

Il significato della titolazione degli anticorpi in Medicina Trasfusionale: aggiornamento

PRESENTAZIONE CASI CLINICI

Gianluca Ubezio

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

Il sottoscritto, 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.



IL NOSTRO LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA

Nella dotazione del nostro Laboratorio di Immunoematologia “virtuale”, con la quale andiamo ad affrontare i casi clinici di seguito esposti, abbiamo a disposizione:

DETERMINAZIONE DI GRUPPO SANGUIGNO ABO E DEL FENOTIPO Rh/Kell

Una metodica automatica, rappresentata dalla schedina, che costituisce nel nostro laboratorio la metodica di base con la quale eseguiamo i test immunoematologici. Abbiamo a disposizione anche reagenti per lavorare in provetta.



IL NOSTRO LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA

Nella dotazione del nostro Laboratorio di Immunoematologia “virtuale”, con la quale andiamo ad affrontare i casi clinici di seguito esposti, abbiamo a disposizione:

DETERMINAZIONE DI FENOTIPO ERITROCITARIO ESTESO

Abbiamo a disposizione la metodica sierologica automatica in schedina. Inoltre abbiamo la possibilità di inviare campioni ad un laboratorio di riferimento, che si avvale di metodiche molecolari per la caratterizzazione dei principali sistemi gruppoematici.



IL NOSTRO LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA

Nella dotazione del nostro Laboratorio di Immunoematologia “virtuale”, con la quale andiamo ad affrontare i casi clinici di seguito esposti, abbiamo a disposizione:

TEST ALL'ANTIGLOBULINA INDIRETTO (RICERCA E IDENTIFICAZIONE ANTICORPALE)

E' a nostra disposizione una metodica sierologica automatica che utilizza siero di Coombs polispecifico (anti-IgG+C3d). Abbiamo a disposizione anche reagenti per lavorare in provetta.

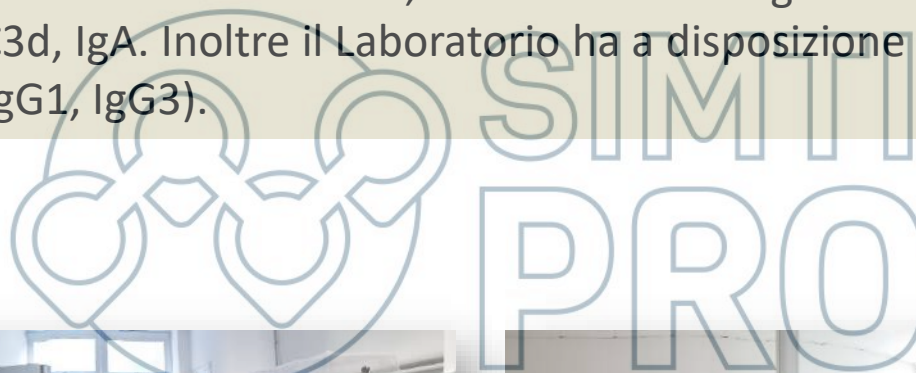


IL NOSTRO LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA

Nella dotazione del nostro Laboratorio di Immunoematologia “virtuale”, con la quale andiamo ad affrontare i casi clinici di seguito esposti, abbiamo a disposizione:

TEST ALL'ANTIGLOBULINA DIRETTO

Siamo provvisti di un test in schedina, con siero all'antiglobulina totale IgG+C3d e specifico per IgG, C3d, IgA. Inoltre il Laboratorio ha a disposizione antisieri selettivi per le sottoclassi IgG (IgG1, IgG3).



IL NOSTRO LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA

Nella dotazione del nostro Laboratorio di Immunoematologia “virtuale”, con la quale andiamo ad affrontare i casi clinici di seguito esposti, abbiamo a disposizione:

LABORATORIO IMMUNOEMATOLOGICO DI RIFERIMENTO (LIR)

Il Laboratorio ha avuto la possibilità di formalizzare una collaborazione stabile con un LIR, che gestisce casi non risolvibili dal nostro laboratorio. Il LIR si avvale di molteplici tecnologie sierologiche e molecolari, nonché di reagenti rari, per la risoluzione di casi complessi.





CASO CLINICO 1

SIMTI PRO

M.V. donna di 53 anni, caucasica, con diagnosi di AML in Agosto 2022, presso altra struttura.

Non risultano, prima della diagnosi della malattia oncoematologica, 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, che permette la remissione di malattia. Stante l'alto rischio di recidiva definito a livello molecolare (NPM1 mutato, FLT3 mutato), 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 nostro 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).

Tutte le affermazioni sono in linea teorica corrette, ma c'è una risposta che contempla un aspetto imprescindibile, quando si prende in carico un paziente da avviare ad un percorso trapiantologico:

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. Non è refertabile, ma la tipizzazione del sistema Kell non evidenzia dubbi e può essere refertata senza problemi.
2. 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.
3. Non possiamo escludere la presenza di una mutazione del gene RHCE, responsabile dell'espressione di un antigene c mutato.
4. E' opportuno candidare il campione di sangue della paziente ad una determinazione molecolare urgente.

1. Fenotipo Rh non determinabile, ma fenotipo Kell refertabile

In caso di recente trasfusione, non è appropriato considerare valido né la determinazione sierologica dubbia né quella apparentemente senza interferenza.

2. 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.*

3. 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).

4. Gruppo sanguigno in biologia molecolare

Non ritenuto necessario nell'immediato.

Il nostro laboratorio non è al momento provvisto di una procedura di Programma Trapianto per la gestione immunoematologica del trapianto di CSE, e sono attualmente in corso di definizione le istruzioni operative attinenti ai test immunoematologici.

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.

Ritenete che l'ematologo debba richiedere test immunoematologici, sui potenziali donatori? Se sì, quali?

1. In linea di principio no, a meno di specifiche problematiche immunoematologiche del paziente in attesa di trapianto,
2. Sì, almeno in gruppo sanguigno completo, auspicabilmente con fenotipo Rh/Kell,
3. Sì, deve essere richiesto gruppo sanguigno completo con fenotipo Rh/Kell, IAT,
4. Sì, deve essere richiesto gruppo sanguigno completo con fenotipo esteso (Fy, Jk, MNS ecc) e IAT.

1. Esami immunoematologici sul donatore non necessari

Se in linea di principio gli esami immunoematologici a carico dei potenziali donatori non danno indicazioni assolute di esclusione per adire alla donazione, questa non è l'opzione più corretta.

2. Gruppo sanguigno completo con fenotipo Rh/Kell

Importante, ma non sufficiente.

3. Gruppo sanguigno completo con fenotipo Rh/Kell e IAT

→ *E' l'opzione più importante, perché dal test di Coombs indiretto possono derivare indicazioni utili alla selezione della sorgente del graft di CSE ed alla eventuale necessità di manipolazione semplice del graft stesso (incompatibilità minore).*

4. Fenotipo esteso e IAT

Il livello attuale di evidenze non porta a ritenere che una tipizzazione eritrocitaria estesa del donatore possa rappresentare un vantaggio nella gestione delle fasi successive del trapianto di CSE.

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

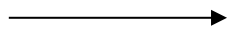
4	0	0	4	0	4	0	0	0
C	c	E	e	K	k	cell 1	cell 2	cell 3

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	0	+	+	+	+	+	0	0	+	----	1
2	R1R1	100290	+	+	0	0	+	0	/	+	+	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	+	+	+	0	0	+	++/--	3	
4	Ror	100292	+	0	0	+	+	+	0	/	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	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 inoltre condizionare alcuni aspetti peri-trapiantologici.

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.*

Torniamo un attimo indietro:

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 isoagglutininico 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 FAB M3 in Marzo 2022. L'esordio della malattia è stato caratterizzato da un importante quadro clinico emorragico che, nonostante la tempestiva diagnosi e terapia, è stato complicato da emorragia cerebrale (blasti in PB al momento della diagnosi 33'000/ μ L).

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:

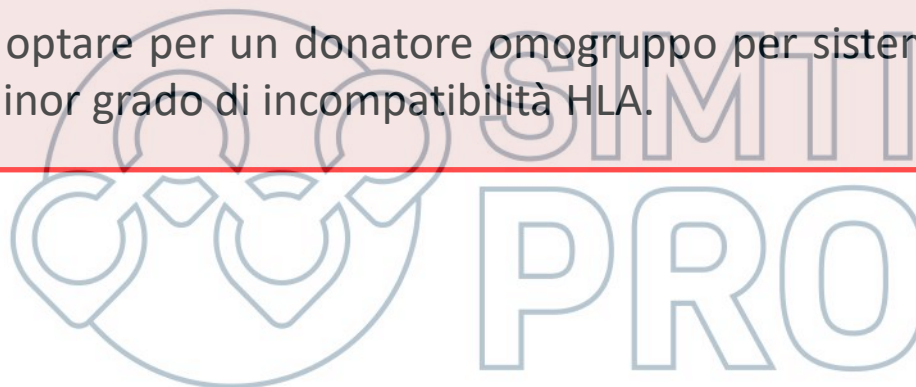
Anti-A	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
IgM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+++	++
IgG	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-

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 positiva 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.



CASO CLINICO 3

SIMTI
PRO

M.B. donna di 27 anni, caucasica, con diagnosi di AML a Novembre 2023.
 A Febbraio 2024 viene effettuato un trapianto allogenico da donatore non consanguineo.
 Si procede alla effettuazione dei test immunoematologici di base, della paziente:

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

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

ABO **O**, RhD **NEG**

Fenotipo Rh/Kell **ccdee, kk**

O	4	O	4	O	4
C	c	E	e	K	k

IAT **NEG**

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

O	O	O
cell 1	cell 2	cell 3

Il Centro Donatori, dopo richiesta da parte dei Colleghi Ematologi, trasmette le informazioni immunoematologiche di base del donatore adulto non apparentato, in vista della donazione di CSE periferiche:

ABO A, RhD POS

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

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

Anti-A
IgM 1:8 IgG 1:8



Ritenendo la titolazione di isoagglutinine anti-A poco rilevante, si procede alla pianificazione del trapianto senza prevedere scambio plasmatico terapeutico

Condividete?

1. sì,
2. no



- ➔ 1. sì
- 2. no

Il donatore, inizialmente disponibile alla donazione, ritira il proprio consenso alla donazione, a due giorni dall'inizio della chemioterapia ad alte dosi del paziente. Il Centro Trapianti opta immediatamente per un secondo donatore *unrelated*, di pari compatibilità HLA, ma di età maggiore rispetto al primo. La riprogrammazione della terapia mieloablattiva subisce un ritardo di 20 giorni. Nel frattempo si chiede il dettaglio immunematologico del secondo donatore, senza condividere l'informazione con la Struttura Trasfusionale:

ABO AB, RhD POS

Il giorno prima del trapianto, viene ripetuta la titolazione delle isoagglutinine anti-AB:

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

Anti-A
IgM 1:8 IgG 1:2

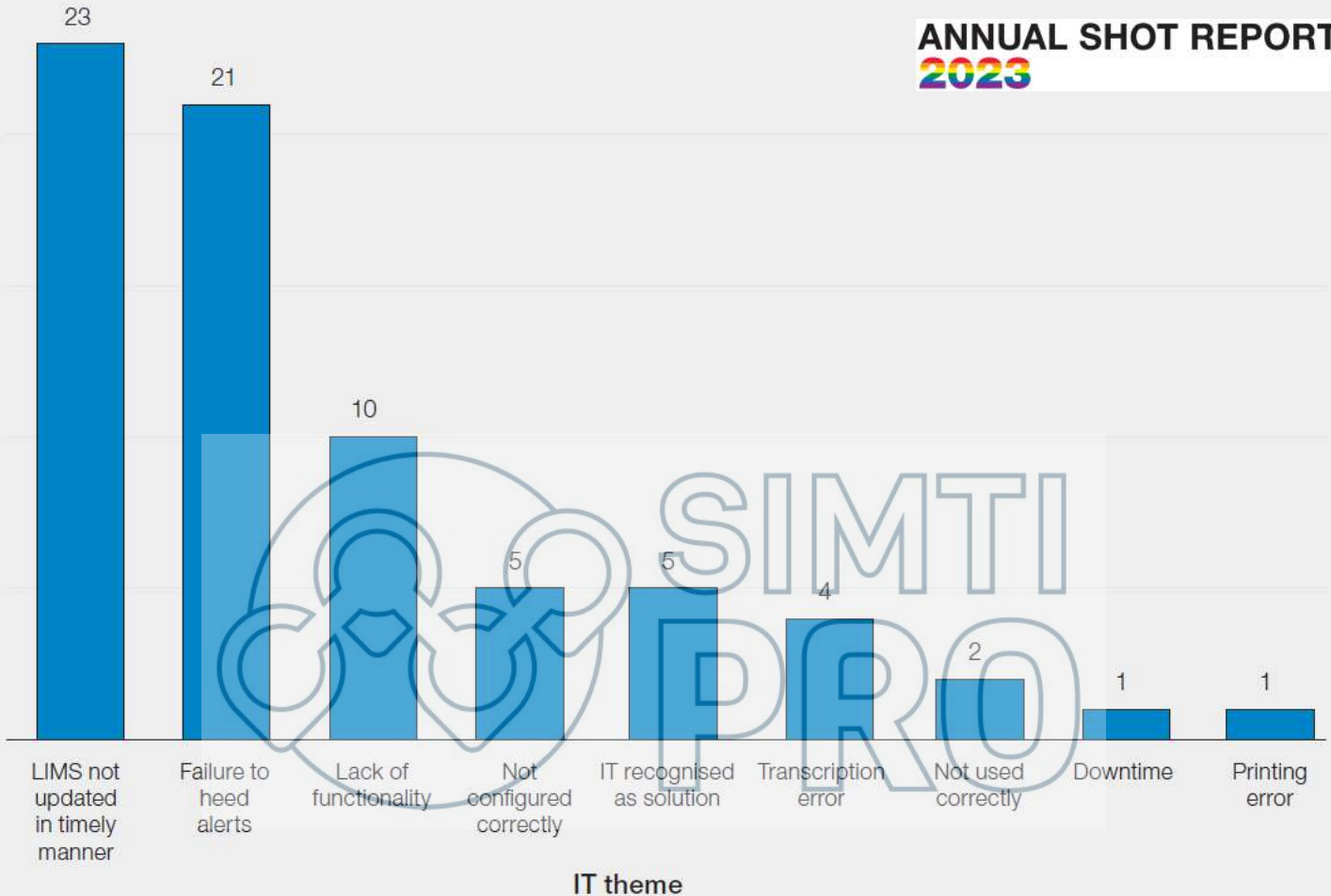
Anti-B	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
IgM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+++-	----
IgG	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+---

Anti-B
IgM 1:256 IgG 1:512

Commenti?

...

ANNUAL SHOT REPORT 2023



Nelle settimane successive, la paziente ha un buon decorso clinico, con la necessità di una unità di emazie ogni settimana e una sola unità di piastrine nel primo mese dal trapianto.

Il monitoraggio immunoematologico è rappresentato dai test pre-trasfusionali:

I week	0	0	0
	anti-A	anti-B	anti-D
II week	0	0	0
	anti-A	anti-B	anti-D
III week	1	1	0
	anti-A	anti-B	anti-D
IV week	2	1	0
	anti-A	anti-B	anti-D

A 30 giorni dal trapianto, si assiste ad un aumento importante dei fabbisogni trasfusionali (3-4 unità di emazie a settimana).

Si esclude un sanguinamento attivo:

Ipotesi?

1. Sindrome del linfocita passeggero,
2. PRCA,
3. Poor Graft Function,
4. Trasfusione incompatibile
5. Altro



1. **Sindrome del linfocita passeggero,**

Il trapianto si configura per essere AB RhD POS ---> O RhD NEG. La s. da l. p. si prefigura nel caso di incompatibilità minore e non maggiore, come nel caso presentato.

2. **PRCA**

→ Condizione che si può presentare in caso di incompatibilità maggiore, qual è la condizione presentata. Un elemento importante, come fattore di rischio, è rappresentato dal titolo isoagglutinico pre-trapianto e evidenziabile anche nella fase successiva al trapianto.

3. **Poor Graft Function**

Possibile, ma poco probabile: nelle fasi successive al trapianto, il prelievo midollare di controllo non evidenzia un blocco dei precursori eritrocitari. Inoltre si consideri che la trasfusione-dipendenza si evidenzia solo per la quota eritrocitaria.

Trasfusione incompatibile

Le indagini di verifica sulle trasfusioni pregresse non hanno indotto a sostenere questa ipotesi.

Altro

...ipotesi

Quali test effettuare?

1. TCI,
2. TCD,
3. Indici di emolisi,
4. Titolazione anti-AB



1. TCI,

Corretto, anche per evidenziare eventuali anticorpi non evidenziati in precedenza. Si chiede di considerare due elementi: il rischio di anticorpi non evidenziati in precedenza, in caso di infusione di CSE incompatibili o trasfusione incompatibile pone il rischio di una quota dell'anticorpo adeso alle emazie e una riduzione del titolo (esiti falsi negativi). Inoltre, il TCI non evidenzia eventuali anticorpi anti-LFA (ruolo del cross-match paziente-ricevente)

2. TCD

E' probabilmente il test più importante nella condizione clinica descritta

3. Indici di emolisi

Corretto, in particolare se si ipotizza una quota di emolisi intra-vascolare

Titolazione anti-AB

Sicuramente utile, considerando però il rischio di sottostima, dovuto ad un parziale legame di agglutinine ad emazie derivate dalla emopoiesi del donatore.

In questo caso, è utile una conferma del gruppo sanguigno?

1. Sì,
2. No

1. Sì,

2. No

→ Necessità di correlare la determinazione di gruppo sanguigno post-trapianto di CSE con:

- Infusione del graft, che può avere una quota molto variabile di componente eritrocitaria (vedi infusione di graft midollare),
- regime trasfusionale: la paziente risulta trasfusione-dipendente e la scelta del gruppo sanguigno delle unità è stata O NEG.





CASO CLINICO 4

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 procedere a deplasmazione del 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

Ritenete appropriato l'approccio dell'Ematologo, nel richiedere i test immunoematologici:

1. Sì, l'Ematologo che ha in cura il paziente sceglie quali siano gli esami appropriati,
2. Sì, perché i pazienti che fanno procedure importanti come il trapianto di CSE hanno un alto rischio di sviluppare anticorpi irregolari all'improvviso,
3. Dipende da paziente a paziente,
4. No.

1. Sì: sceglie l'Ematologo

No condivisibile, per l'importanza del ruolo di consulenza del laboratorio di immunoematologia nel definire una procedura immunoematologica condivisa.

2. Alto rischio di sviluppare alloanticorpi in corso di trapianto di CSE

Il rischio di sviluppo di alloanticorpi nel periodo peri-trapiantologico di CSE è piuttosto basso e non ci sono indicazioni di adottare cadenze di ripetizione degli esami immunoematologici specifici, differenti da quelli per i test pre-trasfusionali.

3. Dipende da paziente a paziente

La definizione di una procedura assume l'idea che sia possibile adottare uno schema standard di esami immunoematologici in caso di paziente sottoposto ad allotrapianto di CSE.

4. No

Lo IAT effettuato all'interno del T&S rende richieste aggiuntive sostanzialmente inappropriate. Il DAT, in assenza di segni di emolisi, ha il sostanziale significato di dare elementi interpretativi nel caso venga ripetuto nelle fasi successive all'avvenuto trapianto.

Importanza di condividere una procedura per IE peritrapianto di allotrapianto di CSE

Assimilazione dell'infusione di CSE alla infusione di un emocomponente (test pre-trasfusionali)

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.

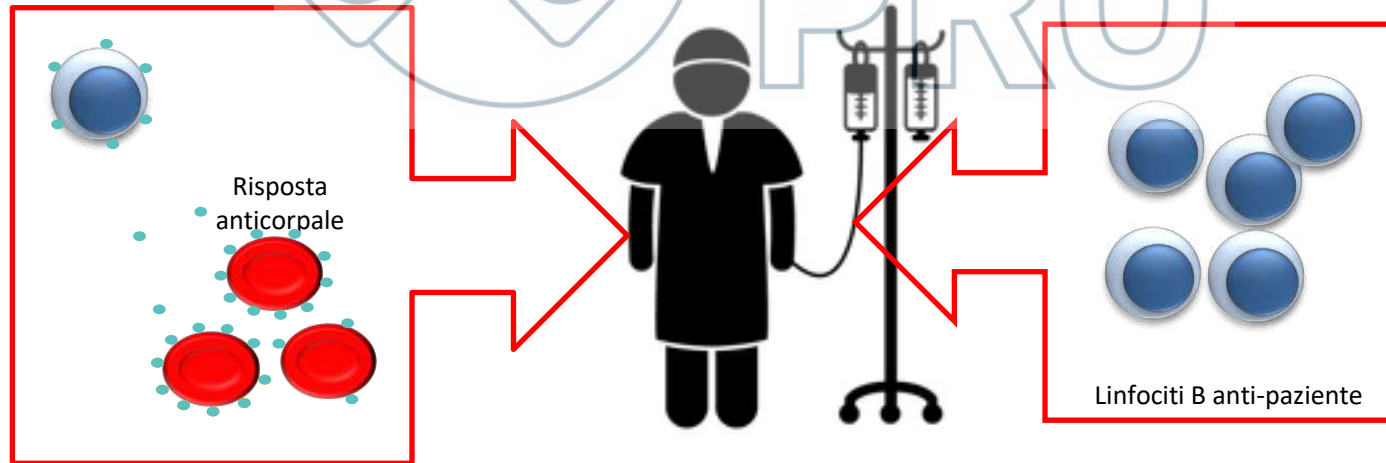
In linea teorica, stante la diversa composizione cellulare, il rischio maggiore di sviluppare la sindrome del linfocita passeggero è stimato essere conseguente all'utilizzo di CSE ottenute da sangue periferico.

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

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 isoagglutinica,
- esecuzione e monitoraggio della titolazione isoagglutinica 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.

GESTIONE DEL TRAPIANTO DI CSE ABO MISMATCH

Fase PRE-
trapianto

Preparazione del
paziente al
trapianto

PERI-trapianto

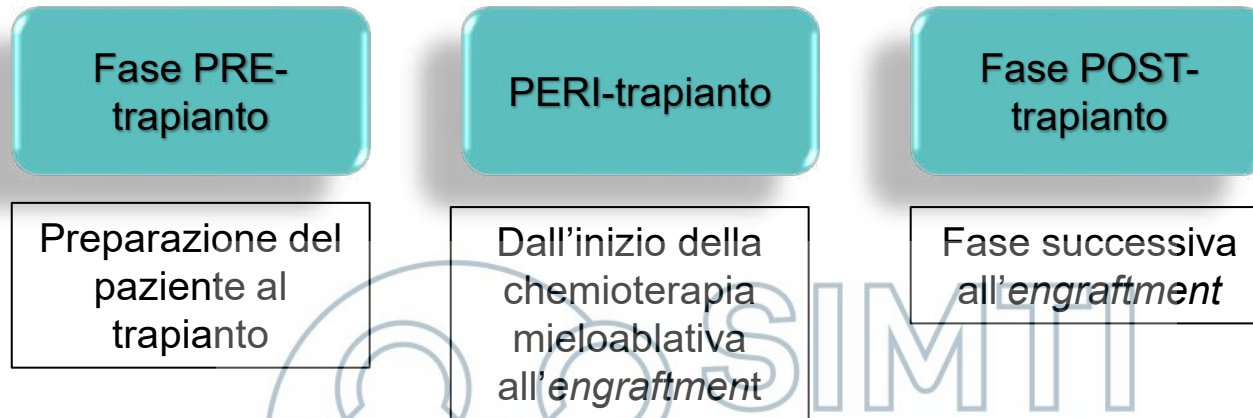
Dall'inizio della
chemioterapia
mieloablativa
all'*engraftment*

Fase POST-
trapianto

Fase successiva
all'*engraftment*

- 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.

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.

