



46° Convegno Nazionale di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini, 13-15 maggio 2026

**Genotipizzazione in immunoematologia: nuove prospettive.
Esiste un primo livello in biologia molecolare?**



Antonella Matteocci

UOC Medicina Trasfusionale e Cellule Staminali

A.O. S. Camillo Forlanini - ROMA

La sottoscritta **ANTONELLA MATTEOCCHI**

in qualità di Relatrice

dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, **NON**
È in alcun modo portatrice 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 sue funzioni al fine di trarne vantaggio.

INTRODUZIONE

Indagini Molecolari in Immunoematologia

Evoluzione
Diagnostica

Standard

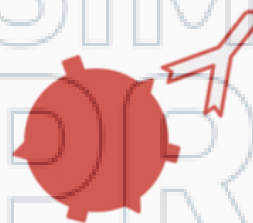
Algoritmi
Decisionali



48 systems



56 Genes



398 Antigens



2,001 Alleles

ISBT
International Society
of Blood Transfusion



QUESITI
APPLICAZIONI
INTERPRETAZIONE
GESTIONE DEL RISULTATO
GRADO DI URGENZA

HELP!



QUALI LABORATORI
I livello
II livello

RACCOMANDAZIONI E STANDARD DELLA SOCIETA' ITALIANA DI MEDICINA TRASFUSIONALE E IMMUNOEMATOLOGIA



Società Italiana
di Medicina Trasfusionale
e Immunoematologia

Raccomandazioni per l'impiego delle metodiche molecolari in immunoematologia

Gruppo di Redazione

Serelina Coluzzi, Donatella Londero, Silvia Manfroi,
Antonella Matteocci, Simone Travali, Maria Antonietta Villa

Edizione 2018



Standard per i Laboratori di Immunoematologia di Riferimento (LIR) e di Biologia Molecolare (LBM)

1ª Edizione - 2021



Blood Transfusion Genomics
Consortium ((BGC)

Media produttività
Bassa risoluzione

Metodi
PCR/gel-
based

Bassa produttività
Alta risoluzione

**Metodi
convenzionali**

SBT
(Sanger)

Piattaforme
molecolari

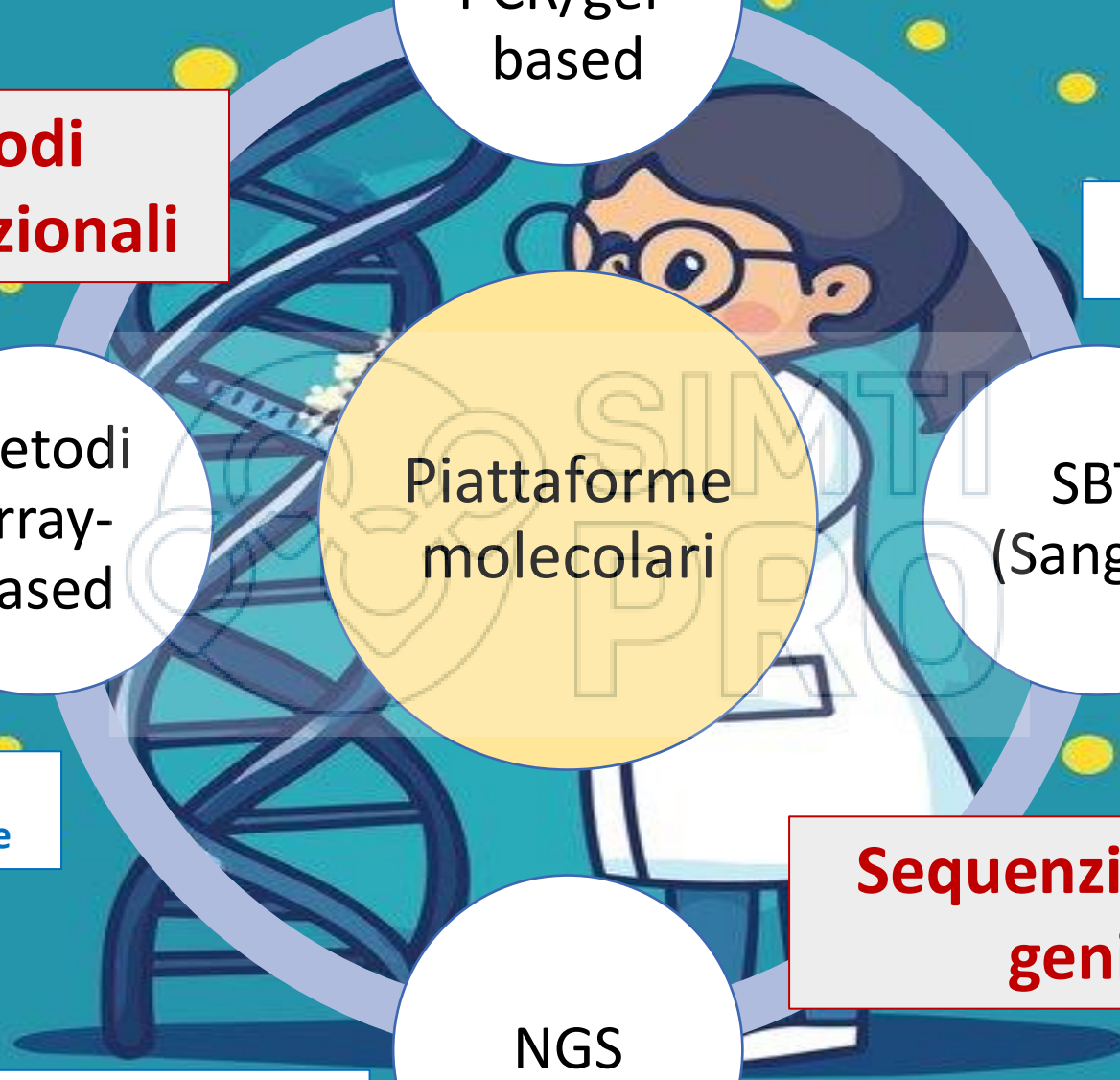
Metodi
array-
based

Alta produttività
Media risoluzione

**Sequenziamento
genico**

NGS

Alta produttività
Alta risoluzione



L'Evoluzione Diagnostica

**Le indagini molecolari hanno
rivoluzionato la diagnostica relativa a:**

- ✓ Determinazione di fenotipi deboli o dubbi.
- ✓ Tipizzazione estesa dei donatori (Gruppi Rari).
- ✓ TAD positivo o trasfusioni recenti.
- ✓ Interferenze da farmaci biologici.

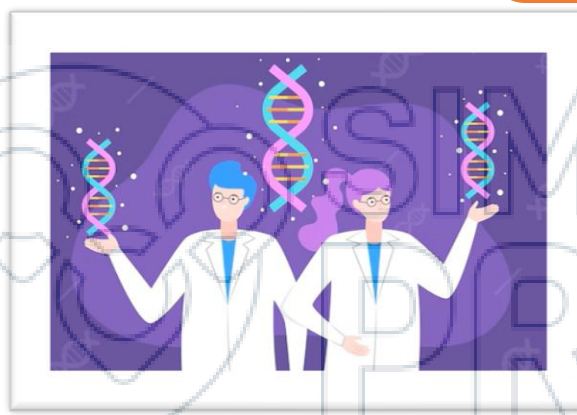


APPLICAZIONI

SETTING PRENATALE

D VARIANT
FNAIT

GENOTIPIZZAZIONE
FETALE DA PLASMA
MATERNO (NIPT)



DONATORI

ATG DEBOLI O
VARIANTI
DEL (D- C+/E+)

REGISTRO
GRUPPI RARI



PAZIENTI

MEA
TRAPIANTATI CSE

POLITRASFUSI
EMOGLOBINOPATICI

INTERFERENZE

Farmaci
biologici

DAT+

STANDARD CNS SIMTI 2021 - LIR e LBM

Definiscono i LIR/LBM come Laboratori ad elevata specializzazione presenti all'interno di ST accreditate e autorizzate che eseguono indagini sieromolecolari per:



Diagnostica Complessa

Auto/alloimmunizzazione in ambito eritrocitario e piastrinico.



Varianti Antigeniche

Risoluzione di discrepanze e conferma di fenotipi rari.

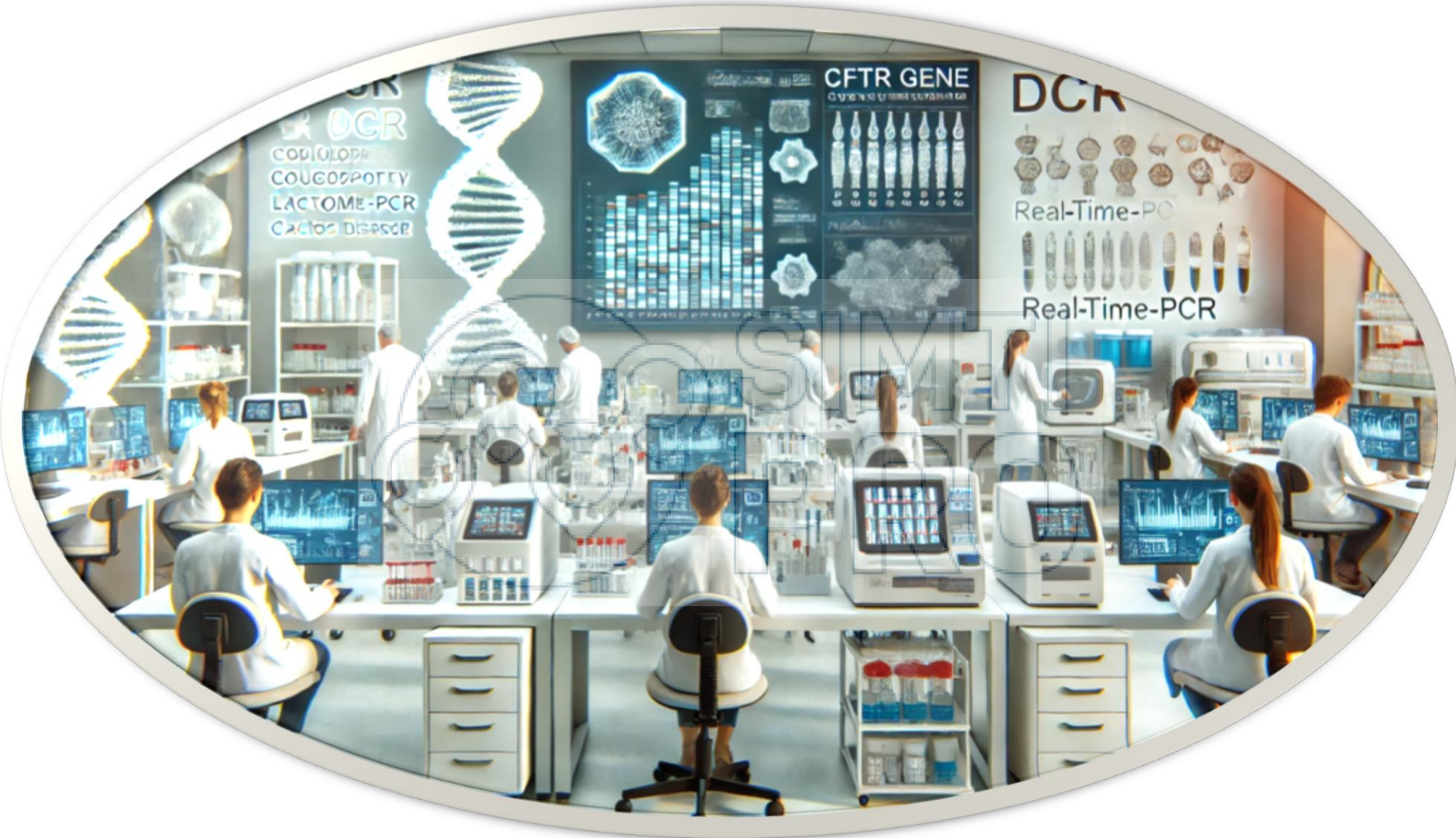


Consulenza

Supporto trasfusionale e ostetrico-prenatale.

Stabiliscono specifici algoritmi diagnostici basati sulle più recenti evidenze scientifiche.

QUALI SONO I REQUISITI DEI LIR/LBM?



Responsabile LIR / LBM – Requisiti Expertise

5 anni

Esperienza documentata in
Immunoematologia
sierologica (LIR)

2 anni

Esperienza documentata in
Immunoematologia
molecolare (LBM)

GESTIONE DELLE RISORSE

IMPLEMENTAZIONE E CONVALIDA TECNOLOGIE

**QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE E
MANTENIMENTO DELLE COMPETENZE**

**PARTECIPAZIONE A PROGRAMMI ANNUALI DI
PROFICIENCY TESTING PER LIR / LBM**

Requisiti Quantitativi – LIR / LBM

100

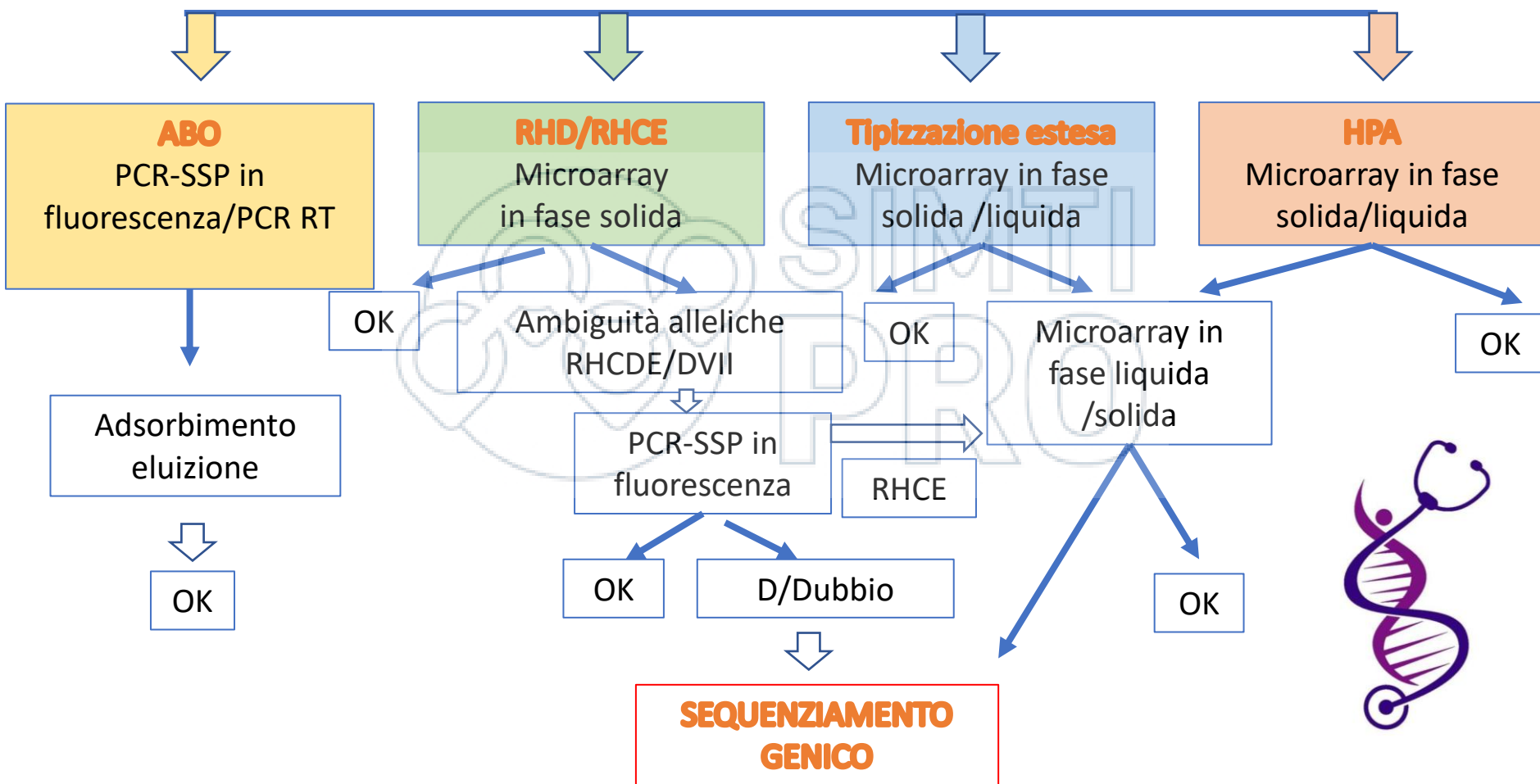
Indagini complesse / anno
(LIR)

500

Tipizzazioni molecolari / anno
(LBM)

Il LBM deve disporre di **due metodiche differenti** di analisi genomica per i principali antigeni eritrocitari e piastrinici

Tipizzazione genomica: algoritmo per l'utilizzo delle piattaforme molecolari



PROPOSTA MODELLO ORGANIZZATIVO PER INDAGINI MOLECOLARI IN LABORATORI DI I E II LIVELLO

Livello	Struttura	Competenze
I Livello (1 piattaforma)	<i>Servizi Trasfusionali (ST)</i>	Genotipizzazione <u>urgente</u> : politrasfusi, MEA, ABO/RhD debole (<i>tecnologia a bassa produttività</i>)
	<i>Centri Lavorazione (CLVE)</i>	Centralizzazione feno/genotipizzazione <u>estesa</u> dei donatori (<i>tecnologia ad elevata produttività</i>).
II Livello (2 piattaforme)	<i>LIR / LBM coordinamento tecnico-scientifico (riunioni periodiche con ST e CLVE)</i>	Immunizzazione complessa eritrocitaria e piastrinica, risoluzione discrepanze e ambiguità antigeniche e alleliche, conferme gruppi rari (<i>genotipizzazione fetale e NGS</i>)

I Laboratori che non possiedono i requisiti tecnologici e organizzativi stabiliti per i LIR/LBM non possono effettuare indagini diagnostiche di II livello per altre ST.

LA RETE MOLECOLARE REGIONALE

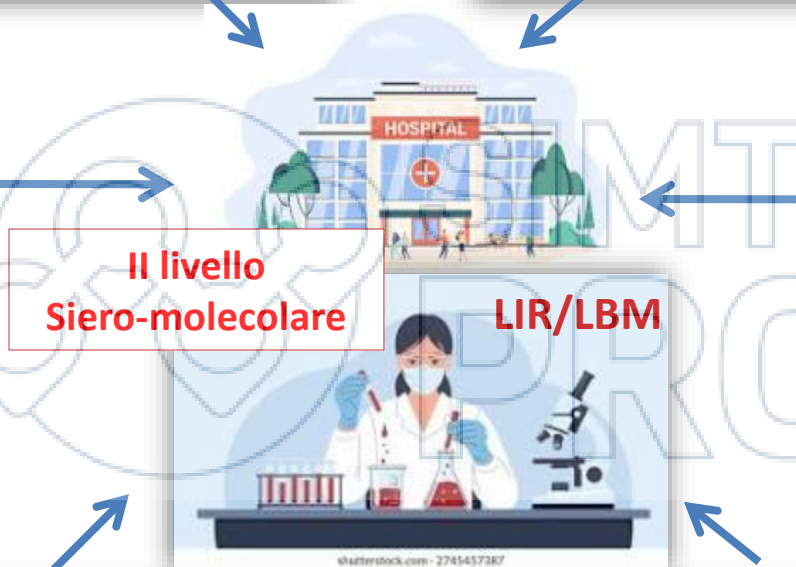
I livello
Urgenza
genotipizzazione
pazienti



I livello
Urgenza
genotipizzazione
pazienti



I livello
Feno/Genotipizzazione
donatori



I livello
Feno/Genotipizzazione
donatori

I livello
Urgenza
genotipizzazione
pazienti



I livello
Urgenza
genotipizzazione
pazienti

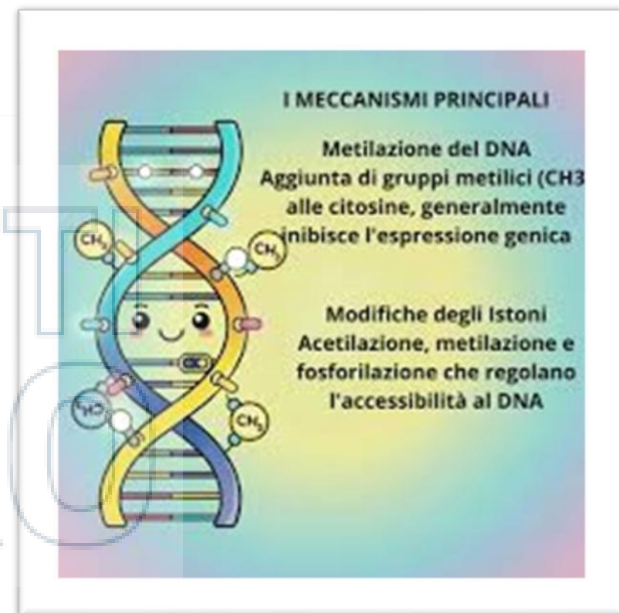
Il genotipo non è il fenotipo



Criticità diagnostiche: il genotipo non è il fenotipo

L'interpretazione e la gestione dei risultati dei test molecolari rappresentano gli aspetti maggiormente critici.

Il genotipo di un individuo può consentire di predire il fenotipo eritrocitario/piastrinico, ma spesso a causa di meccanismi di regolazione genica (epigenetica) non esiste corrispondenza tra ciò che si osserva a livello genetico e ciò che è espresso a livello biochimico.



Il risultato di un test molecolare in immunoematologia deve essere sempre confrontato e integrato con gli esiti dei test sierologici, ove possibile.

Algoritmi diagnostici siero/molecolari - ABO e RhD

Discrepanza ABO

- ✓ Eseguire adsorbimento-eluzione PRIMA dell'analisi genomica.
- ✓ Kit molecolari conclusivi solo nel 50% dei casi.

Discrepanza RhD

- ✓ Se le metodiche sierologiche e genomiche non risultano concordanti si deve ricorrere alla seconda piattaforma molecolare del LIR/LBM.

- ✓ I **fenotipi rari** determinati con la tipizzazione genomica devono essere sempre confermati con le metodiche sierologiche, se antisieri disponibili, oppure con una seconda tecnologia molecolare non presente nel Laboratorio di I livello.

Il fenotipo Fy(a-b-) dovrebbe essere confermato in biologia molecolare per stabilire se è presente la mutazione GATA nel sito promoter del gene *FY*B*, responsabile della mancata espressione dell'antigene Fyb solo sulla membrana dei globuli rossi ma non delle cellule non eritroidi: la conferma della presenza della mutazione GATA permette di trasfondere il paziente con globuli rossi Fyb positivi senza alcun rischio di alloimmunizzazione eritrocitaria.

GESTIONE DELLE DISCREPANZE RHD

Discrepanza tecnologia
in uso

- CRITERI SIEROLOGICI



Altre tecnologie

- CAT
- MICROPIASTRA
- FASE LIQUIDA



TAD

NEGATIVO

POSITIVO

- APLOTIO Rh



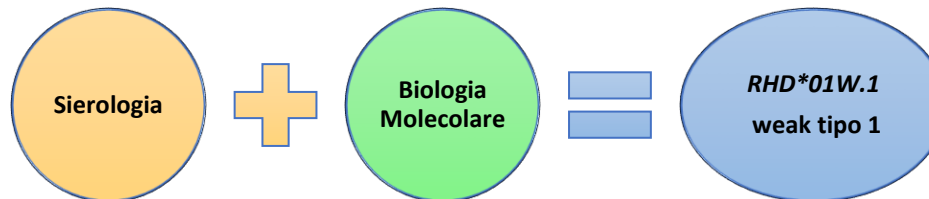
REFERTO
COMMENTO



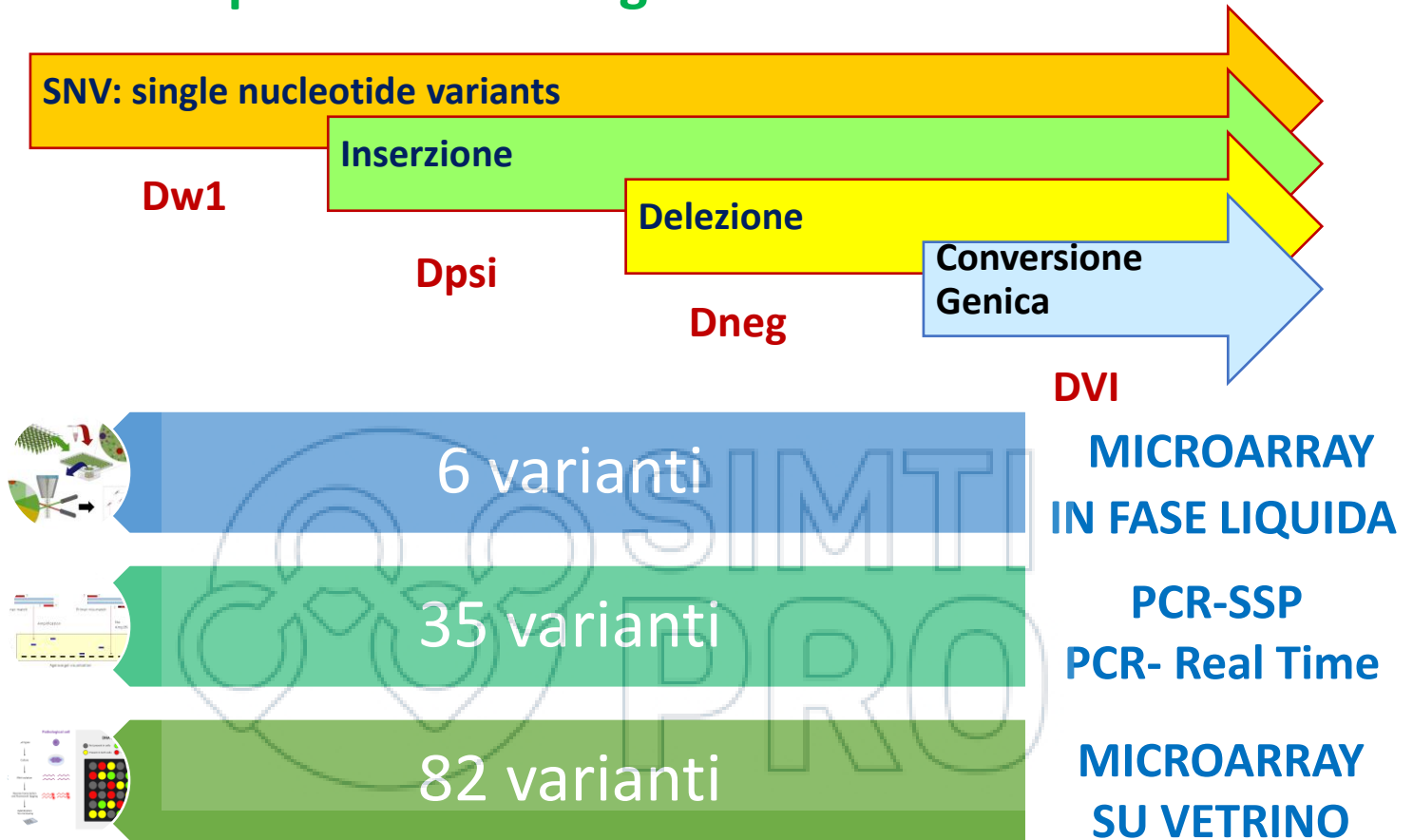
BIOLOGIA
MOLECOLARE
Fenotipo predetto



SIERI ANTI-EPITOPI



RHD e piattaforme diagnostiche convenzionali



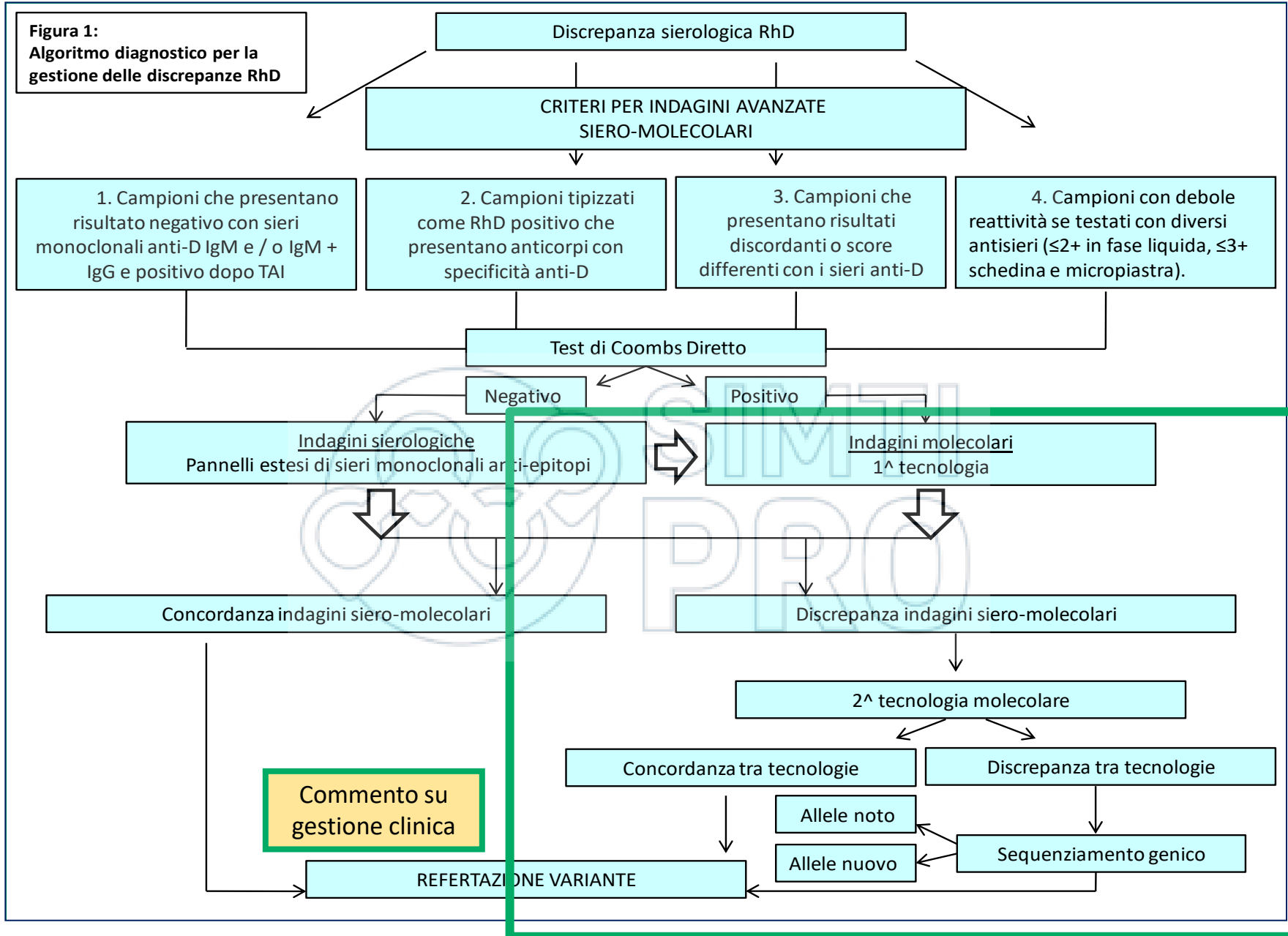
DNA Reference Reagents for Genotyping *RH* Variants

Emilia Sippert,^{*} Evgeniya Volkova,^{*} Meagan Rippee-Brooks,^{*} Gregory A. Denomme,^{††} Willy A. Flegel,[§] Christine Lee,[‡] Richardae Araujo,[‡] Orijei Illoh,^{*} Zhugong Liu,^{*} Maria Rios,^{*} and Collaborative Study Group



J Mol Diagn. 2024 Jun;26(6):456-466

Figura 1:
Algoritmo diagnostico per la
gestione delle discrepanze RhD



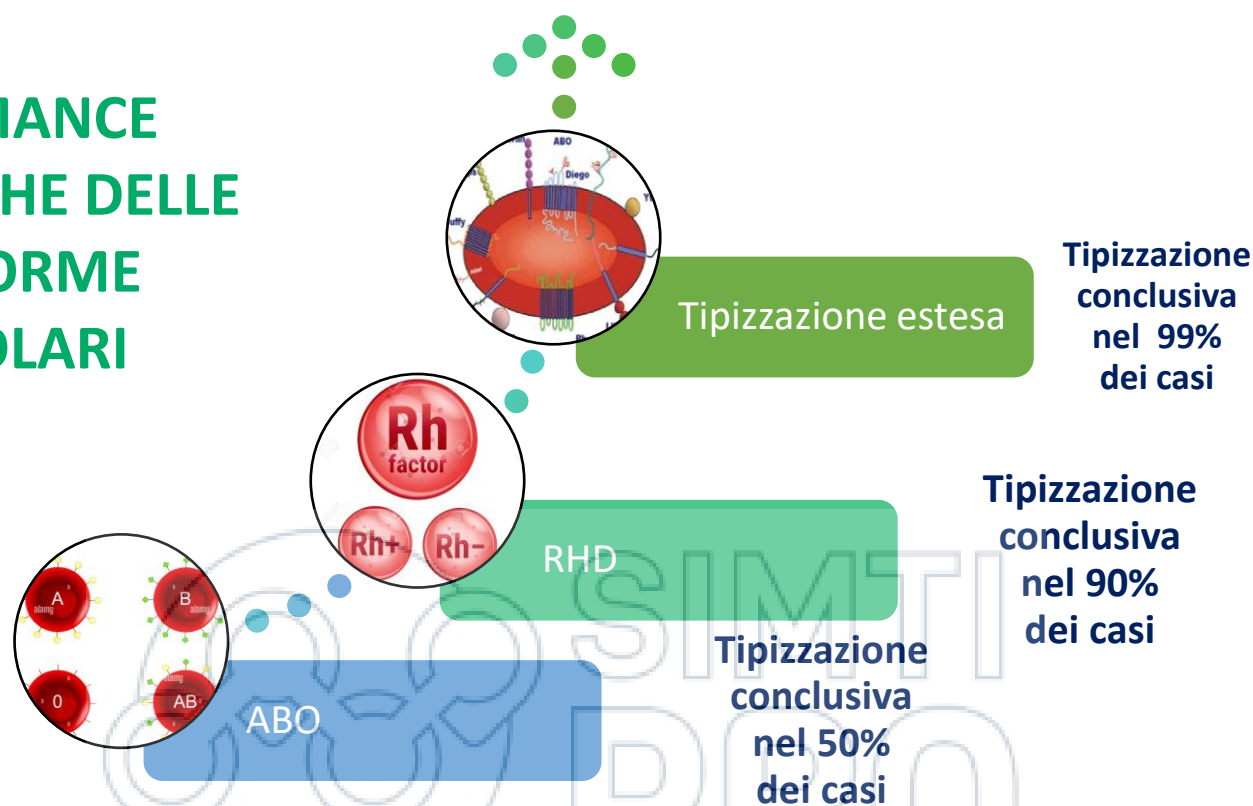
Standard di refertazione analisi genomiche

Il referto (Raccomandazioni 2018) deve contenere:



- ✓ Tipologia di test e metodi.
- ✓ Risultato come genotipo/allele.
- ✓ Fenotipo predetto.
- ✓ Conclusioni diagnostico-cliniche con indicazioni sulla gestione ostetrico-trasfusionale

PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DELLE PIATTAFORME MOLECOLARI



Incluse le varianti più comuni nei kit

Alcuni alleli null non determinati

Polimorfismi aggiuntivi con «alleli drop out» e falsi negativi

Nuovi alleli non presenti nei kit

Alleli ibridi o silenti con falsi positivi o negativi

Mutazioni non determinate al di fuori della regione target

LIMITI DIAGNOSTICI DELLE PIATTAFORME MOLECOLARI

Conclusioni

- ❑ Per le indagini molecolari in immunoematologia potrebbe essere previsto un nuovo modello organizzativo nella **Rete Trasfusionale Regionale**, con Laboratori di I livello per indagini molecolari nelle ST (esami urgenti) e nei CLVE (tipizzazione estesa donatori). **I LIR/LBM dovrebbero avere funzioni di coordinamento tecnico-scientifico di tale Rete Molecolare.**
- ❑ Il **risultato di un test molecolare** in immunoematologia deve essere sempre confrontato e integrato con gli esiti dei test sierologici, ove possibile, ed essere refertato secondo le Raccomandazioni SIMTI 2018.
- ❑ I **risultati dubbi o inconclusivi** dei Laboratori di I livello devono essere inviati ai LIR/LBM per gli approfondimenti diagnostici di II livello con tecnologie sierologiche/molecolari aggiuntive secondo rigorosi protocolli decisionali che permettono la definizione e la gestione anche di alleli rari o mai descritti in letteratura
- ❑ *Formazione del personale, convalida dei sistemi implementati, aderenza a Raccomandazioni/Standard e partecipazione a programmi EQA*

**Commissione SIMTI
'Second Opinion' in
Immunoematologia**

segreteria@simti.it



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!