

## Impatto dei fattori ostetrici sulla donazione del sangue cordonale: due anni di attività

G. VOLPE<sup>1</sup>, G. MISCIO<sup>2</sup>, M. SANTODITOCOCO<sup>2</sup>, L. DI MAURO<sup>2</sup>, F.M. BOSCIA<sup>1</sup>, S. SPARVIERO<sup>3</sup>, G. CARADONNA<sup>1</sup>, A.M. CARBOTTA<sup>1</sup>, S. CASULLI<sup>1</sup>, G. LOVASCIO<sup>1</sup>, L. LABIANCA<sup>1</sup>, E. DE PALMA<sup>1</sup>, G. SANGIORGIO<sup>1</sup>, R. LATROFA<sup>1</sup>, A. SAVINO<sup>1</sup>, M. DI CECCA<sup>1</sup>, V. LOCOROTONDO<sup>1</sup>, L. DAMIANI<sup>1</sup>, V. PARTIPILO<sup>1</sup>, C. CAMPOBASSO<sup>1</sup>, R. DORIA<sup>1</sup>, G. MALLARDI<sup>1</sup>, E. IRILLO<sup>4</sup>, B. MUTO<sup>5,6</sup>, N. VOLPE<sup>6,7</sup>

**RIASSUNTO:** Impatto dei fattori ostetrici sulla donazione del sangue cordonale: due anni di attività.

G. VOLPE, G. MISCIO, M. SANTODITOCOCO, L. DI MAURO, F.M. BOSCIA, S. SPARVIERO, G. CARADONNA, A.M. CARBOTTA, S. CASULLI, G. LOVASCIO, L. LABIANCA, E. DE PALMA, G. SANGIORGIO, R. LATROFA, A. SAVINO, M. DI CECCA, V. LOCOROTONDO, L. DAMIANI, V. PARTIPILO, C. CAMPOBASSO, R. DORIA, G. MALLARDI, E. IRILLO, B. MUTO, N. VOLPE

Scopo. L'obiettivo di questo studio è analizzare due anni di attività del nostro Centro di Raccolta del Sangue Placentare tra ottobre 2008 e settembre 2010 e verificare l'impatto dei fattori clinici ed ostetrici sul numero delle unità di sangue del cordone ombelicale (SCO) bancate.

Materiale e metodi. Il consenso informato per il reclutamento alla donazione di SCO è stato raccolto a 35 settimane di gravidanza, previo counselling della coppia, attraverso un'accurata anamnesi materna e paterna alla ricerca di malattie genetiche, immunologiche ed infettive trasmissibili. Le unità di sangue cordonale sono state raccolte ogni giorno della settimana al momento del parto spontaneo o del taglio cesareo tra 37-41+6 settimane di gravidanza presso la UOC Ostetricia-Ginecologia Ospedale "Di Venere", Bari, tra ottobre 2008 e settembre 2010. Le unità di SCO sono state raccolte in sala parto o in sala operatoria con placenta inserita in utero. Il cordone ombelicale è stato clampato non prima di 60 secondi dall'espulsione del feto. Le unità di SCO sono state accettate dalla Banca Cordonale Regione Puglia (PUCBB, presso l'IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" in San Giovanni Rotondo) per la crioconservazione quando il numero totale delle cellule nucleate (TCN) era  $\geq 80 \times 10^7$ . I dati sono stati analizzati mediante il coefficiente di correlazione di Pearson, il t-test di Student, il test di Mann-Whitney e analisi chi quadro.

Risultati. Il numero dei parti presso il nostro punto nascita durante il periodo di studio è stato di 2.971. Le pazienti sensibilizzate alla raccolta del sangue cordonale sono state 1.117 (37,6%). Le pazienti escluse dalla donazione del sangue cordonale al momento della raccolta

**SUMMARY:** Impact of the obstetric factors on the umbilical cord blood donation: a two-year experience.

G. VOLPE, G. MISCIO, M. SANTODITOCOCO, L. DI MAURO, F.M. BOSCIA, S. SPARVIERO, G. CARADONNA, A.M. CARBOTTA, S. CASULLI, G. LOVASCIO, L. LABIANCA, E. DE PALMA, G. SANGIORGIO, R. LATROFA, A. SAVINO, M. DI CECCA, V. LOCOROTONDO, L. DAMIANI, V. PARTIPILO, C. CAMPOBASSO, R. DORIA, G. MALLARDI, E. IRILLO, B. MUTO, N. VOLPE

Aim. The aim of this study is to analyze the umbilical cord blood (UCB) collection over 2 years between October 2008 and September 2010 in our UCB Collection Centre, seeking to assess how some clinical and obstetric factors could influence the number of banked UCB units.

Material and methods. We recruited couples at 35 weeks of gestation, that were asked to give informed consent for UCB donation, after proper counselling and accurate history taking for both parents, focusing on genetic, immunological and infectious diseases. The UCB collection was performed daily, at the time of delivery in the case of both vaginal delivery and Caesarean section, between 37 and 41+6 weeks of gestation, between October 2008 and September 2010, in the Obstetrics department of our hospital ('Di Venere' Hospital, Bari). 'In utero' collection was the preferred method, with cord clamping time more than 1 minute after birth. UCB units were accepted for cryopreservation by our local UCB bank (Puglia UCB Bank, PUCBB), if the Total Nucleated Cells (TNC) content was  $\geq 80 \times 10^7$ . Statistical analysis was performed using Pearson correlation coefficient, Student's t-test, Mann-Whitney test and  $\chi^2$  test.

Results. During the 2 years study period, we had 2971 deliveries in our hospital. The patients that opted for UCB donation were 1117, 37.6%. We excluded 244 patients at the time of recruitment and 160 UCB units at the time of delivery, according to obstetric (feto-maternal) exclusion criteria. We therefore sent to the PUCBB 713 units, 24% of the total number of deliveries. The UCB bank discarded 445

<sup>1</sup> Ospedale "Di Venere", Bari, UOC Ostetricia-Ginecologia, Dipartimento Materno-Infantile

<sup>2</sup> IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo

<sup>3</sup> Ospedale "Di Venere", Bari, UOC Anestesia e Rianimazione

<sup>4</sup> Università degli Studi, Bari, Dipartimento di Clinica Medica, Immunologia e Malattie infettive

<sup>5</sup> "Sapienza" Università di Roma, Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Ginecologiche ed Ostetriche, Clinica Ostetrica e Ginecologica

<sup>6</sup> Fetal Medicine Foundation, Harris Birthright Research Center, King's Hospital, Londra

<sup>7</sup> Università degli Studi di Bari, Scuola di Dottorato di Ricerca in Morfologia Applicata e Citometabolismo dei Farmaci

del Consenso Informato sono state 244; le unità di SCO escluse al momento della raccolta in sala parto o in sala operatoria per fattori ostetrici (materno-fetali) sono state 160; il numero totale di SCO inviate alla PUCBB è stato di 713 (1.117-404), cioè il 24% di 2.971 parti totali. Il numero delle sacche escluse dalla PUCBB sono state 445 per bassa cellularità e 62 per altri motivi ostetrici e tecnici. Possiamo affermare che le unità di SCO scartate prima della crioconservazione sono state 507. Se consideriamo che altre 22 unità cordonali sono state scartate dopo la crioconservazione per patologie materne e neonatali, il numero totale di unità eliminate è stato di 529, cioè il 74,2% delle 713 inviate. Le unità bancate sono state, quindi, 184 (713-529), cioè il 25,8% delle 713 unità di sangue cordonale raccolte.

Prendendo in considerazione le analisi condotte mediante il coefficiente di correlazione di Pearson: il peso neonatale correla positivamente con le settimane di gestazione al momento del parto ( $r=0,304$ ;  $p=0,000$ ), con il volume di SCO raccolto ( $r=0,191$ ;  $p=0,000$ ), con il numero TCN ( $r=0,252$ ;  $p=0,000$ ) e con il numero di CD34+ raccolte ( $r=0,222$ ;  $p=0,001$ ). Il volume dell'unità di SCO raccolta correla positivamente con la raccolta di CD34+ ( $r=0,433$ ;  $p=0,000$ ). L'età materna correla in maniera inversamente proporzionale con le settimane di gestazione ( $r=0,155$ ;  $p=0,000$ ). Le donatrici al primo parto in assoluto rispetto a tutte le altre (almeno una gravidanza progressa) presentano l'età materna significativamente più bassa. Anche la durata del travaglio e le settimane di gestazione sono maggiori per le nullipare, che peraltro raccolgono mediamente 100 milioni di TNC in più, oltre che un più alto valore di concentrazione di TNC per unità di volume. Solo nelle nullipare il volume raccolto, seppur maggiore e significativamente diverso nel cesareo, non basta a compensare la maggiore raccolta di cellule che è assolutamente superiore nello spontaneo:  $2,81 \times 10^3$ /ul TNC e ben 190 milioni di TNC in più.

Discussione. Dati i nuovi tetti di bancaggio,  $\geq 1,2$  miliardi di TNC al congelamento, abbiamo analizzato quali fossero le caratteristiche delle donatrici che nel nostro centro hanno raccolto almeno 1,2 miliardi di cellule. Esse rappresentano il 18,4% delle 713 unità di SCO raccolte, cioè 131. Questo gruppo è composto per il 68,5% da donne al loro primo parto e per il restante 31,5% da pluripare. Nasce, quindi, l'esigenza di reclutare più primigravide. Inoltre, le unità che hanno almeno 1,2 miliardi di cellule nell'89,3% dei casi sono provenienti da nati di peso  $>3.000$  g e solo il 10,7% da nati di peso  $<3.000$  g. In altre parole possiamo affermare che nel nostro centro è inutile raccogliere da nati di peso  $<3.000$  g.

Conclusioni. Secondo la nostra esperienza una raccolta ottimale di SCO deve rispettare le seguenti caratteristiche: reclutare più primigravide, con epoca gestazionale al prelievo di SCO tra 37-40 settimane, con peso fetale superiore a 3.000 g, tempo di clampaggio del cordone ombelicale entro 30 secondi, raccolta di sangue cordonale con placenta inserita ancora in utero, e da preferire il parto spontaneo, di solito associato a lungo travaglio (aumento dello stress fetale).

units due to low content of nucleated cells, and 62 due to other clinical and technical reasons. The UCB units discarded before cryopreservation were therefore 507. There were also 22 UCB units discarded after cryopreservation because of either maternal or neonatal issues. The total number of discarded UCB units was therefore 529, that means 74.2% out of 713 sent to the UCB bank with just 184 UCB units finally accepted for cryopreservation, that means the remaining 25.8%. The statistical analysis (Pearson correlation coefficient) shows that the neonatal weight correlates positively with the weeks of gestation at delivery ( $r=0.304$ ;  $p=0.000$ ), with the collected UCB unit volume ( $r=0.191$ ;  $p=0.000$ ), with the Total Nucleated Cells (TNC) ( $r=0.252$ ;  $p=0.000$ ) and CD34+ collected ( $r=0.222$ ;  $p=0.001$ ). The UCB unit volume correlates positively with the CD34+ collected ( $r=0.433$ ;  $p=0.000$ ). Maternal age negatively correlates with the weeks of gestation ( $r=0.155$ ;  $p=0.000$ ). Primiparas are significantly younger, have longer labour and gestation. The TNC number collected from this subgroup is higher than in pluriparas, and the mean difference between the two groups is  $100 \times 10^6$ . Primiparas have higher concentration of TNC per volume unit as well. In this subgroup the TNC number collected after spontaneous vaginal deliveries is significantly bigger than after cesarean section ( $2,81 \times 10^3$ /ul TNC and average  $190 \times 10^6$  of TNC more), even if the UCB volume collected after cesarean section is bigger than after vaginal delivery.

Discussion. Considering the new requirements to allow cryopreservation (UCB unit containing more than  $1.2 \times 10^9$ ), we searched for the features of UCB donors able to produce UCB units containing more than  $1.2 \times 10^9$  TNC (18.4% of the UCB units collected during the study period). This group of donors is composed as follows: 68.5% primiparas and 31.5% pluriparas; 89.3% neonates with birthweight  $>3000$  gr and just 10.7% birthweight  $<3000$  gr.

Conclusions. Our study shows that it is necessary to focus on the factors that make the UCB unit optimal for collection and banking, containing more than  $1.2 \times 10^9$  TNC. Ideally the mother should be primipara (more likely to have a good TNC content), and deliver at 37-40 weeks; important obstetric factors would be birthweight  $>3000$  gr, short clamping time (within 30 seconds), 'in utero' collection method. Spontaneous vaginal delivery should be preferred to cesarean section, as usually correlated to longer labour (increased fetal stress).

KEY WORDS: Sangue del cordone ombelicale (SCO) - Numero totale di cellule nucleate (TCN) - Banca Cordonale Regione Puglia (PUCBB).  
Umbilical cord blood (UCB) - Total nucleated cells (TNC) - Puglia UCB Bank.

## Introduzione

Negli ultimi dieci anni il sangue del cordone ombelicale (SCO) si è proposto all'attenzione come fonte di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) alternativa al midollo osseo ed al sangue periferico (1-3). Il numero dei trapianti da SCO nel mondo è andato sempre più

aumentando, grazie ai vantaggi indiscussi evidenziati dallo studio delle CSE da sangue placentare rispetto a quelle da midollo osseo e da sangue periferico. Infatti, (a) la mancanza di rischio per la madre e per il neonato al momento della raccolta di SCO, (b) la pronta disponibilità di SCO al bisogno, (c) la mancanza di rifiuto al momento della donazione, (d) i ridotti rischi di

contaminazione virale del materiale di trapianto, (e) la particolare docilità immunologica legata al sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) e (f) la ridotta incidenza di effetti immunologici acuti da GVHD (*Graft Versus Host Disease*) fanno delle cellule staminali da sangue cordonale un mezzo terapeutico di elezione nelle malattie neoplastiche e non neoplastiche del sistema ematopoietico, considerata la compatibilità perfetta tra donatore e ricevente richiesta in tali trapianti (4,5).

Un requisito fondamentale per la riuscita del trapianto in termini di attecchimento è il contenuto cellulare dell'unità di sangue trapiantato (progenitori ematopoietici e CD34+) e la compatibilità HLA donatore/ricevente (6,7).

Le raccomandazioni della letteratura internazionale a tale proposito sono di selezionare sacche di SCO con disparità HLA tra donatore e ricevente fino a 2 *mismatches* (4-5/6) a livello dei loci HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 senza riscontrare un aumento della incidenza di GvHD e  $>3 \times 10^7$  NC/kg (8,9).

Tra le strategie suggerite al fine di aumentare il numero di unità di sangue cordonale che possono essere crioconservate, il consenso della letteratura è indirizzato sull'elevare la qualità delle unità bancate, cioè il contenuto totale di cellule nucleate (TNC) nell'unità di sangue cordonale (6,7,10).

Molteplici sono i fattori riconosciuti che potrebbero influenzare il contenuto in cellule nucleate presente nelle unità raccolte, cioè il peso della placenta, il peso del neonato, l'epoca di gravidanza, la durata del travaglio, nonché il pH del sangue fetale e la disposizione del feto sull'addome materno (10-12). Il peso placentare è l'unica variabile che indipendentemente influenza volume, TCN, CD34+ e CFU (*Clony Forming Unit*) presenti in una unità di sangue placentare (13-17).

Per l'ottimizzazione e la sicurezza delle unità di SCO raccolte e bancate sono stati individuati criteri di selezione delle pazienti e delle unità, basati anche sui suddetti fattori, che vanno valutati durante specifiche fasi del processo di raccolta. Queste fasi sono: 1) la raccolta del consenso informato della coppia a donare il sangue cordonale previo *counselling* a 35 settimane; 2) la raccolta del sangue placentare in sala parto o in sala operatoria; 3) la validazione delle unità di SCO da parte della Banca Cordonale della Regione Puglia (PUCBB) situata presso l'IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" in San Giovanni Rotondo; 4) il controllo materno-neonatale dopo sei mesi dalla nascita, prima del definitivo bancaggio.

Il fine di questo lavoro è quello di analizzare due anni di attività del nostro Centro di Raccolta del Sangue Cordonale/Placentare (CRaSCO) tra ottobre 2008 e settembre 2010, passando attraverso i suddetti quattro momenti della donazione del sangue placentare. Esamineremo le ragioni dell'eliminazione sia delle

donatrici di SCO prima della raccolta di SCO (presso la UOC di Ostetricia e Ginecologia Ospedale "Di Venere", Bari), che delle stesse unità di SCO al momento della crioconservazione presso la PUCBB. Valuteremo i fattori ostetrici che influenzano le TNC al fine di stabilire i criteri di selezione ed ottimizzazione della raccolta del sangue cordonale.

## Materiali e metodi

Da ottobre 2008 a settembre 2010 abbiamo raccolto, presso il centro dedicato CRaSCO della UOC di Ostetricia e Ginecologia Ospedale "Di Venere", Bari, in donne portatrici di gravidanza in normale evoluzione a 35 settimane di gestazione, il *consenso informato* a donare il sangue cordonale, previo *counselling* della coppia sulla donazione, attraverso un'accurata anamnesi materna e paterna alla ricerca di malattie genetiche, immunologiche ed infettive trasmissibili (*criteri anamnestici di selezione*).

Le unità del sangue cordonale sono state raccolte ogni giorno della settimana in gravide dopo la 37<sup>a</sup> settimana di gestazione, rispettando i criteri di esclusione al momento della raccolta del sangue cordonale in sala parto/sala operatoria (*criteri ostetrici*) cioè fattori materni, quali: 1) rottura delle membrane da più di 12 ore, 2) iperpiressia ( $>38^\circ\text{C}$ ), 3) liquido amniotico tinto di verde, 4) parto distocico, gestosi, distacco di placenta; e fattori fetali, quali: 1) basso Apgar alla nascita ( $<7$  a 1min e  $<5$  a 5min), 2) basso peso alla nascita ( $<2.600\text{g}$ ), 3) malformazioni congenite alla nascita.

Le unità di sangue cordonale sono state raccolte in sala parto o in sala operatoria con placenta inserita *in utero*. Il cordone ombelicale è stato clampato non prima di 60 secondi dall'espulsione del feto. Il sangue cordonale è stato raccolto dalla vena ombelicale mediante un ago da 12.5 *gauge* collegato ad una sacca sterile da 150 mL (*Maco Pharma S.A. Laboratoires Pharmaceutiques, France*), contenente 21 mL di fosfato-citrato-destrosio come anticoagulante. Il cordone ombelicale era munto delicatamente e l'utero massaggiato durante l'ultimo periodo della raccolta al fine di aumentare il flusso ematico.

Quindi le unità di sangue cordonale sono state inviate per un primo controllo al Servizio di Immunematologia e Medicina Trasfusionale (SIMT), Ospedale "Di Venere", Bari, insieme alle schede anamnestiche già redatte e a 6 provette di sangue materno. Da qui, entro 24-48 ore, venivano prese in carico e trasportate alla PUCBB, ove venivano processate per la crioconservazione con esclusione della sacca per le seguenti ragioni, quali criteri di validazione biologica: scarsa cellularità ( $<800$  milioni di cellule), peso  $<70$  g, presenza di coaguli, sviluppo di infezioni, non integrità della sacca, in-

fezioni accertate sul sangue prelevato alla madre al momento del parto e dati anamnestici di esclusione sfuggiti al momento della raccolta di SCO. Dopo alcune settimane la Banca Cordonale informava il nostro Centro Dedicato della esclusione o conferma dell'idoneità del sangue cordonale al bancaggio, che avveniva "definitivamente" solo dopo 6 mesi, momento controllo della rivalutazione dello stato di salute materno-neonatale.

I dati sono stati analizzati mediante il coefficiente di correlazione di Pearson, il t-test di Student, il test di Mann-Whitney e l'analisi chi quadro. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software SPSS 10.0 (SPSS Italia). Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato significativo

## Risultati

Il numero dei parti presso la UOC Ostetricia-Ginecologia, Ospedale "Di Venere", Bari, nel periodo di studio tra ottobre 2008-settembre 2010 è stato di 2.971. Le pazienti sensibilizzate alla raccolta del sangue cordonale sono state 1.117 (37,6%). Le pazienti escluse dalla donazione del sangue cordonale al momento della raccolta del consenso informato secondo criteri anamnestici sono state 244; le pazienti eleggibili alla raccolta sono state 873 (1.117-244); le unità di SCO escluse al momento della raccolta in sala parto o in sala operatoria per fattori ostetrici (materno-fetali) sono state 160; il numero totale di SCO inviate alla PUCBB è stato di 713 (1117-404), cioè il 24% dei 2.971 parti totali. Il numero delle sacche escluse dalla Banca Cordonale, al momento della validazione biologica, per la bassa cellularità sono state 445 e 62 soprattutto per altri motivi tecnici. Possiamo affermare che le unità di SCO scartate prima della crioconservazione sono state 507. Se consideriamo che altre 22 unità cordonali sono state scartate dopo la crioconservazio-

ne per patologie materne e neonatali, il numero totale di unità escluse è stato di 529, cioè il 74,2% delle 713 inviate. Le unità bancate sono state, quindi, 184 (713-529), cioè il 25,8% delle 713 unità di sangue cordonale raccolte (Tabella 1).

Il basso numero di TNC contenute nelle sacche raccolte è stato il più frequente tra i fattori di esclusione alla *validazione biologica*; nella nostra esperienza 445 sacche sono state eliminate dalla Banca Cordonale sulle 713 raccolte, cioè il 62,4%.

Nella Tabella 2 sono riportate le caratteristiche principali delle donazioni effettuate nel nostro Centro nel periodo in oggetto.

Abbiamo condotto una serie di analisi statistiche atte a verificare se alcune variabili quantitative (peso fetale, settimane di gestazione, ecc.) correlano con altre. Tali analisi sono state condotte mediante le correlazioni (coefficiente "r" di Pearson). In breve, abbiamo osservato che:

- al crescere delle settimane di gestazione cresce, seppur moderatamente, il numero di TNC raccolte ( $r=0,111$ ;  $p=0,006$ );
- l'età materna correla in maniera inversamente proporzionale con le settimane di gestazione; cioè le madri più giovani presentano gravidanze più lunghe ( $r=0,155$ ;  $p=0,000$ );

TABELLA 1 - DATI CRaSCO OSPEDALE "DI VENERE", BARI, DA OTTOBRE 2008 A SETTEMBRE 2010.

Totale parti	2.971
Totale pazienti sensibilizzate	1.117 (37,6% tot. parti)
Totale sacche di SCO raccolte	713 (24,0% tot. parti)
Totale sacche di SCO eliminate	529 (74,2% tot. raccolte)
Scarsa cellularità	445
Totale sacche di SCO bancate	184 (25,8% tot. raccolte)

TABELLA 2 - CARATTERISTICHE PRINCIPALI DELLE DONAZIONI EFFETTUATE NEL NOSTRO CENTRO NEL PERIODO COMPRESO TRA OTTOBRE 2008 E SETTEMBRE 2010.

	N	Minimo	Massimo	Media	Deviazione standard
Età madre (anni)	708	18,4	44,8	32,75	4,88
Età padre (anni)	612	20,4	59,8	35,80	5,54
Peso neonato (g)	662	2110	4970	3283,68	380,38
Peso placenta (g)	689	300	800	487,64	71,83
Rottura sacco (min)	372	0	1040	107,48	177,00
Settimane gestazione	639	35	42	39,01	1,16
Durata travaglio (min)	212	0	1189	242,11	181,45
Vol/ml iniziale	703	21,0	184,8	89,81	24,18
TNC x 10 <sup>6</sup>	694	168,4	2717,7	883,65	403,25
CD34+ tot x 10 <sup>4</sup>	230	7,33	1624,78	342,96	222,01

- il peso del neonato correla positivamente con il peso della placenta ( $r=0,157$ ;  $p=0,000$ ) e con l'aumentare delle settimane di gestazione ( $r=0,304$ ;  $p=0,000$ );
- aumentando il peso neonatale aumenta il volume di SCO raccolto ( $r=0,191$ ;  $p=0,000$ ), il numero di TCN raccolte ( $r=0,252$ ;  $p=0,000$ ) ed il numero di CD34+ raccolte ( $r=0,222$ ;  $p=0,001$ );
- il volume dell'unità di SCO raccolte correla positivamente con il numero di TNC raccolto ( $r=0,701$ ;  $p=0,000$ ) e con le CD34+ ( $r=0,433$ ;  $p=0,000$ );
- quante più TNC vengono raccolte tanto più elevato sarà il numero di CD34+  $r=0,582$ ;  $p=0,000$ .

Il passo successivo è stato quello di analizzare le differenze tra due gruppi di fattori ostetrici principali: sesso del neonato, le due modalità di parto, numero di gravidanze precedenti la donazione (nullipare contro

multipare), peso del neonato ponendo come taglio il peso di 3 kg.

#### Analisi t-test

Analizzando la Tabella 3 si può notare che, sebbene il peso placentare ed il volume di SCO raccolto siano significativamente superiori nel taglio cesareo (TC), le settimane di gestazione ed il TNC sono superiori nel parto spontaneo (PS). [Si ricordi che le settimane di gestazione correlano con le TNC]; le TNC nello spontaneo sono in media 100 milioni in più. Le CD34+ non sono significativamente diverse. In pratica, nel nostro Centro il parto spontaneo produce più cellule.

Nella Tabella 4 si evidenzia come le donatrici al primo parto in assoluto rispetto a tutte le altre (almeno una gravidanza pregressa) presentino l'età materna significativamente più bassa. Anche la durata del travaglio e le settimane di gestazione sono maggiori per le

TABELLA 3 - PARTO SPONTANEO VS TAGLIO CESAREO: CONFRONTI DEI MAGGIORI FATTORI BIOLOGICI E OSTETRICI.

	Parto spontaneo	Taglio cesareo	P
Età madre (n=684)	32,92±4,55	32,54±5,10	NS
Peso neonato (n=642)	3287,30±352,21	3274,82±399,23	NS
Peso placenta (n=668)	475,44±69,64	496,75±72,51	0,000*
Settimane gestazione (n=623)	39,40±0,974	38,68±1,22	0,000*
Rottura sacco (n=362)	136,38±168,10	54,60±173,48	0,000
Volume (n=680)	84,425±23,47	94,656±24,01	0,000*
TNC x 10 <sup>6</sup> (n=671)	937,25±450,25	841,88±356,84	0,003*
CD34+ x 10 <sup>4</sup> (n=224)	326,04±203,93	351,44±237,47	NS
TNC x 10 <sup>3</sup> /ul (n=671)	10,81±3,34	8,70±2,35	0,000*

NS=non significativo; \*p <0,05 (valori significativi)

TABELLA 4 - NULLIPARE VS PLURIPARE.

	Nullipare	Multipare	P
Età madre (n=687)	31,45±(4,82)	34,45±(4,41)	0,000*
Peso neonato (n=650)	3277,93±(403,86)	3295,27±(342,01)	NS
Peso placenta (n=684)	487,60±(72,88)	487,32±(70,82)	NS
Rottura sacco (n=368)	127,79±(200,38)	82,92±(139,05)	0,012*
Settimane gestazione (n=631)	39,30±(1,18)	38,64±(1,04)	0,000*
Durata travaglio (n=211)	298,37±(185,55)	187,57±(158,97)	0,000*
Vol/mL iniziale (n=684)	90,98±(23,99)	87,84±(24,51)	NS
TNC x 10 <sup>6</sup> (n=675)	924,52±(420,22)	826,83±(377,51)	0,002*
TNC x 10 <sup>3</sup> /ul (n=675)	10,00±3,20	9,20±2,80	0,001*
CD34+ tot x 10 <sup>4</sup> (n=225)	338,00±(230,75)	350,32±(213,33)	NS

NS=non significativo; \*p <0,05 (valori significativi)

nullipare, che peraltro raccolgono mediamente 100 milioni di TNC in più, oltre che un più alto valore di concentrazione di TNC per unità di volume.

Se analizziamo solo nelle nullipare il volume raccolto (Tabella 5), esso è maggiore e significativamente diverso nel taglio cesareo, ma ciò non basta a compensare la maggiore raccolta di cellule che è assolutamente superiore nel parto spontaneo:  $2,8 \times 10^3$ /ul TNC e ben 190 milioni di TNC in più. Questo forte e significativo differenziale per le TNC non si evidenzia nelle sole pluripare (825 milioni *vs* 836 milioni); anche se il volume raccolto è a favore del taglio cesareo, resta comunque fortemente aumentata la concentrazione di TNC/ul sempre a favore del parto spontaneo (anche se non fortemente come per le sole nullipare). Il tipo di parto oltre alla nulliparità fa la differenza.

In conclusione, analizzando le donatrici al primo parto in assoluto verso quelle con almeno una gravidanza pregressa vediamo che ovviamente l'età madre è significativamente più bassa per le nullipare, la durata del travaglio e le settimane di gestazione sono maggio-

ri nelle nullipare, e queste ultime raccolgono in media 100 milioni di TNC in più rispetto alle multipare. In altre parole, le nullipare sono più giovani, presentano non solo una durata della gestazione più lunga ma anche maggiore durata del travaglio, una concentrazione di TNC per volume più alta, un più alto numero di TNC totali.

Sulla base dei dati della Tabella 6, abbiamo riscontrato che i nati con peso al di sotto di 3 kg hanno una percentuale di unità bancate del 3,6% sul totale delle unità raccolte, mentre i nati con un peso maggiore di 3 kg hanno una percentuale di bancaggio del 21,8% ( $p=0,001$ ). In pratica nel gruppo delle bancate (con tutti i tetti di bancaggio), ben l'85,7% viene da nati con peso maggiore di 3 kg.

## Discussione e commento ai t-test

Un requisito fondamentale per la riuscita del trapianto in termini di attecchimento è il contenuto cellulare dell'unità di sangue trapiantato (progenitori

TABELLA 5 - SOLO NULLIPARE PER TIPO DI PARTO.

	Parto spontaneo	Taglio cesareo	P
Età madre (n=385)	31,55±(4,11)	31,38±(5,31)	NS
Peso neonato (n=368)	3253,62±(367,10)	3302,20±(436,75)	NS
Peso placenta (n=381)	474,17±(70,39)	497,37±(73,43)	0,002*
Rottura sacco (n=203)	149,40±(176,72)	85,53±(216,76)	0,027*
Settimane gestazione (n=346)	39,49±(0,94)	39,13±(1,33)	0,003*
Durata travaglio (n=103)	275,99±(134,27)	340,00±(272,84)	NS
Vol/mL iniziale (n=380)	86,80±(23,66)	94,19±(24,02)	0,003*
TNC x 10 <sup>6</sup> (n=375)	1027,988±(477,25)	837,82±(350,17)	0,000*
TNC x 10 <sup>3</sup> /ul (n=375)	11,54±3,51	8,73±2,23	0,000*
CD34+ tot x 10 <sup>4</sup> (n=133)	328,57±(197,41)	343,45±(260,59)	NS

NS=non significativo; \*p <0,05 (valori significativi)

TABELLA 6 - PESO NEONATO VS BANCATE/ELIMINATE.

	Peso neonato <3 kg	Peso neonato >3 kg	P
Età madre (n=659)	32,25 ± 5,08	32,95 ± 4,82	NS
Peso neonato (n=662)	2806,12 ± 173,09	3428,46 ± 298,86	0.000
Peso placenta (n=647)	466,76 ± 78,37	492,50 ± 68,09	0.000
Rottura sacco (n=345)	107,63 ± 182,57	114,78 ± 181,23	NS
Settimane gestazione (n=599)	38,54 ± 1,11	39,14 ± 1,13	0.000
Vol/mL iniziale (n=653)	84,77 ± 23,42	91,19 ± 24,07	0.004
TNC x 10 <sup>3</sup> pre (n=644)	8,78 ± 2,96	9,98 ± 3,02	0.000
TNC x 10 <sup>6</sup> (n=644)	752,93 ± 326,03	927,11 ± 415,92	0.000
CD34+ tot x 10 <sup>4</sup> (n=208)	262,24 ± 164,50	356,28 ± 224,52	0.025

ematopoietici e CD34+) e la compatibilità HLA donatore/ricevente (6,7).

In letteratura è stata sottolineata l'importanza del peso neonatale e della placenta, nonché dell'epoca di gravidanza e della durata del travaglio nel predire la cellularità della sacca di SCO raccolta (13-17). I nostri dati confermano che il TNC è maggiore in caso di travaglio prolungato e di peso neonatale maggiore, che esiste un'associazione diretta tra peso placentare e peso fetale. Il peso fetale può essere di conseguenza utilizzato come criterio selettivo nelle banche che raccolgono sangue cordonale prima dell'espulsione della placenta al momento del parto (14,18).

Dal 1° luglio 2011 il tetto di bancaggio è stato spostato da 800 milioni a 1,2 miliardi di TNC (19). Per il futuro quindi dobbiamo cercare di capire quali sono i fattori cruciali che ci consentono di raccogliere e bancare il maggior numero di unità possibili.

Nel nostro studio, come in quello di altri Autori, il peso neonatale è il principale fattore fortemente predittivo per il destino di una raccolta (13-15). Infatti, *rapportando il nuovo tetto di bancaggio* (1,2 miliardi di TNC) *al peso neonatale*, diviso in due categorie principali, al di sopra e al di sotto di 3 kg di peso del neonato, in maniera prospettica, le unità che raccolgono almeno 1,2 miliardi di TNC sono nel 89,3% dei casi provenienti da nati con più di 3 kg di peso e solo il 10,7% da nati con meno 3 kg. Sul totale generale delle raccolte (713 unità), il 16,9% dei nati raccoglie 1,2 miliardi di TNC e pesava almeno 3 kg alla nascita, mentre solo il 2% dei nati che pesano meno di 3 kg ha raccolto 1,2 miliardi di TNC: in altre parole questa analisi ci dice che sembrerebbe non utile raccogliere da nati di peso <3.000 g. Se consideriamo, poi, come variabile il peso neonatale >3.000 g, otteniamo che tutti i principali fattori biologici (TCN, CD34+ e CFU) sono significativamente maggiori nei neonati con più di 3.000 g di peso alla nascita. Le stesse conclusioni si evincono dallo studio attuale, con tetto di bancaggio >800 milioni di TNC, ove analizzando le percentuali di unità bancate/eliminate raffrontate al peso neonatale nelle categorie di peso al di sotto ed al di sopra di 3 kg, osserviamo che i nati con peso al di sotto di 3 kg hanno una percentuale di bancate del 3,6% sul totale delle raccolte, mentre i nati con un peso maggiore di 3 kg hanno una percentuale di bancaggio del 21,8% (p=0,001). In pratica nel gruppo delle bancate (con tutti i tetti di bancaggio) ben l'85,7% viene da nati con peso maggiore di 3 kg.

Concordiamo con Solves (*cut-off* peso neonatale alla raccolta >3.200 gr) e Ballen (*cut-off* peso neonatale alla raccolta >3.600 g) che per la raccolta ideale di SCO il *cut-off* da considerare è un peso neonatale >3.000 g. Quindi, non è indicato raccogliere unità di

SCO da feti di peso <3.000 g, a maggior ragione con il nuovo tetto di bancaggio di 1,2 miliardi di TNC (13,14).

Andiamo ad analizzare il *tipo di parto SP/TC vs TCN infsup 1,2 miliardi di cellule*. Nel gruppo delle donatrici che raccolgono <1,2 miliardi di cellule il 57% dei parti è TC ed il 43% sono PS. Nel gruppo delle donatrici che raccolgono >1,2 miliardi, il rapporto si inverte, cioè il 55,3% delle donazioni proviene da PS, mentre solo il 44,7% proviene dai TC. Nelle maternità bisogna abbassare il numero dei TC a favore dei PS. Dalla Tabella 4, con tetto di bancaggio >800 milioni, si evince che sebbene il peso della placenta ed il volume di SCO raccolto sono significativamente superiori nel TC, le settimane di gestazione ed il numero di TCN sono superiori nel parto spontaneo (si ricordi che le settimane di gravidanza correlano con le TCN); le TCN nel parto spontaneo sono in media 100 milioni in più. In pratica nel nostro Centro i parti spontanei producono più cellularità. Nei centri nascita una politica finalizzata ad abbassare il numero dei TC, soprattutto di elezione, a favore dei parti spontanei, andrebbe a favorire raccolte di SCO più ricche di TNC. In letteratura, infatti, Menagold non riporta una differenza significativa nel volume di SCO raccolto tra taglio cesareo di urgenza associato a stress fetale e taglio cesareo di elezione, ma un aumento di TNC nel primo tipo di TC; lo stress fetale è il parametro che ha un alto impatto sulla mobilitazione di CD34+ e TNC. Infatti le citochinine pro-infiammatorie e gli ormoni da stress sono più bassi nel taglio cesareo di elezione rispetto al parto vaginale; solo nel TC da stress fetale si assiste ad un aumento delle CD34+ e TNC (20).

*TCN vs settimane di gestazione*. I nati a 39-42 settimane di gestazione con un numero di TCN >1200 milioni sono all'incirca il triplo rispetto ai nati con lo stesso range di TCN ma con 37-38 settimane di gestazione (14,3% vs 5,6% rispettivamente, p=0,018). Le madri che partoriscono tra 39-42 settimane sono mediamente più giovani, partoriscono più tardi, hanno una concentrazione di TCN per unità di volume più alta, il tutto ovviamente con nati più pesanti. Tali dati concordano con l'esperienza di Surbek e di Solves secondo cui il volume delle unità raccolte e le TNC aumentano con il passare delle settimane di gravidanza (14,21).

Se consideriamo l'*analisi Parità vs TCN*, nel nostro studio, con tetto di bancaggio >800 milioni, le donatrici al primo parto hanno un'età ovviamente minore rispetto alle pluripare, presentano non solo una durata del travaglio più lunga ma anche settimane di gestazione al parto maggiori. Le primipare raccolgono in media 100 milioni di TCN in più rispetto alle pluripare. Considerando il sottogruppo delle primipare, abbiamo già sottolineato che il volume di SCO raccolto

nel cesareo, benché maggiore, non basta a compensare la maggiore raccolta di TCN, che risulta assolutamente superiore nel parto spontaneo di ben 190 milioni di cellule in più. Tale valore differenziale non si evidenzia quando andiamo a valutare solo le pluripare, 825 milioni *vs* 836 milioni. Nel nostro centro le donne che raccolgono almeno 1,2 miliardi di cellule sono il 18,4% di 713, cioè 131; questo gruppo è composto dal 68,5% da donne al loro primo parto mentre il restante 31,5% è composto da pluripare. Di conseguenza reclutare più primigravide porterebbe ad una ottimizzazione della raccolta di SCO.

## Conclusioni

Secondo la nostra esperienza un “campione tipo” per una raccolta e bancaggio ottimali di cellule staminali da sangue cordonale deve prevedere e rispettare le seguenti caratteristiche: privilegiare il reclutamento da primigravide, con epoca gestazionale al prelievo di SCO tra 37 e 40 settimane, con peso fetale superiore a 3.000 g, prediligere il parto spontaneo, prevedendo il tempo di clampaggio del cordone ombelicale entro 60 secondi e la raccolta di sangue cordonale con placenta inserita ancora *in utero*.

## Bibliografia

1. Wadlow RC, Porter DL. Umbilical cord blood transplantation: where do we stand? *Bio Blood Marrow Transplant* 2002; 8:637-647.
2. Smith S, Neaves W, Teitelbaum S. Adult stem cell treatments for diseases? *Science* 2006;313:439.
3. Brunstein CG, Wagner JE. Cord blood transplantation for adults. *Vox Sang* 2006;91:195-205.
4. Mancinelli F, et al. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplantation Proceedings* 2006;38,1174-1176.
5. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32:397.
6. Lim FTH, et al. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1144-1151.
7. Aroviita P, et al. Association among nucleated cell, CD34+ cell and colony-forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. *Vox Sang* 2003;84: 219-227.
8. Barker, et al. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood* 2010;115: 1843-1849.
9. Gluckman, et al. Milestones in umbilical cord blood transplantation. Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, doi:10.1111/j1365-2141.2011.08598.x,2011.
10. Grisaru D, Deutsch V, Pick M, et al. Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34+ cell content in the umbilical cord blood collected: an old maneuver with new applications. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1240.
11. Donaldson C, Armitage WJ, Laundry V, et al. The impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *Br J Haematol* 1999;106:128.
12. Aufderhaar U, Holzgreve W, danzer E, et al. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. *J Perinatal med* 2003;31:317.
13. Ballen KK, et al. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation* 2001;27:7-14.
14. Solves P, et al. Optimizing donor selection in a cord blood bank. *Eur J Haematol* 2004;72:107-112.
15. Donaldson C, et al. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *British Journal of Haematology* 1999;106:128-132.
16. Jones J, et al. Obstetric predictors of placenta/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:503-509.
17. Nakagawa R, et al. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Tranfusion* 2004;44:262-267.
18. Bouw GM, et al. Quantitative morphology of the placenta.3. The growth of the placenta and its relationship to birth weight. *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol* 8:3-76 In *Pathology of human placenta.*/ Benirschke K, Kaufmann P 2nd. Ed 1990, Springer-Verlag 1990 p.342-348.
19. Verbale riunione del 28/04/2011 da parte di CNS, CNT, IBMDR e GITMO.
20. Manegold G, Meyer-Monard S, Tichelli A, et al. Cesarean section due to fetal distress increases the number of stem cells in umbilical cord blood. *Transfusion* 2008;48:871-876.
21. Surbek DV, Schonfeld B, Tichelli A, et al. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:311-2.