, sono necessari ulteriori approfondimenti.