



III Convegno Nazionale SITLaB
7 - 8 giugno 2025 - Chieti

SITLaB
Società Scientifica Italiana dei TSLB



La Biologia Molecolare nel laboratorio di Immunoematologia: esperienze a confronto.

Autori: Sartania E. C.¹, Tomei R.², Cozzolino G.³, Carini V.⁴, D'Amico F.⁵, Bellonzi S.⁶, Ramunno C.⁷, Merendino V.⁸.

¹A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino, ²A.O.U. Pisana, ³A.O. Pediatrico Santobono-Pausilipon di Napoli, ⁴ASL 2 Vasto Lanciano Chieti, ⁵P.O. Penne ASL Pescara, ⁶A.O.U. Sant'Anna Ferrara, ⁷IRCCS G. Pascale Napoli, ⁸A.O. Cannizzaro.

Introduzione

La tipizzazione degli antigeni eritrocitari si realizza attraverso il processo di emoagglutinazione, una reazione immunologica in cui gli anticorpi specifici determinano l'aggregazione con gli antigeni di membrana eritrocitari formando così un immunocomplesso antigene-anticorpo.

Vantaggi: Uso di differenti tecnologie (vetrino, provetta, micropiastre, microcolonna in gel o in biglie di vetro) che richiedono una minima attrezzatura, consentono risultati in tempo reale e sono applicabili anche in situazioni logistiche disagiate; permettono di identificare la presenza di popolazioni eritrocitarie miste con alta sensibilità e specificità, appropriate alla maggior parte delle trasfusioni; automatizzate e interfacciate con i sistemi gestionali informatici dei Servizi Trasfusionali con standardizzazione del processo, alta sensibilità diagnostica ed elevata produttività.

Svantaggi: Non possono essere utilizzate con risultati attendibili in pazienti recentemente trasfusi, con test all'antiglobulina diretto (TAD) positivo, in pazienti in terapia farmacologica con anticorpi monoclonali verso antigeni presenti sui globuli rossi (ad es. terapia con Daratumumab). Inoltre, per molti sistemi antigenici (ad es., Dombrock, Colton, antigeni a bassa incidenza) gli antisieri non sono disponibili in commercio o sono di difficile reperimento, non standardizzati e di costo elevato. Questi limiti possono essere superati attraverso la **tipizzazione molecolare**, che presenta un ampio campo di azione sia nei donatori che nei pazienti.

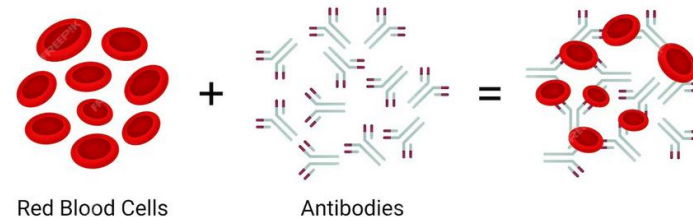


Fig. 1 Emoagglutinazione [https://www.freepik.es]

Obiettivo

Valutare e confrontare le metodiche di tipizzazione eritrocitaria basate sulla **biologia molecolare**, osservando vantaggi, limiti e applicazioni pratiche in vari contesti territoriali e clinici, finalizzati alla gestione di donatori e pazienti in regime trasfusionale.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati i protocolli di tipizzazione eritrocitaria adottati presso tre strutture regionali:

- **Toscana:** in uso protocolli PCR-SSP per tipizzare gli eritrociti, includendo sistemi come ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Dombrock, con tecnici dedicati e sistemi automatizzati. La tipizzazione fenotipica estesa è aumentata, soprattutto per pazienti trattati con anticorpi monoclonali anti-CD38 nel mieloma multiplo..
- **Piemonte:** applicazione del test ID CORE XT™ con sonde allele-specifiche e microbiglie fluorescenti, per analisi di 29 polimorfismi di 8 sistemi di gruppi sanguigni, mediante estrazione automatizzata di DNA e sistemi standardizzati.
- **Campania:** utilizzo della PCR-SSP per identificare alleli specifici di sistemi come ABO, Rh, Kell, con un pool di tecnici dedicati e sistemi automatizzati.



III Convegno Nazionale SITLaB 7 - 8 giugno 2025 - Chieti

SITLaB
Società Scientifica Italiana dei TSLB



Esperienze a confronto

TOSCANA

U.O. Medicina Trasfusionale e Biologia dei Trapianti dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana è dotata di un laboratorio di Immunoematologia di 1° e 2° livello e di un laboratorio di biologia molecolare riconosciuto come *Centro di Riferimento Regionale*, con un biologo referente e un team di 6 TSLB che si alternano nelle analisi molecolari.

La tecnica principale utilizzata è la PCR-SSP, che impiega primer specifici per identificare gli SNPs di interesse con lettura fluorescente end point. I kit consentono di distinguere gli alleli ABO (A1.01, A2.01, B.01, O.01, O.02), di identificare antigeni RhD in casi di sierologia ambigua, soprattutto in pazienti politrasfusi o con autoanticorpi, e di tipizzare i sistemi di gruppo sanguigno Kell, Kidd, Duffy, MNS e Dombrock. La metodica permette inoltre di rilevare gli alleli RhCE, gli SNPs associati, di caratterizzare varianti di RHD (deboli, nulli, parziali) e di identificare alleli rari di altri gruppi come Diego, Wright, Cartwright, Lutheran, Colton, Knops e Landsteiner-Wiener.

Il laboratorio processa tutti i campioni dei Servizi Trasfusionali della Regione che necessitano di un approfondimento diagnostico per la genotipizzazione del gruppo sanguigno, del fenotipo esteso (soprattutto nei pazienti trattati con anticorpi monoclonali anti-CD38) e per la determinazione delle varianti alleliche RHD/CE

PIEMONTE

S.C. Banca del Sangue e Immunoematologia dell'A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino, è il SIMT Hub di riferimento per Area Omogenea e Area Metropolitana di Torino. Situada presso il P.O. Molinette, impiega 76 professionisti, tra cui 25 TSLB, fornisce supporto trasfusionale al presidio e ad altre strutture regionali.

Per la tipizzazione estesa in biologia molecolare, si utilizzano campioni di sangue trattati con EDTA, ACD o eparina, freschi o congelati, estratti tramite il kit EZ DSP DNA Blood, che permette di ottenere DNA di alta qualità con tecnologia magnetica, in modo rapido e standardizzato. La tipizzazione avviene con il test ID CORE XT™, basato su PCR e sonde allele-specifiche collegate a microbiglie colorate, che analizzano 29 polimorfismi di 8 sistemi di gruppi sanguigni e 38 polimorfismi di 11 sistemi, come Rh, Kell e JK.

La metodica è principalmente rivolta a donatori rari e pazienti con esigenze particolari, è rapida, affidabile e automatizzata, consentendo un'identificazione precisa e una caratterizzazione approfondita in presenza di anticorpi irregolari o trattamenti che complicano le analisi sierologiche.

CAMPANIA

U.O.S.D. di Medicina Trasfusionale e Basco-HLA dell'Azienda Ospedaliero Pediatrico Santobono-Pausilipon di Napoli, dispongono di laboratori di Immunoematologia di I° e II° livello e di biologia molecolare, e un Centro Pediatrico di Riferimento Regionale per Trapianti di Midollo e Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE). La struttura è guidata da un biologo e due Dirigenti Biologi, con 6 TSLB che si alternano nell'allestimento delle sedute di criopreservazione e analisi molecolare.

La tecnica molecolare impiegata è PCR-SSP, con uso di primer specifici per identificare SNPs di interesse e lettura end point fluorescente. I kit permettono di distinguere con chiarezza gli alleli ABO, identificare gruppi sanguigni RhD complessi, e tipizzare sistemi come Kell, Kidd, Duffy, MNS e Dombrock. Inoltre, consentono di analizzare gli alleli RhCE, RHD (inclusi alleli nulli e D deboli), e di rilevare alleli D deboli e DEL RHD.

I test sono fondamentali per i pazienti pediatrici in attesa di trapianto di midollo o CSE, per risolvere eventuali discrepanze di gruppo sanguigno post-trapianto, o per tipizzazioni genetiche estese di donatori eterologhi.



III Convegno Nazionale SITLaB 7 - 8 giugno 2025 - Chieti

SITLaB
Società Scientifica Italiana dei TSLB



Risultati

Le metodiche di genotipizzazione e fenotipizzazione molecolare si distinguono per alta precisione e sensibilità, permettendo di determinare profili genetici e fenotipici anche in presenza di discrepanze sierologiche, come nei pazienti politrasfusi o immunizzati complessivamente. Queste tecniche sono in grado di identificare varianti genetiche rare e alleli difficilmente rilevabili con metodi sierologici tradizionali, risultando fondamentali in casi complessi come le alloimmunizzazioni piastriniche o nella ricerca di donatori con fenotipi rari. Sono inoltre utili per gestire pazienti trattati con anticorpi monoclonali, come anti-CD38, che possono interferire con i test sierologici. Tuttavia, l'implementazione comporta costi elevati per attrezzature e reagenti, limitandone l'adozione in centri meno dotati. La standardizzazione e l'automazione migliorano ripetibilità e tracciabilità, favorendo l'integrazione clinica di queste metodiche e garantendo maggiore sicurezza nelle procedure trasfusionali e immunoematologiche.

Bibliografia

- Standard per i Laboratori di immunoematologia di Riferimento (LIR) e di Biologia Molecolare (BM). Ed. 2021
- User Guide NanoDrop Lite
- FluoVista Guida Rapida Pratica
- Manuale del kit EZ1 DSP DNA blood. 02/2021
- Raccomandazioni per l'impiego delle metodiche molecolari in immunoematologia Ed. 2018

Conclusioni

Per una corretta implementazione delle metodiche molecolari in immunoematologia, è fondamentale raggiungere almeno 500 tipizzazioni molecolari/anno complessive in pazienti e/o donatori, come definito dagli Standard per i Laboratori di immunoematologia di Riferimento (LIR) e di Biologia Molecolare (BM), questo, unitamente ad altri requisiti, consente di garantire qualità del servizio e sostenibilità economica. Attualmente, molte strutture non raggiungono questa soglia, rendendo ancora indispensabile l'uso complementare della sierologia tradizionale.

Tuttavia, con il crescente livello di formazione dei **Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico** e l'avanzamento delle tecnologie, si prospetta un aumento progressivo delle attività molecolari, con benefici significativi in termini di sicurezza e personalizzazione delle terapie trasfusionali. La strategia ottimale rimane quindi un approccio integrato, che coniughi le potenzialità della biologia molecolare con l'affidabilità della sierologia tradizionale. Il confronto tra le tre realtà ci permette di osservare che l'utilizzo della BM è prevalentemente «ritagliata» sulla mission e policy aziendale, pazienti adulti per A.O.U. Pisana., donatori per il P.O. Molinette di Torino, pazienti pediatrici per il Pausilipon di Napoli.

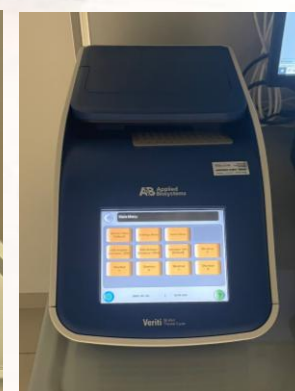
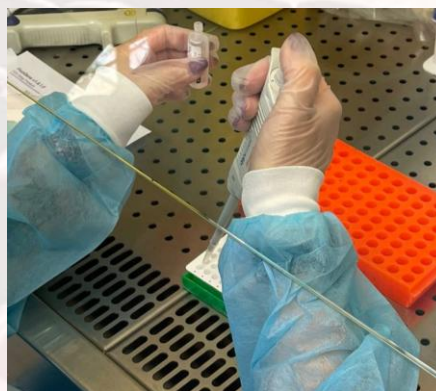


Foto 1, 2, 3.[Soluzione modulare per la tipizzazione molecolare RBC]