

Il significato della titolazione degli anticorpi in Medicina Trasfusionale: aggiornamento

Presentazione di casi clinici (CSE)

Gianluca Ubezio

***U.O. Medicina Trasfusionale – Ospedale Policlinico San
Martino di Genova***

Il sottoscritto **Gianluca Ubezio**, in qualità di Relatore
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le mie funzioni al fine di trarne vantaggio.





CASO CLINICO 1

SIMTI PRO

M.V. donna di 53 anni, caucasica, con diagnosi di AML, presso Ospedale periferico.

Prima della diagnosi della malattia, non risultano rilievi patologici significativi.

In anamnesi trasfusionale risulta che la pz. abbia avuto due gravidanze a termine e, nelle ultime settimane abbia ricevuto tre unità di emazie concentrate filtrate.

Presso il centro che ha effettuato la diagnosi, la pz. si è sottoposta a chemioterapia di induzione, con remissione di malattia. Stante l'alto rischio di recidiva, si opta per invio a CTMO del nostro ospedale, per consolidamento e avvio a procedura allotrapiantologica.

L'Ematologo, al momento della prima visita, richiede determinazione di gruppo sanguigno e fenotipo Rh/Kell al Laboratorio di immunoematologia.

4	0	4	4	4	0
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

0	0	4	0
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

4	m.f.	0	4	0	4
C	c	E	e	K	k

ABO A, RhD POS

Fenotipo Rh/Kell ?

Che cosa ritieni dovrebbe essere previsto dalla procedura immunoematologica di valutazione pre-allotrapianto?

1. Test all'antiglobulina diretto (DAT) ed indiretto (IAT),
2. Anamnesi farmacologica,
3. Relazione del centro trasfusionale afferente al centro che ha inviato la paziente (numero e tipologia di unità di emc trasfusi, precedenti IAT e/o DAT),
4. Determinazione di gruppo sanguigno con metodica molecolare (almeno ABO/Rh).

1. IAT / DAT

➔ *Sicuramente molto utile, MA non è «al primo posto».*

2. Anamnesi farmacologica

Potenzialmente utile, nel caso in cui i test immunoematologici evidenziassero delle possibili interferenze (ma per il momento abbiamo effettuato un «banale gruppo sanguigno» e non sono state evidenziate alterazioni).

3. Anamnesi immunoematologica

➔ *Aspetto fondamentale, per un corretto inquadramento del paziente.*

4. Gruppo sanguigno in biologia molecolare

Non corretto.

Ruolo nel *networking* dei laboratori di immunoematologia

4	m.f.	O	4	O	4
C	c	E	e	K	k

Fenotipo Rh/Kell ?

Quali considerazioni possiamo fare nell'interpretazione della determinazione di fenotipo Rh/Kell della paziente?

1. E' necessario avere il dettaglio fenotipico della pz (se effettuato) e delle tre unità trasfuse, da parte del centro trasfusionale che ha inizialmente gestito la paziente e da questo sarà possibile desumere il suo fenotipo.
2. Non possiamo escludere la presenza di una mutazione del gene RHCE, responsabile dell'espressione di un antigene *c* mutato.
3. E' opportuno candidare il campione di sangue della paziente ad una determinazione molecolare urgente.

1. Anamnesi trasfusionale

→ *Molto utile, quantomeno per sapere se il fenotipo di base della paziente fosse stato determinato e rispettato al momento della scelta degli emocomponenti dall'altro centro che ha inizialmente gestito la paziente.*

2. Mutazione RHCE

Poco probabile, sia per il setting (paziente recentemente trasfuso), che per l'origine etnica (caucasica), che per l'aspetto della determinazione sierologica (mix-field).

3. Gruppo sanguigno in biologia molecolare

Non ritenuto necessario nell'immediato.

L'ematologia nel frattempo procede rapidamente a valutare l'opportunità di donazione di CSE da un consanguineo. La scelta ricade sul figlio, 35 anni, in salute e con un assetto HLA aploidentico rispetto a quello della paziente.

L'Ematologo decide di inviare un campione di sangue del potenziale donatore, chiedendo la determinazione di gruppo sanguigno completo, fenotipo Rh/Kell, IAT

0	4	4	4	4	0
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

3	2	0	0
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

4	0	0	4	0	4
C	c	E	e	K	k

0	0	0
cell 1	cell 2	cell 3

ABO B, RhD POS

Fenotipo Rh/Kell CCee, kk

RAI NEG

B CCDee, kk



A RhD pos



donatore



ricevente

		DONATORE			
		O	A	B	AB
PAZIENTE	O	=	M	M	M
	A	m	=	bd	M
	B	m	bd	=	M
	AB	m	m	m	=

M=maggiore, m=minore, bd=bidirezionale

Tutte le valutazioni di idoneità del potenziale donatore danno buon esito e pertanto si opta, al termine del consolidamento chemioterapico della paziente, per il suo ricovero al fine di procedere con la mieloablazione e la procedura di allotrapianto di CSE.

Prevedendo una progressiva anemizzazione della paziente durante la chemioterapia, si richiede un type and screen:

4	O	4
anti-A	anti-B	anti-D

4	O	4
cell 1	cell 2	cell 3

PANNELLO IDENTIFICATIVO

Cell.#	Rh-hr	Donor Number	Rh-hr										KELL				DUFFY		KIDD			Sex Linked	LEWIS		MNS				P	LUTHERAN		Special Antigen Typing	Cell.#
			D	C	E	c	e	f	C ^w	V	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Xg ^a	Le ^a	Le ^b	S	s	M	N	P ₁	Lu ^a	Lu ^b			
1	R1wR1	100289	+	+	0	0	+	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	---	1					
2	R1R1	100290	+	+	0	0	+	0	/	+	+	0	+	/	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	---	2				
3	R2R2	100291	+	0	+	+	0	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	++/--	3				
4	Ror	100292	+	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	++++	4				
5	r'r	100293	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	@++++	5				
6	r'r	100294	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	@++++/-	6				
7	rr	100295	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	@++++	7				
8	rr	100296	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	++++	8				
9	rr	100297	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	++++	9				
10	rr	100298	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	++++	10				
11	R1R1	100045	+	+	0	0	+	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	---	11			
	Patient Cells																											++/--					
Mode of Reactivity			37°C/Antiglobulin					Antiglobulin					Variable				Cold				Var.												

Ritenete che il rilievo del test all'antiglobulina indiretto positivo (anti-c + probabile anti-f) condizioni il programma del trapianto allogenico di CSE?

1. Sì,
2. No.

Più in generale, ritenete che il riscontro di alloanticorpi anti-eritrocitari controindichino la procedura di allotrapianto di CSE?

1. Sì, in senso assoluto,
2. Sì, nel caso di donatore positivo per antigene target,
3. No, in nessun caso,
4. Dipende: è un'informazione essenziale sia per garantire la sicurezza della terapia trasfusionale che della infusione del graft. Può condizionare alcuni aspetti peritrapiantologici, ma non rappresenta un ostacolo alla scelta del donatore.

Significato degli alloanticorpi anti-rbc in caso di trapianto allogenico di CSE:
livelli di evidenza della letteratura attualmente disponibile

1. Controindicazione assoluta

Non sono presenti elementi in letteratura che indichino questo tipo di approccio.

2. Controindicazione nel caso di donatore antigene target-positivo

Non sono evidenti dati di letteratura, una volta gestita la fase peri-trapiantologica (titolo alloanticorpale, contenuto eritrocitario del graft ecc.).

3. Nessuna controindicazione

Va gestita la fase peri-trapiantologica, al pari di una trasfusione incompatibile, rapportata all'antigene-positività del donatore, al titolo anticorpale, al suo potere emolitico e al quantitativo di globuli rossi nel graft.

4. Dipende...

➔ *Probabilmente è la risposta più corretta.*

In generale, qual è il significato di un autocontrollo positivo?

1. Autoanticorpi e/o alloanticorpi,
2. Anticorpi diretti contro farmaci,
3. Elevata concentrazione sierica di immunoglobuline
4. Fenomeno di interferenza in vitro

Tutte le affermazioni sono in linea teorica corrette, ma considerando il caso specifico:

1. Autoanticorpi e/o alloanticorpi

➔ Possibile (è fondamentale una corretta e completa anamnesi trasfusionale)

2. Anticorpi diretti contro farmaci

Improbabile

3. Elevata concentrazione sierica di immunoglobuline

Improbabile

4. Fenomeno di interferenza in vitro

➔ Possibile



Ruolo dell'autocontrollo per l'identificazione anticorpale

Nel caso specifico della paziente, quale può essere il significato di un autocontrollo positivo?

1. Recente trasfusione incompatibile,
2. DAT-positività, frequentemente riscontrato in pazienti affetti da patologie oncoematologiche,
3. DAT-positività, da probabile somministrazione di immunoglobuline polivalenti,
4. Fenomeno di interferenza in vitro

1. Trasfusione incompatibile

→ *La recente trasfusione, testimoniata anche dalla presenza di campi misti al tentativo di determinare il fenotipo Rh definisce la necessità di effettuare un DAT e, in caso di conferma della positività eluire la risposta anticorpale.*

2. DAT-positività in LAM

Improbabile.

3. DAT-positività in IVIG

Improbabile, comunque è utile il ragguglio anamnestic.

4. Fenomeno di interferenza in vitro

Poco probabile e comunque è utile effettuare il DAT per escludere interferenze indotte dalla fase plasmatica, test nel quale essa viene sostanzialmente esclusa.

In vista della procedura di allotrapianto di CSE, caratterizzata per incompatibilità ABO-bidirezionale, l'Ematologo richiede al laboratorio di Immunoematologica la titolazione degli anticorpi naturali IgM e IgG anti-AB, sia nel donatore che nella paziente:

DONATORE (INCOMPATIBILITA' MINORE)

TITOLAZIONE ANTI-A (anti-recipient)

Anti-A	1	2	4	8	16	32	64	128
IgM	++++	+++-	+---	----	----	----	----	----
IgG	+++-	+---	----	----	----	----	----	----

Anti-A

IgM 1:4 IgG 1:2

PAZIENTE (INCOMPATIBILITA' MAGGIORE)

TITOLAZIONE ANTI-B (anti-donor)

Anti-B	1	2	4	8	16	32	64	128
IgM	++++	++++	+++-	+---	----	----	----	----
IgG	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+++-	+---

Anti-B

IgM 1:8 IgG 1:128

Se la componente di incompatibilità minore (anti-recipiente o anti-A) non viene considerata clinicamente significativa, nel caso dell'incompatibilità maggiore (anti-paziente o anti-B) quali considerazioni possiamo fare?

1. Il titolo isoagglutinico non rappresenta alcun problema alla procedura trapiantologica,
2. La procedura trapiantologica è controindicata in termini assoluti, pena la possibilità di gravi reazioni da incompatibilità ABO post-infusione,
3. La procedura trapiantologica è complicata, ma può essere gestita da una preparazione del paziente e/o del graft cellulare,
4. Penso ad un errore di laboratorio e riconsidero le modalità della titolazione.

1. Titolo anti-B non significativo

Non corretto.

2. Titolo anti-B ostante la procedura trapiantologica

Non corretto.

3. L'incompatibilità può essere gestita

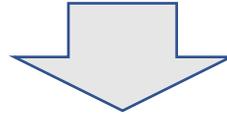
Se in termini generali questa risposta è sicuramente corretta, nel caso specifico la risposta è scorretta.

4. C'è stato un problema nella titolazione

➔ *Probabilmente questa è la risposta più corretta. Vediamo perché...*



IAT e titolazione isoagglutinica anti-AB



Selezione di emazie test positive per singolo antigene target («separare» le risposte anticorpali, nella procedura di titolazione)

	Feno RBC test	1	2	4	8	16	32	64	128
IgG anti-B	B CCDee	+ ---	----	----	----	----	----	----	----
IgG anti-c	O ccdee	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+++	+---

Dopo una prima pianificazione di scambio plasmatico terapeutico per rimuovere parte del titolo isoagglutinico, una più attenta valutazione del titolo anti-B ha portato a considerare la procedura come non necessaria, anche in virtù del fenotipo Rh del donatore (R1R1).

INCOMPATIBILITA' ABO MAGGIORE

ABO mismatch	PBSC/BM graft manipulation	Therapeutic apheresis
<i>Major</i> Recipient anti-donor isohemagglutinins $\geq 1:32$	<i>PBSC:</i> <20 ml RBC: no manipulation; ≥ 20 ml RBC: RBC depletion <i>BM:</i> RBC depletion	plasma exchange with AB plasma or albumin/sodium [26]
<i>Major</i> Recipient anti-donor isohemagglutinins $\leq 1:16$	<i>PBSC:</i> no manipulation <i>BM:</i> infusion without modification possible [11]; to be on the safe side: RBC depletion	plasma exchange with AB plasma or albumin/sodium

modified by Worel N. Transfus Med Hemother 2016;43:3–12

INCOMPATIBILITA' ABO MINORE

ABO mismatch	PBSC/BM graft manipulation	Therapeutic apheresis
<i>Minor</i> Donor anti-recipient isohemagglutinins $\geq 1:256$	<i>PBSC + BM:</i> plasma depletion	experimental: RBC exchange with group O RBCs [17]
<i>Minor</i> Donor anti-recipient isohemagglutinins $\leq 1:128$	<i>PBSC:</i> no manipulation <i>BM:</i> infusion without modification possible [11]; to be on the safe side: plasma depletion	experimental: RBC exchange with group O RBCs [17]

modified by Worel N. Transfus Med Hemother 2016;43:3–12



CASO CLINICO 2

SIMTI PRO

P.S. uomo di 35 anni, caucasico, con diagnosi di AML M3.

L'esordio della malattia è stato caratterizzato da un importante quadro clinico emorragico, complicato da emorragia cerebrale.

La terapia di supporto è riuscita a contenere lo spandimento emorragico e le condizioni del paziente si sono progressivamente stabilizzate.

Il pz si è sottoposto a chemioterapia di induzione, seguita da consolidamento e, stante la giovane età del paziente, l'elevato numero di blasti alla diagnosi e la relativa difficoltà ad ottenere la remissione ematologica dalla malattia, si opta per avviare il paziente ad un percorso di allotrapianto.

L'Ematologo, richiede determinazione di gruppo sanguigno e fenotipo Rh/Kell al nostro Laboratorio di immunoematologia e type and screen.

0	0	0	4	4	0
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

3	2	3	0
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

4	4	0	4	0	4
C	c	E	e	K	k

0	0	4
anti-A	anti-B	anti-D

0	0	0
cell 1	cell 2	cell 3

ABO **O**, RhD **POS**

Fenotipo Rh/Kell **CcDee, kk**

IAT **NEG**

Non essendo disponibili consanguinei idonei alla tipizzazione HLA come candidati donatori, la ricerca si indirizza al Registro Nazionale dei Donatori di Midollo Osseo (IBMDR). L'ematologo seleziona un donatore volontario adulto di IBMDR, 10/10 matched HLA, di cui il centro donatore fornisce il gruppo sanguigno:

ABO A, RhD POS

In vista del trapianto, viene richiesto al Laboratorio di immunoematologia la titolazione isoagglutininica anti-A:

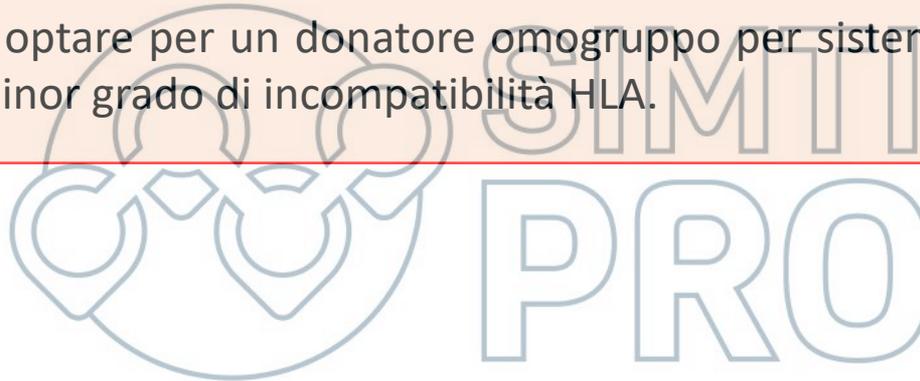
Anti-A	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
IgM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+++	++
IgG	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-

Anti-A

IgM 1:512 IgG 1:8

Alla luce di quanto abbiamo imparato in precedenza:

1. Il titolo isoagglutinico non rappresenta alcun problema alla procedura trapiantologica,
2. Sarà necessario programmare una o più procedure di scambio plasmatico terapeutico,
3. E' preferibile optare per un donatore omogruppo per sistema ABO, anche a costo di un minor grado di incompatibilità HLA.



1. Nessun problema

Risposta sbagliata.

2. PEX

➔ *E' la risposta più corretta.*

3. Cambio di scelta del donatore

Risposta sbagliata: l'elevata compatibilità HLA, a meno di specifici protocolli trapiantologici a ridotto grado di compatibilità, è un fattore prioritario sulla compatibilità immunoematologica in corso di allotrapianto di CSE.

L'ematologo opta per una donazione di PBSC, a ridotto contenuto di globuli rossi, ma il donatore esprime fermamente la preferenza di una donazione di BM, perché timoroso della somministrazione di G-CSF. Il team ematologico, in accordo con il trasfusionale, opta per la programmazione di due sedute di plasmaferesi e, a seconda del titolo isoagglutininico, non esclude anche una procedura di eritrodeplezione del graft il giorno dell'infusione.

Il giorno prima del trapianto si effettua il primo scambio plasmatico terapeutico. Stante l'alto rischio emorragico del paziente e il basso valore di fibrinogenemia, l'Ematologo ritiene importante effettuare scambio plasmatico con plasma fresco scongelato:

TITOLAZIONE PRE-PEX

Anti-A	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
IgM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+---	----
IgG	++++	++++	+---	----	----	----	----	----	----	----

Anti-A
IgM 1:256 IgG 1:4

TITOLAZIONE POST-PEX

Anti-A	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
IgM	++++	++++	++++	+++-	++--	++--	+---	----	----	----
IgG	++++	++++	+++-	++--	+---	+---	----	----	----	----

Anti-A
IgM 1:64 IgG 1:32

La risposta in termini di riduzione isoagglutininica IgM anti-A è stata buona, mentre il titolo IgG è risultato addirittura aumentato. Quale può essere la spiegazione?

1. E' stato evidentemente commesso un errore di laboratorio e deve essere ripetuta la titolazione anti-A post-PEX,
2. Si tratta di un effetto paradossale, che riguarda tipicamente il rebound post-PEX delle IgG,
3. Con ogni probabilità una delle unità di plasma era positivo per la presenza di anticorpi irregolari, che hanno artefatto la titolazione post-PEX,
4. Altro

1. Problema tecnico

Possiamo ragionevolmente escludere problemi tecnici: la titolazione dei campioni pre e post-PEX viene effettuata in parallelo, con metodica automatica, con i medesimi reagenti, nella stessa seduta analitica,

2. Rebound IgG

Sebbene un certo grado di aumento del titolo sia facilmente riscontrabile già 24 ore dopo lo scambio plasmatico, il prelievo per la titolazione post-pex viene effettuato nell'immediatezza del termine della terapia aferetica.

3. Unità plasmatica con IAT positivo

Improbabile che si tratti di anticorpi irregolari.

4. Altro

L'Unità di aferesi ha fatto regolare richiesta di 8 unità di plasma fresco scongelato da frazionamento, segnalando l'indicazione della terapia aferetica, ma non ha esplicitato essere di preparazione ad una procedura di infusione di CSE ABO-incompatibile. Il Servizio Trasfusionale stesso, nel settore di distribuzione emocomponenti ha provveduto a rilasciare unità di plasma di gruppo O, perfettamente compatibili con il gruppo noto della paziente.

GESTIONE DEL TRAPIANTO DI CSE ABO MISMATCH

Fase PRE-trapianto

Preparazione del paziente
al trapianto

PERI-trapianto

Dall'inizio della
chemioterapia mieloablativa
all'*engraftment*

Fase POST-trapianto

Fase successiva
all'*engraftment*

- Valutazione, in due distinte occasioni, della **determinazione di gruppo sanguigno ABO/Rh** del donatore e del paziente,
- **test di Coombs indiretto** in donatore e paziente, stabilendo sia il significato clinico dell'eventuale anticorpo rilevato, sia il significato in corso di trapianto di CSE (espressione dell'antigene target nel donatore / paziente),
- **test di Coombs diretto** del paziente,
- definizione del grado di incompatibilità ABO del trapianto (maggiore, minore, bidirezionale, nessuno) e indicazione dell'eventuale necessità di titolazione isoagglutininica,
- esecuzione e monitoraggio della **titolazione isoagglutininica anti-A/B IgM e IgG**, per definire l'eventuale indicazione all'effettuazione di procedure di preparazione del paziente (es. plasma exchange),
- scelta della tipizzazione ABO/Rh degli emocomponenti in caso di necessità trasfusionale pre-trapianto.





CASO CLINICO 3

SIMTI
PRO

A.A. donna di 52 anni, caucasica, ha effettuato trapianto allogenico a seguito di diagnosi di LMA, circa 10 giorni fa.

La determinazione di gruppo sanguigno della paziente era **A Ccdee, kk**, con IAT negativo.

Ha ricevuto CSE ottenute da sangue periferico, da donatore IBMDR, di gruppo **O RhD positivo**, IAT negativo (incompatibilità MINORE).

Il titolo isoagglutinico del donatore, chiesto dalla U.O. Ematologica al Centro Donatori aveva evidenziato un valore piuttosto elevato (Anti-A IgM 256, IgG 64), ma, valutata la bassa contaminazione di plasma dell'unità di PBSC, non è stato ritenuto necessario deplasmare il graft.

A scopo precauzionale, nelle ore successive all'infusione, si sono verificati gli indici di emolisi del paziente, che non hanno evidenziato significative alterazioni.

Nel periodo pre-trapianto, la prosecuzione della chemioterapia ha indotto una marcata pancitopenia che ha causato un'importante necessità trasfusionale.

Nel mese antecedente al trapianto, la paziente ha necessitato di una unità di emazie e una di piastrine ogni settimana.

D'abitudine, l'ematologo richiede spesso IAT e DAT nella fase pre-trapianto, indipendentemente dai test pre-trasfusionali.

Il DAT della paziente aveva dato esito positivo e, a parte la valutazione delle frazioni, non era stato oggetto di ulteriori analisi, essendo di frequente riscontro tra i pazienti ricoverati in ematologia e non essendoci alterazione degli indici di emolisi.

1	1	0	0	0
IgG+C3d	IgG	C3d	IgA	CTR

Dopo una prima fase dall'infusione delle CSE senza alcun problema clinico significativo, l'Ematologo si accorge di una progressiva anemizzazione della paziente, con un aumento dei fabbisogni trasfusionali.

Il supporto trasfusionale dalla data dell'infusione è sempre stato di emazie irradiate di gruppo **O RhD negative**.

Escluso cause evidenti di sanguinamento attivo, l'Ematologo si accorge di indici di emolisi alterati e invia al laboratorio di immunoematologia l'ennesima richiesta di IAT e TCD:

O	O	O
cell 1	cell 2	cell 3

m.f.	m.f.	0.5	O	O
IgG+C3d	IgG	C3d	IgA	CTR

Ritenete che l'esito dei test immunoematologici sia significativo? Nel caso, quale sarebbe l'approccio laboratoristico più appropriato?

1. No, le alterazioni non sono significative, stante il fatto che la paziente sta facendo un allotrapianto di CSE,
2. Sì, ma l'aumento del fabbisogno trasfusionale è tipico delle fasi successive al trapianto e si correla alla fase di aplasia. Non è pertanto necessario effettuare ulteriori test immunoematologici,
3. Sì, è necessario procedere ad indagini aggiuntive, tra cui l'eluizione anticorpale,
4. Sì, ma la causa più probabile è rappresentata dal trattamento con immunoglobuline, somministrate di frequente a pazienti immunodepressi.

1. No

Risposta sbagliata

2. Sì, ma non serve indagare

Risposta sbagliata

3. Sì; eluato

→ *La risposta è corretta per tre motivi: lo stato di trasfusione-dipendenza (alloanticorpi?), la presenza di mix-field (ci sono emazie sensibilizzate e emazie indenni agli anticorpi anti-eritrocitari?) e la comparsa di una positivizzazione per le frazioni complementari, non presente nella fase pre-trapianto*

4. IVIG

Risposta sbagliata

Si opta per una eluizione anticorpale. L'unica tecnica disponibile e di cui c'è esperienza nel nostro laboratorio è rappresentata dalla eluizione acida:

Quali emazie test devono essere testate sull'eluato:

1. Emazie dello screening anticorpale e, se necessario anche di un pannello,
2. Emazie dello screening anticorpale ed emazie autologhe,
3. Emazie A1, A2, B e O,
4. Emazie dello screening anticorpale, emazie A1 e B.

1. Screen (+panel)

Corretto, ma non basta.

2. Screen + emazie autologhe

Risposta sbagliata.

3. Emazie ABO

Corretto, ma non basta. E' una paziente politrasmusa.

4. Screen + emazie A1 e B

→ *Corretto.*

Questo l'esito dell'eluato:

0	0	0	2	0,5
Cell 1	Cell 2	Cell 3	A1 cell	B cell

Quale condizione patologica può spiegare la condizione di
anemizzazione della paziente?



SINDROME DEL LINFOCITA PASSEGGERO

Complicanza emolitica tardiva del trapianto incompatibile ABO minore di CSE. Rappresenta la principale complicanza, per rilevanza clinica, in caso di incompatibilità ABO minore e deriva dalla presenza di linfociti B / plasmacellule nel graft infuso, capaci di produrre isoagglutinine anti-A/B anti-ricevente (sono anche state riportate risposte sierologiche anti-Rh, -Kell, -Duffy e -Kidd).

L'introduzione del rituximab (**anti-CD20**) nella fase post-infusiva ha significativamente ridotto il rischio di complicanze tardive indotte da incompatibilità ABO minore.

Il timing di presentazione è abitualmente compreso **tra 5 e 14 giorni dopo l'infusione di CSE**. Se gli indici di emolisi aumentano nei giorni successivi al trapianto, bisogna considerare la presenza di linfociti di derivazione del donatore capaci di produrre isoagglutinine anti-ricevente.

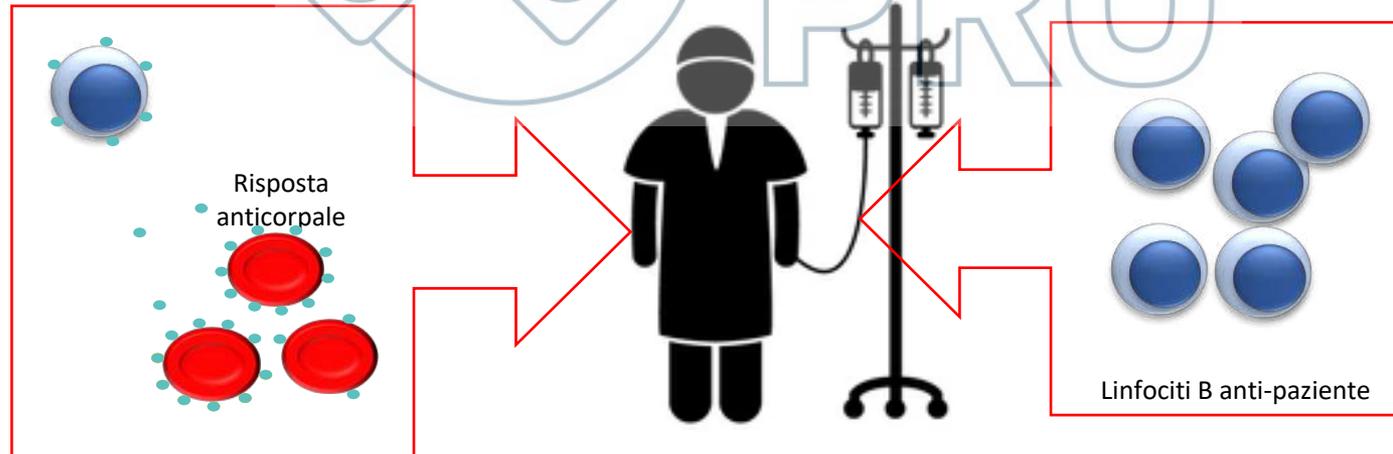
In linea teorica, stante la diversa composizione cellulare, il rischio maggiore di sviluppare la sindrome del linfocita passeggero è stimato essere conseguente all'utilizzo di CSE ottenute da sangue periferico.

SINDROME DEL LINFOCITA PASSEGGERO: LABORATORIO

Il grado di incompatibilità spesso non è stimabile dai test sierologici: l'effetto di adsorbimento anticorpale sulle emazie del paziente spesso impedisce di evidenziare la presenza delle isoagglutinine nella frazione plasmatica del prelievo.

Inoltre, in rari casi descritti, l'entità dell'emolisi è tale da indurre anche distruzione delle emazie trasfuse compatibili («innocent bystander» immune hemolysis).

- **TCD positivo per IgG, C3d o entrambi**, con eluato positivo per la presenza di anticorpi anti-A/B,
- nel caso ci sia il sospetto di una soppressione dell'eritropoiesi indotta da isoagglutinine anti-A/B, è utile monitorare il titolo IgM e IgG nella fase post-trapianto.



GESTIONE DEL TRAPIANTO DI CSE ABO MISMATCH



- Verifica del **gruppo sanguigno del graft**,
- definizione dell'indicazione all'effettuazione di **manipolazioni** semplici del *graft* (de-eritrocitazione in caso di incompatibilità maggiore, de-plasmazione in caso di incompatibilità minore),
- **aggiornamento del sistema informativo** del Servizio Trasfusionale, all'avvenuta **infusione** del *graft*,
- monitoraggio delle complicanze emolitiche precoci post-infusione delle CSE,
- monitoraggio dell'eventuale comparsa di complicanze emolitiche tardive (sindrome del linfocita passeggero, PRCA),
- in caso di riduzione del valore di Hb, tra i test che possono individuare cause non-immunoematologiche derivare dal mismatch-A/B, eseguire verifica del gruppo sanguigno (sempre determinazione diretta ed indiretta), titolazione anti-A/B IgM e IgG.





CASO CLINICO 4

SIMTI
PRO

L.M.P.S. donna di 50 anni, brasiliana, ha effettuato trapianto allogenico a seguito di diagnosi di MDS, circa 6 giorni fa.

La determinazione di gruppo sanguigno della paziente era **A ccDEE, kk**, con IAT negativo.

Ha ricevuto CSE ottenute da donatore related aploidentico (fratello), di gruppo **O RhD positivo**, IAT negativo (incompatibilità MINORE).

Il titolo isoagglutinico del donatore, chiesto dalla U.O. Ematologica al Laboratorio di immunoematologia aveva evidenziato un valore generalmente basso (Anti-A IgM 8, IgG 2). Il graft scelto è stato sangue midollare e, stante il basso valore del titolo, si è scelto di procedere con l'infusione senza manipolazione (lavaggio), ottenendo solo una modesta alterazione laboratoristica degli indici di emolisi.

L'assenza di una procedura condivisa tra Ematologia e Laboratorio di Immunoematologia non permette di avere uno schema fisso di ripetizione dei test IE di base nella fase post-trapianto.

Per le prime 5 settimane risulta evidente un fabbisogno trasfusionale di una-due unità di globuli rossi/settimana, per mantenere un valore basale di Hb intorno a 8 gr/dL.

A due settimane dal trapianto, l'Ematologo chiede una determinazione di gruppo sanguigno:

0	0	0	4	4	0
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

0	0	3	0
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

ABO ?, RhD POS

Come possiamo interpretare questa determinazione di gruppo sanguigno?

1. E' un evidente errore di prelievo al paziente e va chiesto un secondo campione,
2. E' il gruppo sanguigno atteso e dimostra il completo attecchimento del graft, con produzione midollare di emazie. E' pertanto autorizzato il cambio di gruppo sanguigno da A a O,
3. E' il gruppo sanguigno atteso, ma non dimostra la completa produzione midollare di emazie. Non è consigliabile il cambio di gruppo sanguigno da A a O,
4. Nel caso specifico, la sola determinazione di gruppo sanguigno non è un esame sufficiente: devono essere richiesti esami immunoematologici aggiuntivi.

1. Errore di prelievo

Risposta sbagliata.

2. Risultato atteso e cambio gruppo

Risposta sbagliata.

3. Risultato atteso, ma non cambio gruppo

→ *Corretto. Ci sono alcuni dati anamnestici fondamentali, da tenere in considerazione: la trasfusione dipendenza è un elemento che deve essere tenuto in considerazione. Infatti, trattandosi di un trapianto O → A, la scelta delle emazie da trasfondere è O. In una valutazione del gruppo sanguigno del paziente, nel determinare la presenza di emazie O, non è possibile discriminare tra emazie O di derivazione del graft (non manipolato), di derivazione dell'emopoiesi attecchita e delle trasfusioni. Infine va considerata la breve tempistica dal trapianto alla valutazione (due settimane), in cui è difficile pensare già ad una produzione significativa di emazie.*

4. Altri esami

Risposta sbagliata. Tra gli esami immunoematologici aggiuntivi si possono richiedere DAT e verifica della mancanza di isoagglutinine anti-A/B del donatore, anche a 37°C al Coombs, ma questo è importante nel caso di allotrapianto di CSE caratterizzato da incompatibilità MAGGIORE (isoagglutinine anti-donor).

La paziente comunque ha un buon decorso post-trapianto e, a 40 giorni dal trapianto, evidenzia progressivamente migliori valori ematologici per cui non necessita più di supporto trasfusionale.

A 8 mesi dal trapianto, in occasione di un controllo, l'Ematologo invia gruppo sanguigno, IAT e DAT presso il nostro Laboratorio di Immunoematologia.

Gli esami immunoematologici effettuati dal Laboratorio di Immunoematologia danno questi risultati:

1	O	4	O	O	O	O
anti-A	anti-B	anti-D	cell 1	cell 2	cell 3	IgG+C3d

Ritenete questi esami immunoematologici sufficienti per trarre delle conclusioni sul livello di attecchimento? (N.B. paziente trasfusione-indipendente)

1. Sì
2. No

1. Sì

Non corretto.

2. No

→ *Ai fini della definizione di gruppo sanguigno in caso di allotrapianto di CSE ABO-incompatibile, l'approccio più corretto è determinare sempre il gruppo sanguigno completo (la conferma di gruppo sanguigno ABD in occasione dei test pre-trasfusionali risponde ad altri tipi di esigenze).*

1	0	2	4	4	0
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

0	0	3	0
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

ABO ?, RhD POS

Come possiamo interpretare questa determinazione di gruppo sanguigno?

1. Ah! la paziente sta purtroppo recidivando nella malattia di base e dobbiamo subito avvertire il collega ematologo.
2. La bassa positività alla determinazione A non può far escludere una recente trasfusione sbagliata, che non risulta in anamnesi, ma potrebbe essere avvenuta per errore in un altro centro.
3. E' probabilmente un'interferenza indotta da terapie che la paziente sta facendo.
4. Altra ipotesi...

SISTEMA ABO E STATO SECRETIVO

GRUPPI SANGUIGNI ACQUISITI

Lo stato secretivo è geneticamente definito dal gene **FUT2** (allele dominante Se).

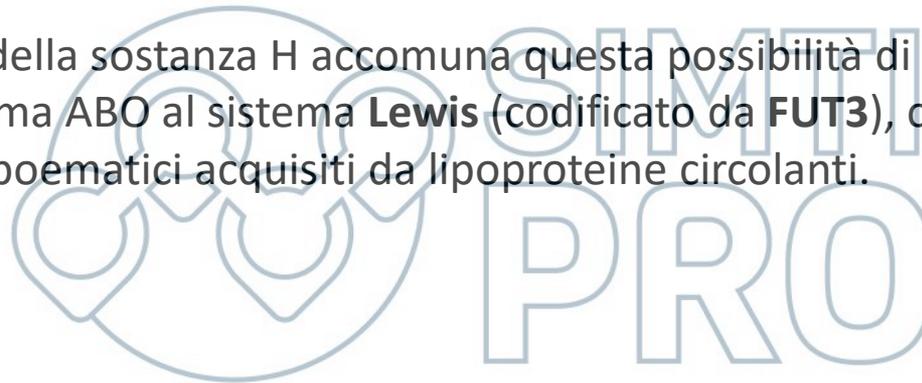
L'**80%** della popolazione caucasica esprime sostanze appartenenti al sistema ABO (sostanza A, B e H) a livello secretivo / fluidi biologici (genetica Se/Se o Se/se). Il 20% dei soggetti invece risulta non-secretore (genetica se), pertanto l'espressione di sostanza H ed eventuale sostanza A e B è relegata a globuli rossi e cellule che normalmente li esprimono.

Lo **stato Se**, che si associa a secrezione di sostanza H, fornisce il substrato per la sua conversione in sostanza A e B, da parte di glicosiltransferasi, secondo la genetica del soggetto.

SISTEMA ABO E STATO SECRETIVO

Lo stato secretivo condiziona l'espressione di sostanza H ed eventuale sostanza A e B anche sui globuli rossi, perché in caso di genetica Se/Se o Se/se parte della sostanza espressa in superficie NON deriva dalla via biosintetica intracellulare, ma dalla acquisizione della forma solubile presente nel plasma.

Lo stato secretivo della sostanza H accomuna questa possibilità di acquisizione «passiva» del sistema ABO al sistema **Lewis** (codificato da **FUT3**), caratterizzato da determinanti gruppoematici acquisiti da lipoproteine circolanti.



SISTEMA ABO E STATO SECRETIVO

	Caucasians	Blacks	Japanese
Le(a+b-)	22	23	0.2
Le(a-b+)	72	55	73
Le(a+b+)	Rare	Rare	16.8
Le(a-b-)	6	22	10

Lo stato secretivo del soggetto può essere parzialmente desunto dall'assetto gruppoemaco Le:

- soggetti **Le(a-b+)** sono sicuramente secretor (Se),
- soggetti **Le(a+b-)** sono sicuramente non-secretor (se),
- soggetti **Le(a-b-)** possono essere secretor o non-secretor (necessità di studio degli antigeni salivari).

GESTIONE DEL TRAPIANTO DI CSE ABO MISMATCH



INDICAZIONI PER LA MODIFICA DEL GRUPPO SANGUIGNO POST-TRAPIANTO DI CSE ABO INCOMPATIBILI

- Definizione del gruppo sanguigno definitivo attraverso la **determinazione del gruppo sanguigno completo**, in due episodi distinti,
- **test di Coombs diretto** negativo,
- verifica della mancanza di isoagglutinine anti-A/B del donatore, anche a 37°C al Coombs,
- verifica della **trasfusione indipendenza**





CASO CLINICO 5

SIMTI
PRO

O.R. uomo di 29 anni, caucasico, ha effettuato trapianto allogenico a seguito di diagnosi di AML, 53 giorni fa.

La determinazione di gruppo sanguigno del paziente era **O CcDee, kk**, con IAT negativo.

Ha ricevuto CSE ottenute da sangue cordonale, di gruppo **O RhD positivo**.

Il paziente ha avuto un decorso post-trapianto caratterizzato da un periodo di trasfusione-dipendenza di 30 giorni circa (numero medio di trasfusioni pari a due unità eritrocitarie e due unità piastriniche a settimana). Attualmente il paziente evidenzia una conta di WBC pari a 3750 cellule /mL, con un certo grado di linfocitosi (52%, linfociti B 1230/mL, linfociti T 650/mL, NK 52/mL).

Poco prima delle dimissioni, un controllo mette in evidenza una rapida anemizzazione con riduzione della Hb da 8,7 gr/dL a 6,2 gr/dL.

Viene primariamente escluso un sanguinamento attivo come causa di anemizzazione.

Quali possono essere le cause che non si possono escludere in un caso clinico del genere?

1. Pure red cell aplasia,
2. Sindrome del linfocita passeggero,
3. Infezione da parvovirus B19,
4. Una causa immunoematologica...

SIMTI
PRO

1. PRCA

Il caso presentato non è caratterizzato da incompatibilità maggiore, ma omogruppo (O RhD pos ---> O RhD pos), quindi è difficile pensare ad una causa immunoematologica di PRCA.

2. Sindrome del linfocita passeggero

Difficilmente correlabile, per la condizione omogruppo O di donatore e ricevente, per la fonte di CSE e per la tempistica tardiva di comparsa dell'anemizzazione.

3. Infezione Parvo B19

Possibile, ma la NAT-DNA per Parvo B19 risulta negativo.

4. IE

➔ *Tra gli esami richiesti dall'Ematologo, ci sono anche gruppo sanguigno, IAT e TCD:*

O	O	O	4	4	O
anti-A	anti-B	anti-AB	anti-D	anti-CDE	CTR

3	3	3	O
A1 cells	A2 cells	B cells	O cells

ABO O, RhD POS

1. PRCA

Il caso presentato non è caratterizzato da incompatibilità maggiore, ma omogrupo (O RhD pos ---> O RhD pos), quindi è difficile pensare ad una causa immunoematologica di PRCA.

2. Sindrome del linfocita passeggero

Difficilmente correlabile sia per la fonte di CSE, sia per la tempistica tardiva di comparsa dell'anemizzazione.

3. Infezione Parvo B19

Possibile, ma la NAT-DNA per Parvo B19 risulta negativo.

4. IE

➔ *Tra gli esami richiesti dall'Ematologo, ci sono anche gruppo sanguigno, IAT e TCD:*

3	3	1
cell 1	cell 2	cell 3

4	4	0.5	0	0
IgG+C3d	IgG	C3d	IgA	CTR

Lo studio delle sottoclassi IgG evidenzia una positività per IgG1 e una forte positività per IgG3. Inoltre l'ematologo verifica la alterazione di tutti gli indici di emolisi, con azzeramento dell'aptoglobina.

Quali esami di approfondimento immunoematologici possono essere utili?

1. Effettuare pannelli identificativi,
2. Eluizione anticorpale,
3. Ripetizione dei test in provetta, nel sospetto di un artefatto di laboratorio,
4. Non sono necessarie ulteriori indagini, perché il quadro laboratoristico è perfettamente chiaro e compatibile con...

1. Pannelli identificativi

➔ *Sicuramente corretto.*

2. Eluizione anticorpale

➔ *Sicuramente corretto, stante anche l'importante trasfusione-dipendenza, per il rilevamento di eventuali alloanticorpi.*

3. Artefatto

Poco probabile. Siamo in un quadro clinico caratterizzato da forte anemizzazione e la causa immunoematologica è tra quelle probabili. Comunque la ripetizione in provetta di IAT e DAT confermano il dato ottenuto con sistema automatico.

4. Diagnosi...

E' ancora presto...

PANNELLO IDENTIFICATIVO

Cell#	Rh-hr	Donor Number	Rh-hr										KELL				DUFFY		KIDD	Sex Linked	LEWIS		MNS				P	LUTHERAN		Special Antigen Typing	Cell#
			D	C	E	c	e	f	C ^w	V	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Xg ^a	Le ^a	Le ^b	S	s	M	N	P ₁	Lu ^a		
1	R1wR1	100289	+	+	0	0	+	0	+	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	++++	1	
2	R1R1	100290	+	+	0	0	+	0	0	/	+	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	++++	2
3	R2R2	100291	+	0	+	+	0	0	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	++++	3
4	Ror	100292	+	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	++++	4	
5	r'r	100293	0	+	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	@+/-	5	
6	r'r	100294	0	0	+	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	@+/-	6
7	rr	100295	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	@+/-	7	
8	rr	100296	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+/-	8
9	rr	100297	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+/-	9	
10	rr	100298	0	0	0	+	+	+	0	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+/-	10	
11	R1R1	100045	+	+	0	0	+	0	0	/	+	+	0	+	/	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	+	++++	11
	Patient Cells																												++++		
Mode of Reactivity			37°C/Antiglobulin										Antiglobulin				Variable		Cold				Var.								

Quali conclusioni si possono desumere?

1. E' un autoanticorpo panreattivo
2. E' un alloanticorpo panreattivo



1. e 2.

A rigore entrambe le risposte possono essere (s)corrette. Serve proseguire con una indagine immunoematologica di secondo livello, rappresentata da:

1. Autoadsorbimento
2. Alloadsorbimento
3. Genotipizzazione eritrocitaria estesa



1. Autoadsorbimento

Non corretto, stante la trasfusione-dipendenza del paziente

2. Alloadsorbimento

➔ *E' l'opzione più corretta*

3. Genotipizzazione

In questo specifico caso ha alcuni limiti, da tenere presenti. Il dato di pieno engraftment del paziente prevede che un genotipo vada a definire l'assetto gruppo-ematico del donatore. La genotipizzazione in parallelo di un campione del paziente pre-trapianto e post-trapianto ha però permesso di escludere la negatività per gruppi sanguigni ad alta frequenza/varianti di gruppo sanguigno:

La serie di alloadsorbimenti ha permesso di rimuovere in tutti i casi la risposta anticorpale presente nel plasma:

La diagnosi più probabile, pertanto è:

Malattia emolitica autoimmune da anticorpi caldi IgG1/IgG3, con presenza di autoanticorpi a preferenziale reattività anti-D, liberi nel plasma.