

45°

**Convegno Nazionale  
di Studi di Medicina Trasfusionale**

Rimini | 29-31 maggio 2024



***Identificazione anticorpi irregolari:  
algoritmo diagnostico***

***Serelina Coluzzi***

*UOC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale*

*Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I-Sapienza , Roma*

La sottoscritta, 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.*



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Ledi', is positioned over a large, faint watermark that says 'SIMPTI PRO'.

# LA RICERCA DI ANTICORPI ERITROCITARI IRREGOLARI

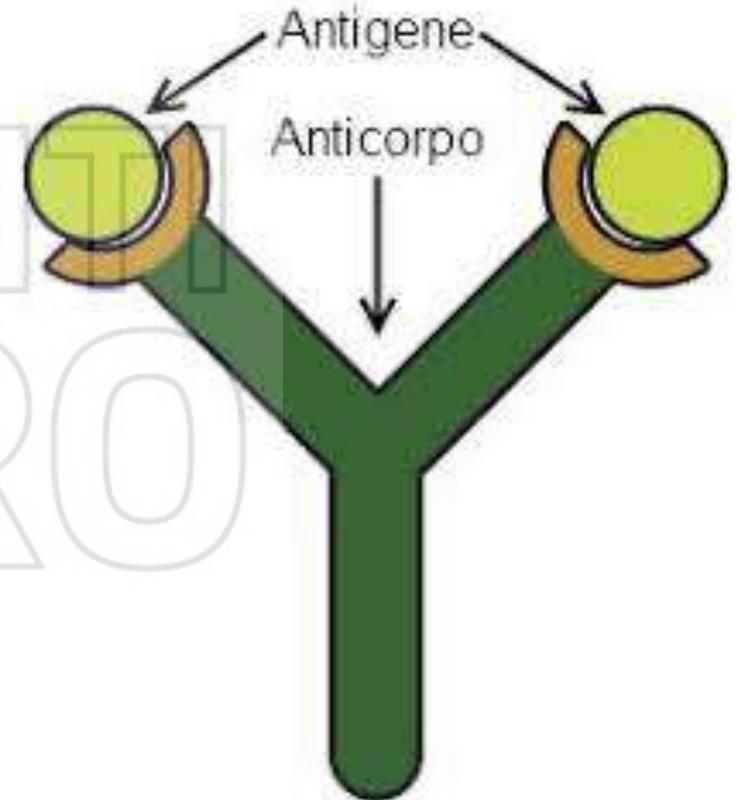


Un test di screening negativo correla con una compatibilità al cross-match di oltre il 99%

# Identificazione anticorpale

---

- L'**agglutinazione** in immunoematologia è espressione dell'avvenuta reazione Ag/Ac
- Questo **metodo semplice, sensibile e specifico** è ancora considerato il **gold standard** per l'identificazione degli anticorpi eritrocitari irregolari

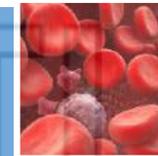


# RICERCA DI ANTICORPI ERITROCITARI IRREGOLARI POSITIVA



ALLOIMMUNIZZAZIONE

ALLOIMMUNIZZAZIONE COMPLESSA  
(miscela Ac)



AUTOIMMUNIZZAZIONE

ALLOIMMUNIZZAZIONE verso Ag  
ad elevata frequenza



INTERFERENZE

# Significato clinico degli anticorpi: regola generale

- Ac reattivi a T prossime a 37° C e/o al TAI: *potenzialmente significativi*
- Ac reattivi a T.A.: *non significativi*

**Caratterizzazione del range termico** di attività degli anticorpi



parametro di valutazione della significatività clinica  
dell'anticorpo

# Significato clinico degli anticorpi

Anti-A<sub>1</sub>, -M, -N, -P<sub>1</sub>, -Le<sup>a</sup>, -Le<sup>b</sup>  
**non reattivi a 37° C**

sono considerati **non significativi**  
dal punto di vista clinico

# Significato clinico degli anticorpi: eccezioni alla regola

- Anti-Ch, anti-Rg, anti-Knops (HTLA, high titre-low avidity ) .... hanno scarso o nullo significato clinico anche se reattivi al TAI
- Anti-Vel, anti-PP1P<sup>k</sup>....causano emolisi in vivo anche se in genere reagiscono solo a basse temperature

## Significatività clinica degli anticorpi

Generalmente clinicamente significativo	Talvolta clinicamente significativo	Non clinicamente significativo (se reattivo T<37°C)	Generalmente non clinicamente significativo
A and B	AnWj	A1	Chido/Rodgers
Diego	At <sup>a</sup>	H	Cost
Duffy	Colton	Le <sup>a</sup>	JMH
H in O <sub>h</sub>	Cromer	Lutheran	HLA/Bg
Kell	Dombrock	M, N <sup>†</sup>	Knops
Kidd	Gerbich	P1	Le <sup>b</sup>
P	Indian	Sd <sup>a</sup>	Xg <sup>a</sup>
PP1P <sup>k</sup>	Jr <sup>a</sup>		
Rh	Kx		
S, s, U	Lan		
Vel	Landsteiner-Wiener		
	Scianna		
	Yt <sup>a</sup>		

# Anticorpo clinicamente significativo?

*“Capace di accelerare la distruzione degli eritrociti che mostrano l’antigene verso cui l’anticorpo è rivolto”*

# Identificazione anticorpale: utilizzo di pannelli /sistemi di ditte diverse

**Table 1.** Samples with discrepant results in the antibody screening

Sample	DG Gel	DiaMed-ID	Ortho BioVue	Antibody screening
1	Negative	Negative	3+	Cell I
	Negative	Negative	3+	Cell II
2	Negative	Negative	Negative	Cell I
	1+	Negative	1+	Cell II
3	Negative	Negative	Negative	Cell I
	Negative	Negative	2+	Cell II
4	Negative	Negative	Negative	Cell I
	1+	Negative	1+	Cell II
5	Negative	Negative	Negative	Cell I
	+/-	Negative	1+	Cell II

0,17% discrepanti

Sample	DG Gel	DiaMed-ID	Ortho BioVue	Final result
1	Negative	Negative	Panagglutinin	Negative*
2	Anti-Jk <sup>a</sup>	Negative	Anti-Jk <sup>a</sup>	Anti-Jk <sup>a</sup> †
3	Negative	Negative	Unspecified agglutination	Negative*
4	Anti-E	Anti-E	Anti-E	Anti-E‡
5	Anti-E	Anti-E	Anti-E	Anti-E‡

\*Negative result with papain-treated RBCs and PEG technique.

†Antibody specificity confirmed with the PEG technique.

‡Antibody specificity confirmed with papain-treated RBC.

*Cid J. Transfusion Medicine, 2006, 16, 131*

# Identificazione anticorpale: utilizzo di pannelli /sistemi di ditte diverse

**Table 4.** Estimated diagnostic accuracy of the three microtube agglutination systems based on the antibody screening values

	DG Gel	DiaMed-ID	Ortho BioVue
True positive	124	121	124
False positive	0	0	2
True negative	3000	3000	2998
False negative	0	3	0
Sensitivity	100%	97.58%	100%
(95% CI)	(97.07–100)	(93.09–99.50)	(97.07–100)
Specificity	100%	100%	99.93%
(95% CI)	(99.88–100)	(99.88–100)	(99.76–99.99)
Predictive positive value	100%	100%	98.41%
(95% CI)	(97.07–100)	(97–100)	(94.38–99.81)
Predictive negative value	100%	99.9%	100%
(95% CI) 0,17% discrepanti	(99.88–100)	(99.71–99.98)	(99.88–100)
Efficiency	100%	99.9%	99.94%
(95% CI)	(99.88–100)	(99.72–99.98)	(99.77–99.99)

- Supporto (gel, microsfere)
- Volume del campione
- LISS diversi (diversa conduttività)
- Diversi parametri di incubazione e centrifugazione

*Cid J. Transfusion Medicine, 2006, 16, 131*

Conclusioni: tutti e tre i sistemi hanno dimostrato un elevato grado di accuratezza diagnostica

# Identificazione anticorpale: fase solida

- Può mostrare una maggiore sensibilità nel rilevare anticorpi verso antigeni Kidd
- Kay B. et al.: 105 pazienti con anti-Jk<sup>a</sup> su 88.478 screening effettuati con SPRCA; in 32 casi il gel test aveva avuto esito negativo (26 casi) o inconclusivo (6 casi).

TABLE 2. Summary of anti-Jk<sup>a</sup> patients identified by SPRCA only on initial identification

Anti-Jk <sup>a</sup> patient category	DHTR	Possible DHTR	DSTR	History of pregnancy	Unknown transfusion history	Transfused > 28 days prior	Total
Total number of patients in each category	6	3	8	2	7	6	32
Had one or more subsequent samples tested	4	2	7	0	4	3	20
Had no samples after initial identification of anti-Jk <sup>a</sup>	2	1	1	2	3	3	12
Had one or more subsequent samples tested by gel ID	3	2	4	0	0	3	12
Gel ID reactive in the patient's latest sample	1	0	0	0	0	0	1
Gel ID nonreactive in patient's latest sample	2	1	0	0	0	1	4
Gel ID never reactive	1	1	6	0	0	1	9
Initial gel ID negative but became positive subsequently	1	0	0	0	0	1	2
SPRCA screen reactive in patient's latest subsequent sample	1	1	1	0	1	0	4
SPRCA screen nonreactive in patient's latest subsequent sample	3	1	7	0	2	3	16

Kay B et al. *Transfusion* 2016

DHTR: delayed hemolytic transfusion reaction  
DSTR: delayed serologic reaction  
SPRCA: solid-phase red blood cell adherence

# Ricerca di anticorpi eritrocitari irregolari POSITIVA

## Identificazione delle specificità anticorpali coinvolte

Considerare:

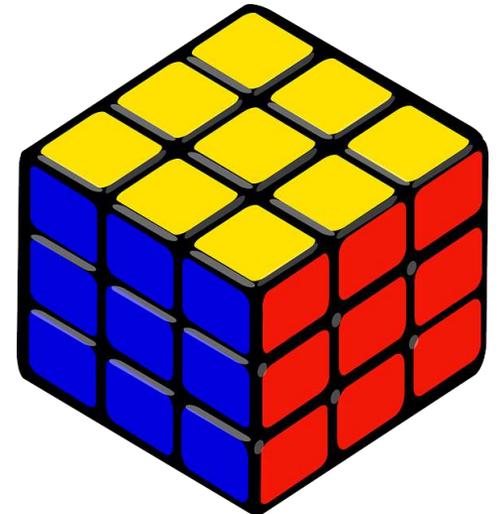


- frequenze dei fenotipi dei diversi sistemi gruppo-ematici
- anticorpi riscontrati con maggior frequenza in relazione all'immunogenicità degli antigeni
- effetto della «dose» di antigene
- comportamento sierologico dell'anticorpo (temperatura di reazione, trattamento enzimatico, ...)
- tecniche preferenziali per evidenziare gli anticorpi



# Identificazione anticorpale: regole generali

- Registrare lo score di reazione impiegando tutti i possibili gradi (da 0,5 a 4+)
- Applicare il metodo del «*crossing-out*»
- Osservare il comportamento sierologico:
  - T di azione
  - effetto dose dell'antigene
  - capacità di fissare il complemento e indurre emolisi
- Esaminare il pattern di reazione per ciascuna fase del test
- Considerare il fenotipo eritrocitario del paziente



# Caratteristiche di reattività degli anticorpi

- **Agglutinazione debole:** anticorpi freddi, HTLA
- **Emolisi :** -I, -H, -IH, -Vel, -Lewis, -PP1Pk, -Jk3
- **Reazione a «campo misto»:** -Lua, -Sda, -Xga

# Reattività degli anticorpi: regole per l'interpretazione

Cell Number	D	C	E	e	M	N	S	s	P1	Lea	Lgb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG	
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2 <sup>+</sup>	0	0
2	/	/	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
3	/	/	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
4	+	0	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	0	+	+	+	2 <sup>+</sup>	0	0
5	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
6	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	2 <sup>+</sup>	0	0
8	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
9	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	0	+	+	+	2 <sup>+</sup>	0	0
10	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
11	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	0	0
Patient Typing																			0	0	0

INTERPRETATION:

Le cellule 1, 4 e 7 sono positive per l'antigene e danno una reazione positiva nel test in fisiologica  
 Le cellule 8, 10 e 11 sono negative per l'antigene e non danno reazione positiva nel test in fisiologica

# Alloimmunizzazione complessa

Miscela di anticorpi?

Autoimmunizzazione?

Alloimmunizzazione  
verso Ag ad elevata frequenza?

Necessario **osservare il comportamento** con:

- Metodi e tecnologie diversi (gel, fase solida, LISS, enzimi)
- Pannelli eritrocitari diversi/cellule selezionate
- Trattamento dei globuli rossi con enzimi (ficina, papaina, tripsina,...)
- Trattamento degli eritrociti con DTT
- Auto/allo adsorbimenti

**Definire il fenotipo eritrocitario esteso** del paziente:

- per gli antigeni dei sistemi gruppo-ematici più comuni
- per gli antigeni ad elevata frequenza (se disponibili gli antisieri o se possibile tipizzazione mediante eritrogenomica) (considerare il background etnico della paziente, es: Asiatici → In<sup>b</sup>; Neri → U, Js<sup>b</sup>)

Effettuare un **X-match** tra **siero del paziente** ed aliquote di **eritrociti di fenotipo raro** (se disponibili) (attenzione alla compatibilità ABO!)

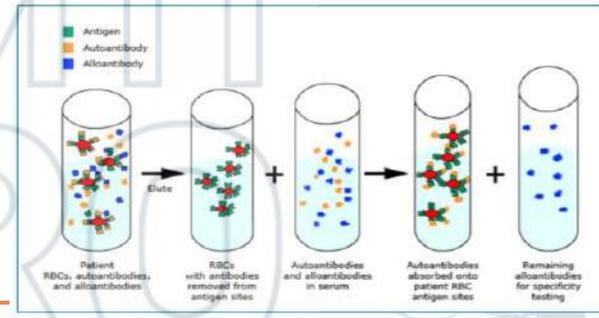
I  
R  
L

# Alloimmunizzazione complessa

In caso di **panagglutinazione** è necessario SEMPRE indagare per l'**eventuale presenza di alloanticorpi** mascherati dalla panreattività

Il miglior metodo consiste nell'effettuare un **adsorbimento del siero con eritrociti autologhi**

L'adsorbimento con eritrociti omologhi potrebbe comportare l'adsorbimento anche di anticorpi rivolti verso antigeni ad elevata frequenza, che potrebbero avere rilevanza clinica.



## Gestione trasfusionale:

in presenza di anticorpi verso antigeni ad elevata frequenza è necessario attivare la ricerca di donatori compatibili in ambito familiare (fratria) e presso le banche di fenotipi rari

# Antigeni ad elevata frequenza (HFA: high frequency antigens)

- Detti anche: Ag ad “alta incidenza”, ad “alta prevalenza” , Ag “pubblici”
- Per essere definiti tali devono avere un’incidenza >90% , anche se perlopiù hanno una incidenza > 99%
- La mancanza di un antigene ad alta frequenza comporta l’espressione di un fenotipo raro
- Il siero contenente anticorpi verso Ag ad elevata frequenza mostra panreattività con i pannelli eritrocitari del commercio, reazione negativa contro eritrociti autologhi (a meno di recenti trasfusioni)

**Table 6. Some antibodies to high-frequency antigens to consider**

Room temperature reactivity	Hemolysis seen	Decreased reactivity in enzyme	African American patient	Caucasian patient	Asian, Hispanic, Native American patient
Anti-H	Anti-Vel	Anti-Ch	Anti-U	Anti-Kp <sup>b</sup>	Anti-Di <sup>b</sup>
Anti-I	Anti-PP <sub>1</sub> P <sup>k</sup>	Anti-Rg	Anti-Js <sup>b</sup>	Anti-Yt <sup>a</sup>	
Anti-PP <sub>1</sub> P <sup>k</sup>	Anti-P	Anti-In <sup>b</sup>	Anti-Jo <sup>a</sup>		
Anti-Vel	Anti-Jk3	Anti-JMH	Anti-Hy		
Anti-Sd <sup>a</sup>	Anti-H	Anti-En <sup>a</sup> TS	Anti-Cr <sup>a</sup>		
Anti-P	Anti-I	Anti-En <sup>a</sup> FS	Anti-Tc <sup>a</sup>		
			Anti-At <sup>a</sup>		

S.T. NANCE AND PA. ARNDT

# Antigeni ad elevata frequenza (HFA: high frequency antigens)



Necessari, per la conferma della diagnosi, eritrociti test privi dell'antigene ad elevata frequenza  
(laboratori di riferimento)



# Identificazione anticorpale: impiego di procedure aggiuntive

- Anticorpi **anti-Ch/Rg**: possono essere neutralizzati con l'incubazione con pool di plasma ABO compatibili
- Anticorpi **anti-HLA**: possono essere adsorbiti usando un pool ampio di piastrine random
- Anticorpi **anti-Le, -P1, -M**: possono essere meglio identificati con la riduzione della T di incubazione (4°C)
- Anticorpi **anti-IH**: possono essere dimostrati cimentando il siero in parallelo con eritrociti del fenotipo del paziente, di fenotipo O di adulto e O cordonali
- Interferenza da **anticorpi freddi**: pre-incubazione dei reagenti e del campione a 37°C

# Anti-IH

The image shows a large grid table, likely a data collection sheet for a study. The table is mostly obscured by a large watermark logo on the left and the text 'SIMTI PRO' in the center. The watermark logo consists of a stylized circular emblem with internal patterns. The text 'SIMTI PRO' is written in large, outlined letters. The table itself has multiple columns and rows, with some text visible in the right-hand side, including 'ASL' and 'CASA AL'. The table is framed by a red border.

# TAD e controllo autologo

- **Non sono test sovrapponibili**
- Il controllo autologo può associarsi a:
  - alloimmunizzazione, se il paziente è stato recentemente trasfuso
  - autoimmunizzazione
  - interferenza verso un componente di un mezzo di reazione (es. mezzo potenziante)
- Il controllo autologo può consentire di evidenziare la presenza di anticorpi liberi nel siero (rapporto siero/emazie, tempo di incubazione)

# Immunizzazione complessa: panagglutinazione

## Controllo con emazie autologhe

**Negativo**

Ac multipli?

Ac verso Ag ad elevata frequenza?

**Positivo**

AutoAc?

AutoAc + alloAc?

(pz trasfuso?)

**Interferenza?** (BLISS, antibiotici e sostanze conservanti)

# Immunizzazione complessa: Autoimmunizzazione eritrocitaria

L' autoanticorpo reagisce con tutte le cellule normali

L' autoanticorpo può mascherare la presenza di alloanticorpi



**Procedure speciali**

# Autoimmunizzazione eritrocitaria: identificazione di alloanticorpi

- **Tecniche:**
  - Diluizione (titolazione) del siero
  - Tecniche “*prewarmed*”
  - Adsorbimento del siero (a caldo, a freddo)
  - Uso di reagenti tiolici (Mercaptoetanolo, DDT)



# Alloimmunizzazione complessa: autoAc IgM panagglutinanti + alloAc anti-Jk<sup>a</sup>

VIAL	Donor No	Rh	Rh-hr						Kell				Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS					Luth.	Coit.	Xg	SPECIAL TYPE	RESULTS		
			D	C	E	c	e	C <sup>a</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Js <sup>a</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Co <sup>a</sup>	Xg <sup>a</sup>					
1	2007897	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	+	+	0	nt	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0		1	#	#	+
2	2008106	Ccdee r'r	0	+	0	+	+	0	0	+	0	nt	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+		2	#	#	-	
3	2007899	ccDee Rar	+	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+		3	#	#	-	
4	2008107	ccddEe r''r	0	0	+	+	+	0	0	+	0	nt	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+		4	#	#	-	
5	2008004	ccDEE R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	0	+	0	nt	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	Bg(a+)	5	#	#	+	
6	2007076	C <sup>a</sup> CDee R <sub>1</sub> <sup>a</sup> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	0	+	0	nt	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+		6	#	#	+	
7	2007120	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0		7	#	#	-	
8	2008005	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+		8	#	#	-	
9	2008108	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+		9	#	#	+	
10	2007577	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0		10	#	#	+	
11	2008006	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	0	+	0	nt	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0		11	#	#	-	
EXTEND	12	2007938	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	nt	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	AUT.	12	#	#	-
	13	2007939	ccDEE R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	0	+	0	nt	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0		13			
	14	2007695	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	0	+	0	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+		14			
	15	2008109	ccddee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0		15			

# Procedure di adsorbimento del siero

È possibile procedere alla rimozione di un anticorpo dal siero adsorbendo il siero con eritrociti che esprimono il corrispondente antigene



Scelta delle emazie da impiegare per adsorbimento:

- **Autologhe**, per rimuovere gli autoanticorpi
- **Omologhe**, con espressione dell'Ag verso cui è rivolto l'anticorpo, che si desidera allontanare, espresso in omozigosi

# Identificazione delle specificità anticorpali con procedure di adsorbimento



Può essere necessario, in caso di anticorpi con forte score di reazione, **ripetere l'adsorbimento 2-3 volte**



L'uso di **emazie pre-trattate con enzimi proteolitici** può ridurre il numero di adsorbimenti necessari (tener conto degli Ag distrutti dal trattamento enzimatico)



**Non sempre è possibile la rimozione completa** dell'anticorpo dal siero adsorbito

# Identificazione della classe immunoglobulinica dell'anticorpo

Trattamento del siero con reagenti tiolici (DTT, 2-ME)



rottura dei ponti disolfuro delle IgM



scomparsa dell'agglutinazione

Table 4.3-1. Effect of Dithiothreitol on Blood Group Antibodies

Test Sample	Dilution					Interpretation
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Serum + DTT	3+	2+	2+	1+	0	IgG
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	
Serum + DTT	0	0	0	0	0	IgM
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	
Serum + DTT	2+	1+	0	0	0	IgG+IgM*
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	

# Tipizzazione eritrocitaria

- **In sierologia, mediante agglutinazione:** vengono utilizzati antisieri policlonali o monoclonali su diversi supporti



- **In biologia molecolare (eritrogenomica):** utilizzata nei pazienti con TAD positivo o con trasfusioni recenti, mediante l'uso di kit del commercio (PCR-SSP, microarray, Luminex)



# Development of multiplexed flow cytometry-based red blood cell antibody screen and identification assays

Robert Liwski<sup>1,2</sup> | Anna Greenshields<sup>1,2</sup> | Ian Grace<sup>2</sup> | Calvino Cheng<sup>1,2</sup> | Jason George Quinn<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada

<sup>2</sup>Nova Scotia Health Authority, Central Zone, Halifax, Nova Scotia, Canada

**Correspondence**  
Jason George Quinn, 5788 University Avenue, Room 217 Halifax, Nova Scotia, B3H 1V8, Canada.  
Email: [jason.quinn@nshealth.ca](mailto:jason.quinn@nshealth.ca)

**Funding information**  
The authors received no specific funding for this work.

## Abstract

**Background and Objectives:** The purpose of this study was to develop a high-throughput method of performing red blood cell antibody screens and identification by utilizing flow cytometry and intracellular dyes to allow a multiplexed assay where three-cell screens can be performed in a single test well and 11-cell panels in three test wells.

**Materials and Methods:** Reagent red blood cells were labelled using Violet Proliferation Dye 450 (V450) and Oregon Green fluorescent dyes, which bind intracellular proteins to allow up to four cells to be interrogated in a single test well. Sixteen 3-cell screen panels and ten 11-cell identification panels were tested using sera with known antibody specificity. Antibody binding was detected using

Vox Sanguinis. 2024;119:344–352.

**TABLE 1** Red blood cell screen cell antigen expression.

Screen cell	D	C	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	M	N	S	s
1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+
2	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0
3	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+

Note: + denotes positive expression of antigen in column. 0 denotes negative expression of antigen in column.

**TABLE 2** Results of red blood cell antibody screen testing.

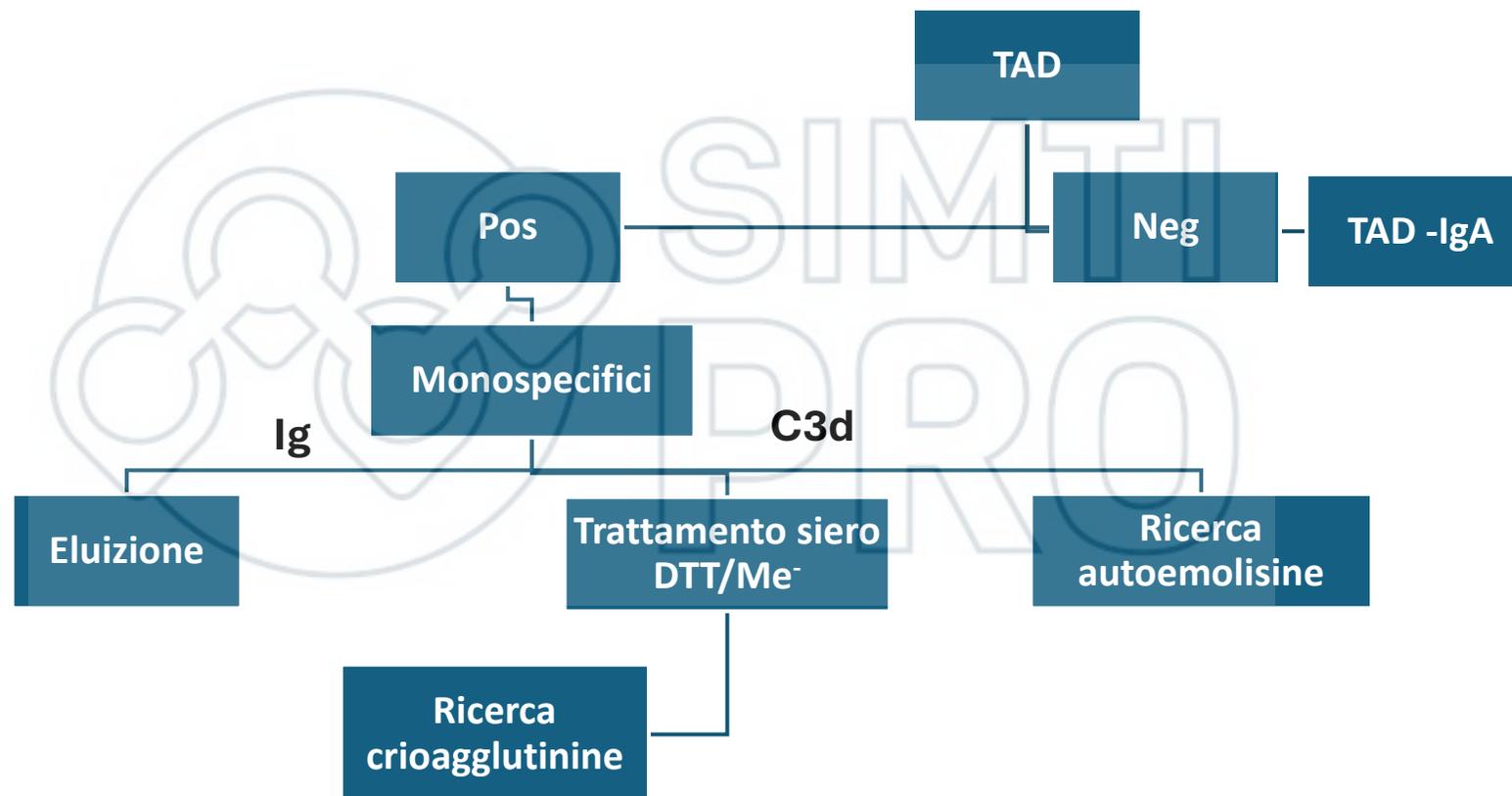
Antibody specificity	Cell 1 anti-IgG MFI	Cell 2 anti-IgG MFI	Cell 3 anti-IgG MFI	Cell 1 anti-IgM MFI	Cell 2 anti-IgM MFI	Cell 3 anti-IgM MFI
D	5197	13,671	-65	-2.8	-7	-216
E	-2.2	574	-50	-17	-22	-97
E	-3.2	649	-58	-7.8	-27	-82
E	-5.2	507	-45	-8.8	-15	-75
c	-7.2	2892	6097	-9.8	-31	-46
c	2.8	348	1126	-7.8	-36	-141
C	-27	-26	-53	3813	-26	-141
K	-8	4350	-0.25	-5.8	-27	-118
K	-11	4318	-57	-9.8	-23	-120
K and Fy <sup>a</sup>	-18	6038	3846	-5.8	-26	-196
Jk <sup>a</sup>	-12	1765	3681	-4.8	-11	33
Fy <sup>a</sup>	-12	1901	4118	-6.8	-22	-193
Fy <sup>b</sup>	4122	3527	85	-1.8	-25	-128
Fy <sup>b</sup>	3827	3371	71	12.2	-18	-82
s	60,278	-42	3091	-12.8	-28	-139
M	0.8	182	154	-4.8	1359	804

Note: Antibody specificity is the known specificity of the antibody contained in the 16 test sera. Results are expressed in MFI relative to negative controls and values graded as positive are coloured in red. Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; MFI, median fluorescence intensity.

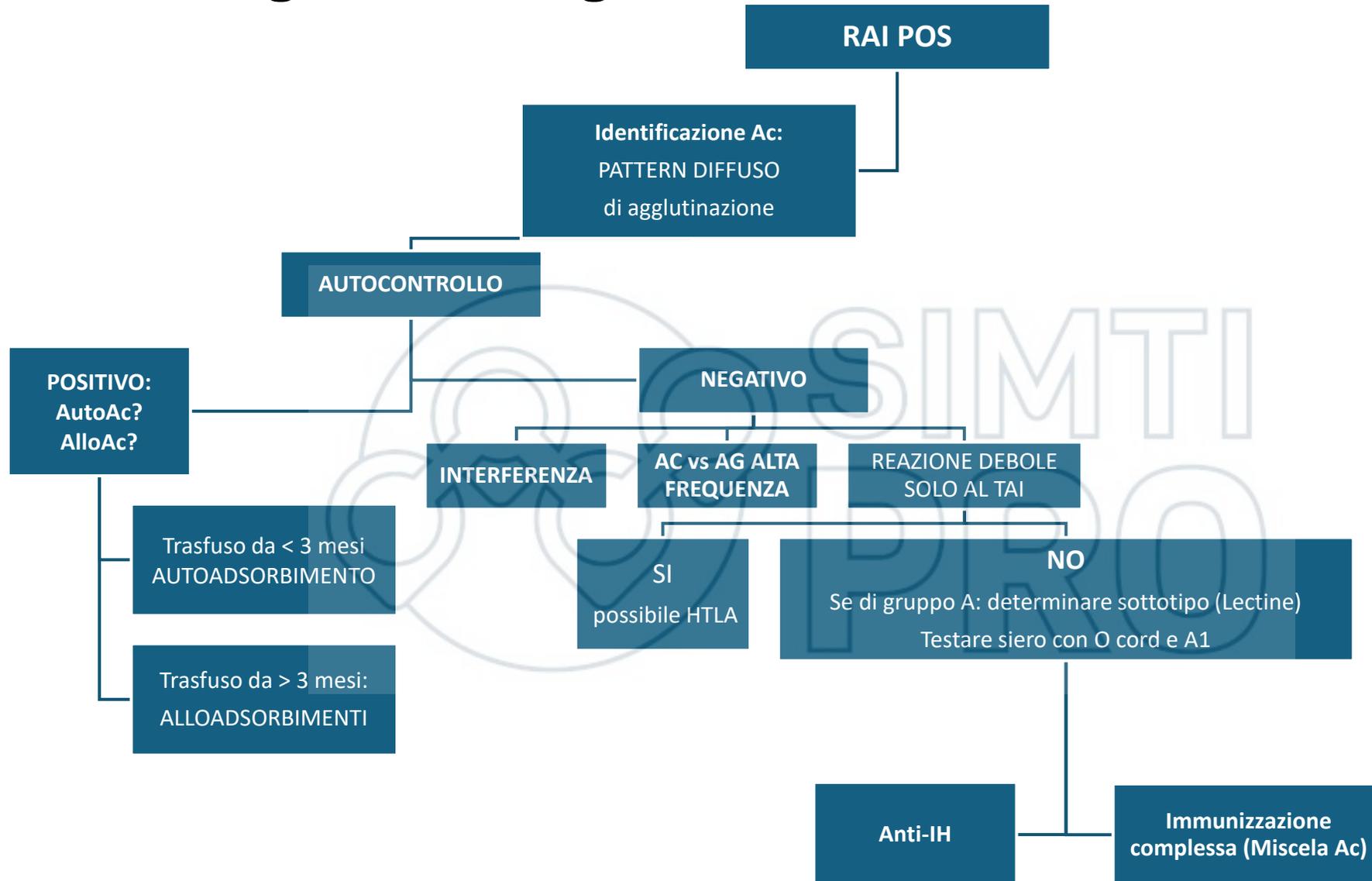
## Highlights

- Intracellular staining was used to create multiplexed flow cytometry-based antibody screen and identification panel assays.
- The antibody screen and identification panels achieved 100% concordance with expected results.
- Flow cytometry-based screens and identification panels could be utilized clinically as antibody detection methods.

# Algoritmo diagnostico in relazione all'esito del TAD



# RAI positiva: algoritmo diagnostico



# Diagnosi immunoematologica

A supporto dei test effettuati in laboratorio è inoltre fondamentale ottenere le informazioni necessarie per conoscere le **caratteristiche dei pazienti**:

- sesso
- età
- storia ostetrica
- anamnesi trasfusionale

e valutare la **probabilità di precedenti sensibilizzazioni**

Raccogliere informazioni circa eventuali recenti episodi infettivi, vaccinazioni, impiego di farmaci....

...e alla fine rivalutare le conclusioni alla luce delle informazioni e prove disponibili.

# Conclusioni

- Nei casi di immunizzazione complessa è essenziale l'osservazione attenta degli "indizi" disponibili
- Soltanto raramente gli anticorpi non si comportano come previsto! Pertanto la conoscenza delle caratteristiche dei diversi anticorpi è la chiave per riconoscere gli indizi
- Le tecniche di biologia molecolare rappresentano ormai un insostituibile supporto nella diagnosi dei casi complessi
- La diagnosi immunoematologica quindi si può avvalere dell'applicazione di algoritmi, ma non può prescindere dal ragionamento deduttivo che parte dalle conoscenze specifiche
- L'"istinto" di un immunoematologo esperto rimane tuttavia un bene prezioso!