



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO**  
**SCUOLA DI MEDICINA**

Dipartimento di Scienze della Sanità Pubbliche e Pediatriche  
Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**INCIDENZA DELL'ALLOIMMUNIZZAZIONE  
ANTIERITROCITARIA NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A  
TERAPIA TRASFUSIONALE**

INCIDENCE OF ANTIERYTHROCYTE  
ALLOIMMUNIZATION IN PATIENTS UNDERGOING  
TRANSFUSION THERAPY

**RELATRICE**

*Dott.ssa Prucca Maristella*

**CORRELATRICE**

*Dott.ssa Tornello Antonella*

**CANDIDATA**

*Bonelli Cecilia*

Anno accademico 2018-2019

# INDICE

INDICE.....	2
INTRODUZIONE .....	4
CAPITOLO I, LA TERAPIA TRASFUSIONALE.....	6
1.1-RIFERIMENTI STORICI.....	6
1.2-ACCENNI DI TERAPIA TRASFUSIONALE ODIERNA .....	8
1.3-VALUTAZIONE DEL DONATORE E CRITERI DI DONAZIONE .....	9
1.4-QUALI SONO LE POSSIBILI DONAZIONI .....	11
1.5-IL FRAZIONAMENTO .....	14
1.6-VALIDAZIONE DEGLI EMOCOMPONENTI .....	16
1.7-PAZIENTI, INDICAZIONE ALLA TRASFUSIONE E VALORI SOGLIA .....	18
CAPITOLO II, IL SANGUE E LA SUA ORIGINE.....	21
2.1-IL SANGUE.....	21
2.2-L'EMOPOIESI.....	21
2.3-L'ERITROPOIESI O LINEA ROSSA .....	23
2.4-LE CELLULE DEL SANGUE: GLOBULI ROSSI, GLOBULI BIANCHI E PIASTRINE .....	24
2.5-I GRUPPI SANGUIGNI.....	26
2.6-IL SISTEMA Rh E I SISTEMI MINORI.....	29
CAPITOLO III, L'ALLOIMMUNIZZAZIONE ANTIERITROCITARIA .....	36
3.1-COS'È L'ALLOIMMUNIZZAZIONE ANTIERITROCITARIA .....	36
3.2-IL SISTEMA IMMUNITARIO E LE SUE COMPONENTI.....	46
3.3-GLI ANTICORPI.....	48

3.4-LA REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO.....	50
CAPITOLO IV, GESTIONE DELLE RICHIESTE TRASFUSIONALI .....	54
CAPITOLO V, MATERIALI E METODI.....	60
CAPITOLO VI, ANALISI.....	68
6.1-ANALISI SU GRUPPO TOTALE PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI.....	68
6.2-ANALISI SU GRUPPO PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI, ASSOCIATI A RICHIESTA TRASFUSIONALE.....	71
6.3-ANALISI SU GRUPPO PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI, ASSOCIATI A RICHIESTA TRASFUSIONALE E PRESENTANTI ANAMNESI TRASFUSIONALE PREGRESSA CERTA.....	73
CAPITOLO VII, CONCLUSIONI .....	76
7.1- FREQUENZA ALLOIMMUNIZZAZIONE.....	76
7.2- INCIDENZA ALLOIMMUNIZZAZIONE.....	79
7.3- PREGRESSA TERAPIA TRASFUSIONALE.....	82
7.4- OSCILLAZIONI DEL TITOLO ANTICORPALE.....	82
BIBLIOGRAFIA .....	85
RINGRAZIAMENTI.....	88

## INTRODUZIONE

Lo scopo del presente elaborato è lo studio dell'incidenza dell'alloimmunizzazione antieritrocitaria nei pazienti sottoposti a terapia trasfusionale. L'alloimmunizzazione antieritrocitaria, ovvero lo sviluppo di anticorpi antieritrocitari a seguito di stimolazione immunologica, rappresenta un'importante complicanza della terapia trasfusionale, che in alcuni casi può incidere fortemente sul proseguo del supporto terapeutico al paziente.

La terapia trasfusionale è considerata come un trattamento di elezione nel corso della gestione di patologie anemiche croniche, quali Anemia Falciforme, Talassemia o altre emoglobinopatie. In aggiunta a questa indicazione la terapia trasfusionale trova largo impiego nell'ambito clinico, nel trattamento di patologie acute, per cui la trasfusione di emocomponenti può essere salvavita, come nel corso di interventi chirurgici, traumi, emorragie ecc.

Le complicanze di tale terapia sono molteplici e comprendono:

- Reazioni acute immunologiche, quali: reazioni febbrili, allergiche, anafilattiche, emolitiche acute o edema polmonare acuto non cardiogeno (TRALI).
- Reazioni acute non immunologiche, quali: reazione da contaminazione batterica, emolisi non immunologica o reazione da sovraccarico del circolo.

Tali complicanze possono manifestarsi nell'immediato.

Possono insorgere reazioni tardive, con manifestazioni cliniche che si manifesteranno solo in un secondo momento e possono essere:

- Reazioni di natura non immunologica, quali: sovraccarico marziale o infezioni post-trasfusione.
- Reazioni di natura immunologica, quali: reazioni emolitiche ritardate, porpora post-trasfusione e l'alloimmunizzazione antieritrocitaria.

Lo sviluppo di anticorpi antieritrocitari rivolti verso antigeni espressi unicamente sulle emazie trasfuse è alla base dell'alloimmunizzazione e

presenta una correlazione fondamentale tra la diversità antigenica del donatore e del ricevente. Viene riconosciuta come un'importante complicanza poiché di seguito allo sviluppo e al riconoscimento di tali anticorpi definiti come "irregolari", ovvero non fisiologicamente presenti, il paziente dovrà essere trasfuso con emocomponenti non recanti l'antigene contro cui il sistema immunitario ha sviluppato tali anticorpi, con possibili importanti limitazioni delle risorse terapeutiche disponibili per il paziente stesso. Da qui ne deriva il ruolo del Centro Trasfusionale nell'ambito della corretta gestione della terapia trasfusionale, del corretto studio mirato alla identificazione dell'eventuale sviluppo di alloanticorpi e della reperibilità, talvolta non facile e immediata, di un emocomponente compatibile, in termini di assenza dell'antigene contro cui il sistema immunitario del soggetto ha sviluppato una risposta immunologica.

L'incidenza di tale complicanza risulta correlata a diversi fattori, i più importanti sono: l'immunogenicità dell'antigene gruppo ematico eritrocitario verso il quale si è sviluppata l'immunizzazione e lo stato immunologico del ricevente. Altro fattore predisponente è la frequenza della terapia trasfusionale: la frequenza di immunizzazione è tanto più grande quanto è maggiore la durata del supporto trasfusionale. In casi di terapia trasfusionale cronica non è inusuale poter riscontrare alloimmunizzazioni multiple, ovvero rivolte contro molteplici antigeni.

Il presente elaborato, valutando non solo l'incidenza dell'alloimmunizzazione, ma anche la sua frequenza, ha analizzato le variabili sopracitate coinvolte nella sua esplicazione, valutando retrospettivamente i dati relativi ai pazienti sottoposti a terapia trasfusionale afferenti ai Presidi Ospedalieri di Mondovì ASLCN1 e ASO Santa Croce e Carle, dal 2017 al 1° semestre 2019.

## **CAPITOLO I, LA TERAPIA TRASFUSIONALE**

### **1.1-RIFERIMENTI STORICI**

La storia della pratica della trasfusione di sangue è molto antica e per ritrovarne le origini è necessario fare un grande passo indietro nel tempo. Sono molteplici i significati che furono dati a questo liquido dal colore rosso, che scorre nel corpo e dona la vita.

Per iniziare si può considerare il fatto che nell'antichità gli uomini veneravano e consideravano il sangue come "una fonte di vita", a tal punto che alcune civiltà arrivarono a credere che nel sangue risiedessero poteri magici e per questo motivo, con il sangue, dipingevano i loro corpi. Si pensa inoltre che, insieme a erbe dotate di capacità curative e terapeutiche, alcuni medici usassero somministrare ai malati anche del sangue. Questa però non fu l'unica accezione legata al sangue, poiché nacque anche l'idea che questa matrice rossastra potesse contenere al suo interno umori negativi e spiriti maligni, in grado di causare gravi malattie.

E' nota l'antica terapia delle sanguisughe, durante la quale al malato venivano applicati in tutto il corpo questi animali, i quali, estraendo il sangue, si credeva potessero rimuovere anche i demoni responsabili del cattivo stato di salute.

Un'altra terapia simile, nata di seguito alla credenza che nel sangue risiedesse la malattia è la pratica del salasso. Un medico effettuava un taglio a livello di una vena e lasciava fuoriuscire fino ad un litro di sangue, aspettando che gli spiriti maligni abbandonassero il corpo del paziente. Esistono testimonianze di questa usanza già nel Medioevo, ma col tempo divenne così popolare che venne conferito l'incarico di praticarla anche ai barbieri: l'insegna a bande bianche e rosse deriva dalla consuetudine di appendere le bende sporche di sangue dei pazienti salassati.

Col passare del tempo l'uomo iniziò a capire che anziché rimuovere sangue per curare un paziente, poteva essere terapeutico il suo esatto contrario, ossia donarlo. Da qui vennero sperimentate le prime trasfusioni di sangue.

La prima trasfusione di sangue documentata risale al 1492, nei riguardi del Papa Innocenzo VIII, del quale si racconta che gli fu fatto ingerire sangue

donatogli da tre giovani ragazzi, ma nonostante questo tentativo il pontefice ne morì poco dopo. Da questo racconto emerge come i primi approcci trasfusionali venivano effettuati introducendo il sangue donato per via orale. Tempo dopo, nel 1600, un medico inglese di nome William Harvey fece la scoperta della circolazione sanguigna, per cui venne avanzata l'ipotesi di immettere il sangue direttamente attraverso i vasi.

Nel 1665 venne effettuato il primo esperimento di questo tipo: Richard Lower effettuò una trasfusione di sangue da cane a cane, utilizzando la carotide del donatore e la giugulare del ricevente. Successivamente tentò di effettuare la stessa cosa sull'uomo, usando sangue animale, ma ne morì. Circa 200 anni dopo, un medico inglese, James Blundell, eseguì la prima vera trasfusione ematica da uomo a uomo, dal momento che capì che solo il sangue umano poteva essere inoculato nell'uomo. I primi tentativi vennero eseguiti raccogliendo il sangue in una ciotola, ma ben presto si vide che al di fuori dei vasi esso coagulava e non poteva essere più somministrato. A questo punto vennero messe a punto delle cannule che collegavano il vaso venoso del ricevente e il vaso arterioso del donatore, i quali si trovavano in letti adiacenti. I rischi e le complicanze di queste pratiche era enorme.

Nel 1900 Karl Landsteiner fece una scoperta enorme, che rivoluzionò la terapia trasfusionale fino ad allora conosciuta. Egli scoprì che ogni individuo possiede una tipologia di sangue differente, che definì come: A, B, AB e 0. Tale novità potette spiegare il motivo per cui alcune trasfusioni andavano a buon fine, mentre altre portavano ad un esito fatale: un paziente ricevente può recepire solo sangue dello stesso tipo o di gruppo 0.

Da quel momento molte novità furono introdotte nel campo della medicina trasfusionale, ad esempio: l'uso di anticoagulanti, la conservazione del materiale raccolto, l'impiego di flaconi di vetro.

Nel 1939 venne identificato il sistema Rh e ulteriori antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi, per mezzo dei quali la pratica trasfusionale venne via via affinata, limitando le incompatibilità e le reazioni avverse.

Arrivando ad oggi, attualmente è in uso un sistema di raccolta del sangue basato su sacche di plastica multiple a circuito chiuso, dalle quali è possibile

scomporre immediatamente il sangue nei suoi componenti, impiegati per differenti trattamenti terapeutici: emazie, plasma e piastrine. E' possibile quindi trasfondere al paziente solo l'emocomponente di cui ha necessità, relativamente alla patologia di cui soffre.

## **1.2-ACCENNI DI TERAPIA TRASFUSIONALE ODIERNA**

La terapia trasfusionale rappresenta l'azione mediante la quale un paziente, che possiede un emocomponente in quantità insufficiente, viene trasfuso per via endovenosa con l'unità che abbisogna, ricavata da donazione volontaria.

Partendo da una singola unità di sangue donata, da un donatore idoneo e attentamente selezionato, è possibile ottenere diversi emocomponenti, per cui da una sola donazione si risponde alla necessità trasfusionale di molteplici pazienti.

Gli emocomponenti derivati dal sangue intero donato sono:

- *Emazie concentrate leucodeplete*: si tratta di unità costituite da globuli rossi sospesi in una soluzione conservante e additiva, privati della maggior parte di globuli bianchi e delle piastrine. Sono indicate per il trattamento correttivo delle anemie. Vengono conservate per un totale di 42 giorni, in frigo emoteche, alla temperatura di 4°C.
- *Plasma da scomposizione*: si tratta di unità di plasma concentrato, presentante i fattori della coagulazione e piccole quantità di proteine, tra cui l'albumina. È indicato per la correzione dei disordini coagulativi. Da una sacca di sangue intero è possibile ottenere 250mL di plasma concentrato. La conservazione avviene mediante congelamento dell'unità entro 6 ore dal prelievo per mezzo di un abbattitore alla temperatura di -80°C. In seguito può essere conservato a -30°C per due anni.
- *Concentrato piastrinico da buffy coat*: si tratta di unità concentrate di piastrine, sospese in una soluzione conservante. Tale prodotto è ricavato da una componente della lavorazione del sangue intero, definita volgarmente "di scarto": *il buffy coat*. Si tratta di globuli bianchi e piastrine, sospesi in una piccola quantità di globuli rossi e plasma. Da questa sospensione vengono filtrate e raccolte solo le



piastrine, utilizzate appunto per ricavare il concentrato piastrinico. Esso è indicato per il trattamento delle piastrinopenie. La conservazione avviene in un agitatore piastrinico, a temperatura ambiente e in agitazione continua, per un totale di 5 giorni.



Figura 1: Gli emocomponenti ottenuti dalla donazione di sangue intero.

### 1.3-VALUTAZIONE DEL DONATORE E CRITERI DI DONAZIONE

La donazione di sangue è un atto volontario e gratuito, effettuato da un soggetto sano, definito come donatore, al fine di prelevare una certa quantità di sangue o di suoi componenti, da utilizzare successivamente per scopi medici e terapeutici.

Un soggetto che desideri effettuare una donazione di sangue deve recarsi presso uno dei Centri Trasfusionali, sedi autorizzate alla raccolta di sangue ed emocomponenti e alla loro lavorazione e conservazione, e deve possedere specifici requisiti, previsti da specifica normativa<sup>1</sup>, al fine di poter procedere alla suddetta donazione.

Le principali caratteristiche richieste sono:

- Età compresa tra 18 e 60 anni, per potersi candidare alla prima donazione.
- Peso non inferiore ai 50 kg.
- Buono stato di salute.
- Corretto stile di vita, in termini di assenza di qualsiasi comportamento o condizione di salute che possa mettere a rischio, in primis la salute del soggetto stesso e in seguito del paziente che riceve la donazione, quali ad esempio: uso di stupefacenti, alcoolici,

steroidi, anabolizzanti, rapporti a rischio di trasmissione di malattie infettive o patologie virali (come HIV o epatite B/C), patologie cardiovascolari e neoplastiche.

- Pressione arteriosa sistolica inferiore o uguale a 180 mm di mercurio e pressione arteriosa diastolica inferiore o uguale a 100 mm di mercurio.
- Frequenza cardiaca regolare, compresa tra 50 e 100 battiti/minuto.
- Valore di emoglobina minimo pari a 13,5g/dL per l'uomo e pari a 12,5g/dL per la donna. Nel caso specifico della donazione di solo plasma il valore scende a 12,5g/dL per l'uomo e 11,5g/dL per la donna.

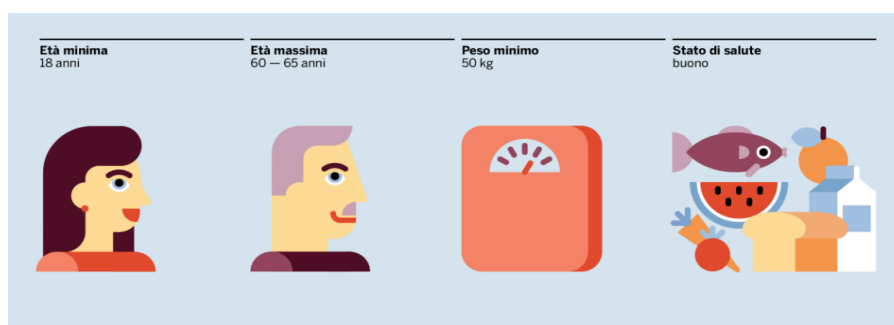


Figura 1: Requisiti per la donazione di sangue.

Qualsiasi cittadino che desideri effettuare una donazione di sangue deve recarsi presso un Centro Trasfusionale, dove viene invitato alla compilazione di un questionario, nel quale deve inserire i propri dati anagrafici e rispondere a delle domande mirate a verificare i requisiti di idoneità alla donazione.

Il donatore è sottoposto ad un controllo riguardo al valore dell'emoglobina: un'informazione fondamentale per accedere alla donazione. Per mezzo di una digito puntura, ovvero un prelievo di sangue capillare eseguito al dito anulare o medio della mano, si determina il valore dell'emoglobina e se questo rientra nei limiti decretati dalla normativa vigente<sup>1</sup> è possibile proseguire alla donazione.

In seguito il donatore viene convocato da un medico del Centro Trasfusionale al fine di effettuare un colloquio, durante il quale il clinico passa al vaglio il suddetto questionario. Successivamente il medico

trasfusione si appresta a verificare alcuni parametri di idoneità alla donazione: il peso, i valori di pressione arteriosa e battito cardiaco, nonché il valore di emoglobina.

Se, completato questo colloquio, non si presentano controindicazioni, il donatore accede alla sala prelievi per effettuare la donazione. Contemporaneamente alla donazione vengono prelevate anche delle provette necessarie ad eseguire le analisi necessarie alla validazione dell'emocomponente donato. Esse vengono ripetute ad ogni donazione, mentre alla prima donazione e una volta durante l'anno viene eseguito in aggiunta un pannello di biochimica clinica per la verifica del mantenimento del "buono stato di salute" del donatore.

#### **1.4-QUALI SONO LE POSSIBILI DONAZIONI**

Il donatore può effettuare diversi tipi di donazione ed esse sono:

- *Sangue intero*: si tratta di una donazione di sangue intero, effettuata da una vena del braccio, con un volume complessivo pari a 450mL  $\pm$ 10%. Il sangue donato viene raccolto all'interno di una sacca, facente parte di un kit, la quale contiene al suo interno 60mL di CPD, una soluzione anticoagulante. La donazione di sangue intero dura mediamente tra i 6 e i 10 minuti e avviene per caduta del sangue dalla vena del donatore alla sacca, posizionata in basso, su una bilancia basculante, che mantiene il sangue in agitazione per tutta la durata della donazione.

A processo completato la sacca viene conservata presso il Centro Trasfusionale a temperatura ambiente, quindi viene processata non prima di due ore dalla donazione.

Gli intervalli entro cui è possibile effettuare una donazione di sangue intero differiscono da uomo a donna: l'uomo deve attendere un minimo di 90 giorni tra una donazione e la seguente, per un totale di 4 donazioni all'anno, mentre la donna in età fertile può effettuare un massimo di 2 donazioni annue, per impedire un eccessivo

indebolimento del corpo, tenendo in conto la variabile del ciclo mestruale, propria del genere femminile.



Figura 2: Caratteristiche della donazione di sangue intero.

- *Aferesi*: si tratta di una donazione realizzata mediante uno specifico strumento, chiamato: “separatore cellulare”. Esso preleva sangue intero da una vena del braccio del donatore e per mezzo di un ciclo di centrifugazione separa le sue diverse componenti, quindi ne trattiene solo quella che si intende raccogliere e re-infonde le altre attraverso lo stesso accesso venoso.
  - *Plasmaferesi*: donazione di solo plasma, per un volume complessivo di 600mL al netto dell’anticoagulante. La tempistica di donazione è relativamente più lunga: consta di 40/50 minuti, visto il meccanismo con cui lo strumento opera. Il separatore funziona a fasi alterne: in un primo momento preleva il sangue indirizzandolo in un contenitore che permette di dividere la porzione cellulata dal plasma, attraverso un ciclo di centrifugazione, che separa le due parti sfruttando il rispettivo peso specifico. Via via che il contenitore si riempie di cellule il plasma viene convogliato in una sacca di raccolta. Quando il contenitore è pieno di cellule, il processo di prelievo si arresta, smettendo di inviare plasma alla sacca di raccolta e iniziando una seconda fase in cui gli emocomponenti non richiesti dalla donazione vengono re-infusi al donatore, attraverso il medesimo accesso venoso. Gli intervalli richiesti da questa donazione si accorciano: tra due donazioni di plasma devono intercorrere al minimo 14

giorni, mentre tra una donazione di sangue intero e di plasma 30 giorni.

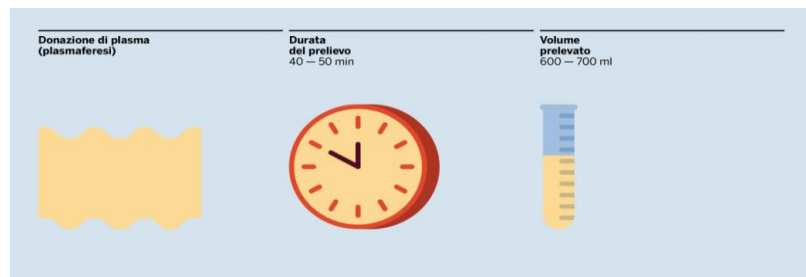


Figura 3: Caratteristiche della donazione di plasma.

- *Piastrinoaferesi*: donazione di sole piastrine, per un massimo di 6 donazioni annue.
- *Eritroaferesi*: donazione di soli globuli rossi.

Grazie all'impiego di questi moderni separatori cellulari, oggi giorno è possibile effettuare delle donazioni definite: multicomponente, ossia una donazione di multipli emocomponenti, le più frequenti sono:

- *Plasmapiastrinoaferesi*: donazione di plasma e piastrine.
- *Eritropiastrinoaferesi*: donazione di globuli rossi e piastrine.
- *Doppia piastrinoaferesi*: donazione di due sacche di piastrine.
- *Doppia eritroaferesi*: donazione di due sacche di globuli rossi.
- *Eritroplasmaferesi*: donazione di globuli rossi e plasma.

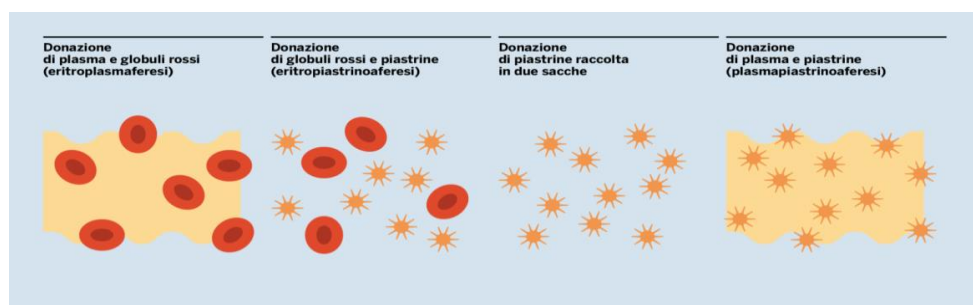


Figura 4: Rappresentazione delle possibili donazioni multicomponente.

## 1.5-IL FRAZIONAMENTO

Al termine della donazione la sacca deve permanere a riposo per almeno due ore, così da dare la possibilità ai globuli bianchi di distruggere ogni microrganismo eventualmente presente e permettere alla loro membrana cellulare di irrigidirsi, in modo che passando attraverso il filtro di leucodeplezione possano rimanerne intrappolati. In questa prima fase di lavorazione è necessario accertarsi dell'integrità della sacca madre e delle tre sacche satelliti, facenti parte del kit in dotazione, a cui la sacca madre è collegata per mezzo di un circuito chiuso e sterile.

Tutte le sacche devono essere etichettate e correttamente identificate.

In seguito le sacche di sangue intero vengono poste nei contenitori della centrifuga, avendo cura di bilanciarle per peso e disponendole in senso speculare all'interno dello strumento. Quindi, si può avviare il programma di centrifugazione: 10 minuti a 3440 giri, alla temperatura di 22°C. La tecnica della centrifugazione opera per mezzo di una forza fisica chiamata: forza centrifuga, essa permette la stratificazione delle componenti del sangue: la parte più pesante si depositerà sul fondo (globuli rossi), mentre quella più leggera e liquida in alto (plasma). Inoltre nel centro della sacca è possibile evidenziare un anello a divisione delle due parti: si tratta di una componente particolare definita "buffy coat" e corrisponde essenzialmente a una sospensione di piastrine e globuli bianchi.

Dopo aver accertato l'integrità della sacca previa centrifugazione e la sua esatta stratificazione si procede al passaggio successivo: il frazionamento. Il macchinario utilizzato è un frazionatore automatico che divide la componente liquida dalla componente corpuscolata per mezzo di una diversità di pressione e densità. È dotato di testine saldatrici che mediano, per mezzo di saldature, la divisione degli emocomponenti. La sacca estratta dalla centrifuga viene posta nella parte centrale dello strumento, mentre la sacca contenente il sagmannitolo (una soluzione zuccherata con attività conservante) viene allocata sotto una pressa posta nella parte superiore. Non appena verrà avviato il programma la pressa andrà a comprimere la sacca, facendo fluire il sagmannitolo in un'altra sacca, posta a destra, su una

bilancia, ove verranno convogliati in seguito anche i globuli rossi. La sacca dove verrà raccolto il plasma si trova invece nella parte sinistra dello strumento. Il programma di separazione inizia attivando una pressa, che comprime la sacca madre centrifugata, facendo defluire il plasma separato all'interno della sacca disposta a sinistra. Di seguito i globuli rossi vengono convogliati nella sacca contenente il sagmannitolo. Il materiale rimasto nella sacca principale è costituito dal buffy coat. Terminata questa fase di separazione è necessario miscelare con cura la soluzione di sagmannitolo e globuli rossi e agganciare tale sacca ad un supporto per consentire al liquido di fluire, grazie alla forza di gravità, attraverso un filtro, che presenta il compito di intrappolare ed eliminare ogni globulo bianco residuo e raggiungere così una maggiore leucodeplezione. A processo terminato è necessario prelevare un "codino" della sacca contenente le sole emazie, al fine di effettuare un test di conferma del gruppo sanguigno.

Le sacche di buffy coat sono mantenute in agitazione fin tanto che non è possibile creare un pool piastrinico. Per realizzare questo prodotto è necessario possedere un minimo di quattro buffy coat, fino ad un massimo di sei possibilmente omogruppo, mentre in casi estremi è possibile utilizzare buffy coat di gruppi diversi, assegnando all'unità di concentrato piastrinico il gruppo fenotipicamente dominante. Suddette sacche vengono unite, attraverso un saldatore sterile, ad una sacca collegata ad una seconda sacca contenente un soluzione conservante. I buffy coat confluiscono nella sacca principale e in seguito la soluzione conservante/nutriente SSP viene fatta fluire nelle sacche svuotate dal buffy coat, in modo da lavare e poter recuperare anche le ultime parti rimaste. In ultimo il tutto confluisce nella sacca principale, la quale successivamente viene posta in centrifuga, per 6 minuti a 450 giri. A termine centrifugazione la sacca viene posta sulla macchina separatrice, così da ricavare le sole piastrine, la cui concentrazione minima deve essere di  $2.0 \times 10^{11}$ .

I conteggi che determinano la validità del concentrato piastrinico vengono effettuati un'ora dopo la realizzazione del pool, facendo fluire una piccola

parte del concentrato in una sacca satellite. Da questo prelievo viene effettuato un esame emocromocitometrico.

Le sacche di emazie vengono filtrate con il relativo filtro trattenente i globuli bianchi (leucodeplezione pre-storage).

Inoltre esse possono essere ulteriormente irradiate. L'irradiazione consiste in una procedura effettuata nel reparto di radioterapia, per mezzo della quale, mediante emissioni radioattive di 25Gy vengono inattivati i globuli bianchi. Le unità sottoposte a irradiazione presentano il vantaggio di poter prevenire la reazione trasfusionale TA-GVHD (Graft Versus Host Disease), legata alla quota linfocitaria residua. L'unico svantaggio di tale trattamento consiste nel fatto che le radiazioni possono distruggere anche alcuni globuli rossi, liberando il potassio in essi contenuto. Per tale motivo la data di scadenza della sacca irradiata viene ridotta da 42 giorni a 28 giorni.

### **1.6-VALIDAZIONE DEGLI EMOCOMPONENTI**

Al fine di garantire qualità e sicurezza del sangue e rendere così utilizzabili le unità frazionate, ad ogni donazione il sangue prelevato viene sottoposto, secondo la normativa vigente<sup>1</sup>, ai seguenti esami di validazione:

- ✓ Esame emocromocitometrico completo
- ✓ Esami per la qualificazione biologica del sangue e degli emocomponenti, di cui:

→Esami sierologici effettuati sul siero della provetta pilota, prelevata in concomitanza con la donazione. I test vengono eseguiti con la metodica in chemiluminescenza (CMIA) per la ricerca di antigeni e anticorpi, quali:

- HBsAg (antigene di superficie del virus dell'epatite virale B).
- Anticorpi anti-HCV (anticorpo contro il virus dell'epatite virale C).



- Test sierologico per la ricerca combinata di anticorpo anti-HIV (anticorpo contro il virus dell'AIDS) 1-2 e antigene HIV 1-2.
- Anticorpi anti-Treponema Pallidum (TP) con metodo immunometrico (sifilide).

→Esami NAT di biologia molecolare, quali:

- TRI-NAT (HBV/ HCV/ HIV 1-2), si tratta di una metodica che utilizza PCR per rilevare la presenza di acidi nucleici dei virus di epatiti virali B, C e di HIV.

In caso di responso negativo a queste analisi virologiche/sierologiche e di responso positivo riguardo i parametri di idoneità della sacca, le unità vengono validate e rese disponibili per l'utilizzo clinico. Quindi è possibile procedere all'etichettatura definitiva dell'emocomponente con una nuova etichetta che garantirà la sua corretta e univoca identificazione e una tracciabilità costante attraverso la registrazione di tutti i passaggi effettuati a partire dalla vena del donatore, fino alla vena del paziente ricevente la trasfusione.

Per concludere, si procede alla conservazione nei tempi e nelle modalità proprie dell'emocomponente in questione.

Al contrario nel momento in cui un test risulta positivo si precede innanzitutto ad eliminare l'unità e in seguito il donatore viene contattato e invitato a sottoporsi ad ulteriori accertamenti.

In occasione della prima donazione, presso il Centro Trasfusionale, vengono inoltre eseguiti i seguenti esami per la determinazione del gruppo sanguigno:

- ABO, mediante test diretto e indiretto
- Fenotipo Rh completo

- Determinazione dell'antigene Kell (K) e, in caso di positività dello stesso, ricerca dell'antigene Cellano (k)
- Ricerca degli anticorpi irregolari antieritrocitari

Alla seconda donazione, se non già confermati, devono essere ricercati:

- Fenotipo AB0
- Fenotipo Rh
- Antigene Kell (K)

Su ogni successiva donazione devono essere confermati fenotipo AB0 (solo test diretto) e Rh (antigene D). La ricerca degli anticorpi irregolari antieritrocitari deve essere ripetuta in presenza di eventi che possono determinare una stimolazione immunologica del/della donatore/donatrice.

Il donatore periodico inoltre è sottoposto, con cadenza annuale, ai seguenti controlli ematochimici: glicemia, creatininemia, alanin-amino-transferasi, colesterolemia totale e HDL, trigliceridemia, protidemia totale e ferritinemia.

### **1.7-PAZIENTI, INDICAZIONE ALLA TRASFUSIONE E VALORI SOGLIA**

La terapia trasfusionale consiste nella somministrazione endovenosa di sangue o di suoi emocomponenti, prelevati da un individuo indentificato come donatore, a un paziente ricevente, al fine di migliorarne le condizioni cliniche in risposta a specifiche esigenze di natura clinica.

I pazienti che si rivolgono al Servizio Trasfusionale, sia essi siano ambulatoriali (per mezzo di consulenze visionate dal medico trasfusionista) od ospedalieri (per mezzo di richieste fatte recapitare al Centro Trasfusionale dai reparti) possono richiedere tre tipologie di emocomponenti, relativamente alle patologie cliniche riscontrate:

- *Unità di emazie*: la trasfusione è indicata per aumentare rapidamente l'apporto di ossigeno ai tessuti, quando la concentrazione di Hb è bassa e/o la capacità ossiforetica è ridotta.

Le condizioni richiedenti una somministrazione di unità di globuli rossi sono: anemie croniche (quali Anemia Falciforme o

Talassemia), patologie onco-ematologiche o rimpiazzo di perdite di sangue in seguito a eventi traumatici, incidenti o interventi chirurgici.

Il parametro richiesto, al fine di valutare una condizione di anemia è il valore di emoglobina, correlato ai segni di ipossigenazione.

Il valore cut-off di Hb sotto il quale è necessario trasfondere emazie è pari a 8g/dL, valutando sempre e comunque tutte le eventualità, l'eziopatogenesi (segni e sintomi di anemia, rapidità di perdita ematica, entità di perdita ematica, funzione cardiovascolare, funzione polmonare ad esempio) e i meccanismi di compenso in risposta all'anemia.

Una unità di emazie aumenta il valore dell'Hb di 1g/dL e dell'Hct del 3%.

Nei bambini si procede a trasfondere 5mL/kg, con un apporto di 1g/dL di Hb. Se così non fosse, si sospetta una possibile perdita, un sequestro o una distruzione dei globuli rossi.

Le indicazioni inappropriate alla trasfusione di CE sono: valore di Hb > 10g/dL, espansione del volume ematico, sostituzione a ematinici a scopo ricostituente.

- *Unità di plasma*: la trasfusione è indicata per la correzione di deficit di fattori della coagulazione, per i quali non si dispone del concentrato specifico o in pazienti con sanguinamento in atto.
  
- *Concentrati piastrinici (CP)*: la trasfusione è indicata per la profilassi e la terapia delle emorragie, nei pazienti affetti da piastrinopenia o da deficit funzionali delle piastrine, primitivi o secondari. La decisione di trasfondere CP non deve basarsi esclusivamente su un basso conteggio piastrinico. L'indicazione assoluta deve essere considerata una severa piastrinopenia accompagnata da emorragie clinicamente rilevanti. Tutte le altre

indicazioni sono più o meno relative e dipendono dalle condizioni cliniche del paziente.

## CAPITOLO II, IL SANGUE E LA SUA ORIGINE

### 2.1-IL SANGUE

Il sangue è definito come un tessuto connettivo specializzato. Si tratta di un fluido di colore rosso, viscoso e leggermente alcalino, con un valore di pH compreso tra 7,35 e 7,45. Esso circola all'interno del distretto vascolare.

E' costituito da una componente corpuscolata, anche definita: "figurata", composta da globuli rossi (o eritrociti), globuli bianchi (o leucociti) e piastrine e da una componente liquida: il plasma. Quest'ultimo rappresenta una porzione del volume totale del sangue pari al 55% e comprende: acqua, proteine plasmatiche ed elettroliti.

Le principali funzioni del sangue sono:

- Trasporto di gas, nutrienti, microelementi, cataboliti e ormoni.
- Regolare la temperatura.
- Idratazione di tessuti e organi.
- Regolare il pH, mediante sistemi tampone.
- Consentire un'ottimale risposta immunitaria, estremamente diversificata dal tipo di agente patogeno.
- Coagulazione sanguigna, ove intervengono cellule e proteine plasmatiche (fattori della coagulazione e sistema del complemento) preposte a fronteggiare eventi di emorragia e/o trombosi.

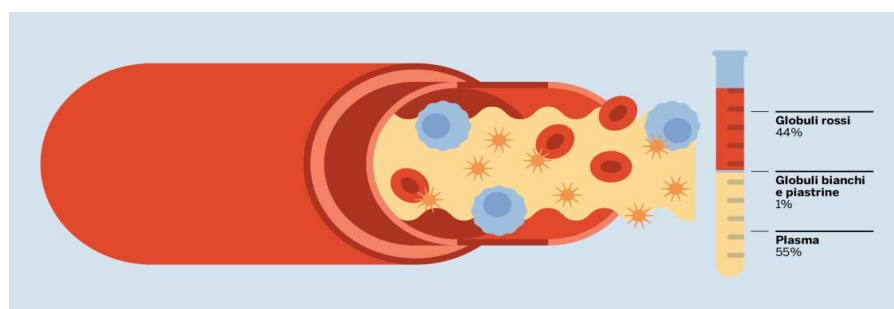


Figura 5: Rappresentazione delle componenti del sangue, all'interno di un vaso sanguigno.

### 2.2-L'EMOPOIESI

L'emopoiesi è l'insieme dei processi biologici che conducono alla formazione, differenziazione e maturazione di tutte le cellule del sangue, a partire da un precursore comune: una cellula staminale pluripotente del

midollo osseo. Globuli rossi, globuli bianchi e piastrine sono incapaci di dividersi, per cui devono essere continuamente rimpiazzati da nuove cellule prodotte nei principali organi deputati all'emopoiesi: il midollo osseo e gli organi linfatici (in questi ultimi maturano solo i linfociti).

Il midollo osseo è allocato nello scheletro assile dove occupa i canali delle ossa lunghe (ad esempio il femore) e la fascia centrale delle ossa piatte (ad esempio le ossa del bacino).

Nell'anatomia umana è possibile riconoscere due tipologie di midollo osseo:

- Il midollo osseo rosso o emopoietico costituito da tessuto mieloide. Esso è contenuto negli spazi tra le trabecole del tessuto spugnoso delle ossa corte e piatte e nelle diafisi delle ossa lunghe. Si tratta della maggioranza del midollo presente alla nascita, ma nell'età adulta viene via via sostituito in parte da tessuto adiposo.
- Il midollo osseo giallo costituito da tessuto adiposo, il quale ne conferisce il colore giallo e, al contrario del precedente, non presenta alcuna attività emopoietica.

I principali elementi ematici (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) derivano da una comune cellula staminale pluripotente che rappresenta la prima tappa di una serie di processi sequenziali e ordinati che conducono alla crescita e alla maturazione delle suddette cellule ematiche. Questa cellula staminale discende a sua volta da una cellula staminale totipotente: si tratta di una cellula che presenta la capacità intrinseca di originare diverse vie differenziative: la via ematica o le linee cellulari fibroblastiche, condrocitiche, ecc. Nel momento in cui viene innescata la linea emopoietica la cellula staminale totipotente si trasforma in pluripotente. Dalla suddetta cellula possono partire diverse linee di maturazione, anche molto differenti tra loro dal punto di vista morfologico e funzionale, poiché le cellule intermedie dell'emopoiesi vengono regolate da fattori di crescita e da ormoni, quali l'eritropoietina.

Le due principali vie emopoietiche sono:

- *Linea mieloide*, da cui diparte la mielopoiesi dando origine a: globuli rossi, piastrine, granulociti, monociti e megacariociti (grosse cellule

che risiedono nel midollo osseo, da cui si sfaldano frammenti cellulari rivestiti da una membrana. Una volta riversati nel torrente ematico prendono il nome di piastrine.).

→ *Linea linfoide*, da cui diparte la linfopoiesi, la quale porta a maturazione i linfociti B, T e NATURAL KILLER.

### **2.3-L'ERITROPOIESI O LINEA ROSSA**

L'eritropoiesi o linea rossa è un processo biologico deputato al rinnovamento continuo e fisiologico dei globuli rossi giunti al termine della loro vita cellulare o distrutti precocemente.

Essa è caratterizzata da intermedi di maturazione che si trovano in via di differenziazione morfologica, partendo dal pro eritroblasto, fino ad arrivare all'eritrocita maturo. I cambiamenti osservabili tra uno stadio e l'altro riflettono l'espressione della sintesi dell'emoglobina e dell'involuzione del nucleo, il quale in un primo momento perde il nucleolo, in seguito diventa via via più compatto e piccolo (picnotico), fino ad essere espulso dalla cellula. Il processo di differenziamento completo, che porta alla produzione di un eritrocita maturo dura 4-5 giorni.

L'eritropoiesi risulta subordinata da un ormone: l'eritropoietina. Una condizione di ipossia o un abbassamento del valore di eritrociti circolanti stimola il rene alla produzione di questo ormone.

Il processo prende il via da una cellula staminale pluripotente (CFU-GEMM), la quale, sotto lo stimolo dei fattori di crescita, è indirizzata verso la linea unipotente (CFU-E). La cellula staminale unipotente presenta la sola capacità di sviluppare la linea di produzione eritroide: per tale ragione in presenza di eritropoietina genera il *pro eritroblasto*, che rappresenta il primo precursore della linea rossa, presentante al suo interno un nucleo eucromatico, cromatina finemente sottile e un citoplasma scarso e basifilo.

A seguire si osservano:

→ *Eritroblasto basofilo*: caratterizzato da piccole vescicole ricche di ferritina, cromatina morfologicamente condensata in zolle e un citoplasma abbondante e maggiormente basofilo. L'attività mitotica in questa fase risulta intensa.

→*Eritroblasto policromatofilo*: caratterizzato da un nucleo più denso, una cromatina maggiormente granulare e una percentuale di emoglobina più alta rispetto all'intermedio precedente, mano a mano che questa si accumula il citoplasma vira da una situazione di basofilia, ad una di acidofilia. In questa fase i nucleoli spariscono.

→*Eritroblasto ortocromatico*: in questo caso il nucleo risulta piccolo, tondo e già in una visibile fase di espulsione dalla cellula. L'emoglobina risulta la componente più rappresentata e questo viene attestato da un citoplasma intensamente acidofilo.

→*Reticolocita*: il nucleo è già assente e per questo motivo appare simile alla cellula matura, ma è possibile evidenziare ancora la presenza del reticolo endoplasmatico. Esso rappresenta il 0,8% del quantitativo totale di eritrociti e riflette l'espressione del funzionamento del midollo osseo.

→*Eritrocita*: fase finale del processo maturativo della linea di eritropoiesi. E' la forma circolante, che è possibile riscontrare nel flusso ematico e/o in uno striscio di sangue. All'osservazione al microscopico ottico si osservano cellule prive di nucleo, ricche di emoglobina e dotate di un citoplasma di colore rosa.

#### **2.4-LE CELLULE DEL SANGUE: GLOBULI ROSSI, GLOBULI BIANCHI E PIASTRINE**

Come detto in precedenza, nel fluido ematico si distinguono due fasi: una corpuscolata, composta da: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine e una liquida: il plasma.

- *I globuli rossi*, noti anche come eritrociti o emazie, sono le cellule maggiormente presenti nel flusso ematico. Presentano una caratteristica forma discoidale, definita: a disco biconcavo, con un diametro di 5-7 $\mu$ m e uno spessore di 2 $\mu$ m. Gli eritrociti non presentano nucleo, dal momento che esso viene perso durante il processo di maturazione della linea rossa e allo stesso modo anche il citoplasma risulta privo di organelli cellulari.



Negli uomini il numero di globuli rossi è compreso tra 4.500.000 e 6.000.000/mm<sup>3</sup>.

Nella donna il numero di globuli rossi è compreso tra 4.000.000 e 5.500.000/mm<sup>3</sup>,

La loro principale funzione è quella di trasportare ossigeno ai tessuti del corpo e riportare ai polmoni parte dell'anidride carbonica prodotta. Tale mansione viene espletata mediante una proteina contenuta in grande quantità nel globulo rosso: l'emoglobina.

➤ *I globuli bianchi*, noti anche come leucociti, sono cellule di grandezza maggiore rispetto agli eritrociti (8-10µm) e rispetto a questi ultimi possiedono il nucleo cellulare.

Hanno la funzione di difendere l'organismo umano dagli agenti patogeni.

Sono distinti in:

→ *Polimorfonucleati*, di cui è possibile evidenziare:

- *Neutrofili*: presentano un nucleo polilobato e un citoplasma ricco di granuli. Possiedono un'azione fagocitaria contro i batteri, per cui sono riscontrabili in grande quantità di seguito a un'infezione batterica.
- *Eosinofili*: presentano un nucleo bilobato e molteplici granuli nel citoplasma cellulare. Esplicano la loro azione di difesa in seguito a infezioni parassitarie e reazioni allergiche.
- *Basofili*: presentano un nucleo bi/trilobato e anche essi sono identificabili in circolo di seguito a reazioni allergiche.

→ *Mononucleati*, tra cui si riscontrano:

- *Monociti*: sono leucociti di grandi dimensioni (15-18µm), con un nucleo caratteristicamente a forma di ferro di cavallo.
- *Linfociti*: sono leucociti di piccole dimensioni e sono deputati alla difesa di tipo specifico del sistema immunitario. Il nucleo è molto grande, tale per cui il rapporto tra nucleo e citoplasma risulta essere di 1:1.

Normalmente vengono mobilitati di seguito a infezioni di tipo virale.

Tra i linfociti si distinguono: i linfociti T che hanno un'azione diretta contro i patogeni e i linfociti B che producono molecole definite come anticorpi (Ab), dirette contro gli antigeni solubili.

- *Piastrine*, dette anche trombociti, sono elementi cellulari del sangue di piccolissime dimensioni (2-4 $\mu$ m). Hanno origine dalla frammentazione di cellule di notevoli dimensioni presenti nel midollo osseo: i megacariociti. Presentano una forma discoidale e sono anche esse, come le emazie, prive di nucleo.

La loro funzione è focalizzata alla coagulazione sanguigna, ove intervengono, di seguito al processo di vasocostrizione, aggregandosi per formare un tappo piastrinico, che rappresenta la prima barriera contro l'emorragia.

I valori normali si aggirano intorno a 150 e 440 migliaia/ $\mu$ L.

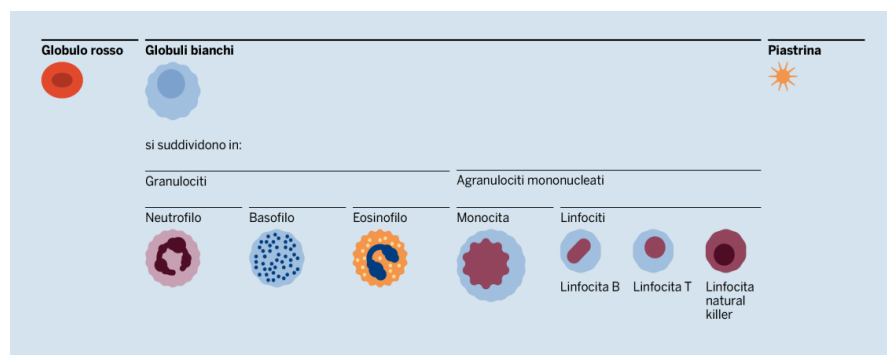


Figura 6: Rappresentazione delle diverse cellule presenti nella circolazione sanguigna.

## 2.5-1 GRUPPI SANGUIGNI

I globuli rossi recano sulla loro superficie molteplici antigeni, alcuni dei quali sono definiti: antigeni gruppo ematici e fra questi i più importanti costituiscono il complesso antigenico: *ABO*.

➤ *ABO*: gli antigeni gruppo ematici ABO sono localizzati su molecole polisaccaridiche, strutturalmente correlate. Gli antigeni vengono formati dall'azione di specifici enzimi glicosiltransferasici che inseriscono zuccheri in siti posti sulle catene corte dei saccaridi (oligosaccaridi), i quali sono strutturati su una comune sostanza precursore.

I geni coinvolti nella sintesi degli antigeni polisaccaridici codificano per enzimi glicosiltransferasici. I geni in questione appartengono a tre diversi loci (ABO, Se, H) e assodano la produzione e la localizzazione degli antigeni A e B sugli eritrociti.

I loci dei geni H e Se sono allocati sul cromosoma 19. Ognuno di questi geni presenta due alleli, di cui uno è considerato “amorfo”, poiché non determina alcun prodotto riconoscibile.

Nel caso del gene H è stato identificato un allele attivo: H, il quale regola la sintesi di un enzima: la fucosiltransferasi, che determina la produzione degli antigeni H espressi sulla superficie dei globuli rossi, aggiungendo una molecola di fucosio alla catena precursore. L'allele amorfo: h è molto raro.

Allo stesso modo, il gene Se presenta un allele attivo: Se, il quale, specularmente al precedente, codifica per l'enzima fucosiltransferasi, coinvolto nella sintesi dell'antigene H contenuto prevalentemente nelle secrezioni.

L'antigene H rappresenta la base per il successivo assemblaggio degli antigeni A e B.

Il gene ABO allocato sul cromosoma 9 ha tre diversi alleli: A, B e 0. Gli alleli A e B codificano rispettivamente per transferasi implicate nella produzione degli antigeni A e B. Nel dettaglio, l'allele A codifica per l'N-acetil-D-galattosaminiltransferasi che aggiunge l'N-acetil-D-galattosamina alla sostanza H per formare l'antigene A. L'allele B codifica per una galattosiltransferasi che aggiunge il D-galattosio all'antigene H per formare l'antigene B. In ultimo, l'allele 0 non codifica per alcun enzima, da questa considerazione ne deriva

che i soggetti di gruppo 0 non avranno sulla superficie dei globuli rossi gli antigeni A o B, bensì solo una grande quantità di sostanza precursore H. Gli individui di gruppo AB possiedono alleli che producono transferasi per aggiungere sia un residuo di N-acetil-D-galattosamina, che di galattosio all'antigene precursore H. L'aggiunta di questi zuccheri: A e/o B riduce la reattività sierologica dell'antigene H, in modo che l'espressione degli antigeni A o B risulti inversamente proporzionale a quella dell'antigene H.

Diversi studi in campo trasfusionale hanno dimostrato la presenza di sottogruppi del sistema AB0, che definiscono delle espressioni fenotipiche che differiscono nella quantità di antigeni espressi sugli eritrociti. I sottogruppi più frequenti sono quelli dell'antigene A e subito a seguire dell'antigene B. La classificazione delle differenti tipologie di antigene A prevede sostanzialmente una suddivisione dell'espressione fenotipica in due varianti: A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. In generale è stato osservato che, sia le emazie A<sub>1</sub>, sia le emazie A<sub>2</sub>, reagiscono ai test di agglutinazione diretta eseguiti allo scopo di determinare il gruppo sanguigno. La discriminazione sierologica tra i sottogruppi A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> può essere rilevata mediante l'uso di un reattivo a base di lectina anti-A<sub>1</sub>. È stata dimostrata infatti una differenza sia quantitativa che qualitativa tra A<sub>1</sub> ed A<sub>2</sub>, dove esercita un ruolo molto importante la transferasi A<sub>1</sub>, la quale è molto efficiente nella conversione della sostanza H in antigene A. Per cui risulterà un'espressione maggiore dell'antigene A rispetto alla sostanza H, la quale resterà in quantità molto ridotta. "Approssimativamente l'80% degli individui di gruppo A o di gruppo AB hanno delle emazie che sono agglutinate dall'anti-A<sub>1</sub> e perciò sono classificati come A<sub>1</sub> o A<sub>1</sub>B. Il rimanente 20%, i cui globuli rossi sono fortemente agglutinati dall'anti-A, ma non dall'anti-A<sub>1</sub>, sono classificati come A<sub>2</sub> o A<sub>2</sub>B." (*Technical Manual* AABBeditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide).

Al completamento degli antigeni gruppo ematici espressi sulla membrana del globulo rosso è rintracciabile anche una controparte anticorpale nel siero. Generalmente un individuo possiede nel proprio siero gli anticorpi rivolti verso l'antigene A o B, assente sulle emazie. Per cui, soggetti di gruppo B o 0 producono anticorpi anti-A e individui di gruppo 0 o A sviluppano nel siero anticorpi anti-B. Gli individui di gruppo AB non producono, né anticorpi anti-A, né anti-B. Gli anticorpi anti-A prodotti da un soggetto di gruppo B e gli anticorpi anti-B prodotti da un soggetto di gruppo A appartengono alla classe di immunoglobuline IgM. Gli anticorpi anti-A e anti-B prodotti da un individuo di gruppo 0 fanno parte della classe di immunoglobuline IgG. Le IgG, a differenza delle IgM, possono attraversare la placenta, per cui neonati di gruppo A o B, nati da mamme di gruppo 0 presentano un rischio molto più elevato di sviluppare la malattia emolitica neonatale o fetale.

Sia IgM che IgG sono reattive a temperatura ambiente (20°C-25°C) o a temperature inferiori e attivano il complesso del complemento a 37°C.

A livello clinico, la duplice determinazione del gruppo sanguigno (per mezzo di antigeni e di anticorpi) consente la corretta identificazione del gruppo sanguigno di un soggetto. Sono stati messi a punto due test: uno viene definito "prova diretta", in cui vengono ricercati gli antigeni adesi alle emazie, mediante l'impiego di anti-sieri. Il secondo consiste in una "prova indiretta", in cui vengono ricercati gli anticorpi cimentando il siero/plasma del soggetto, con emazie di gruppo noto. Vengono effettuati entrambi i test poiché uno rappresenta il controllo dell'altro.

## **2.6-IL SISTEMA Rh E I SISTEMI MINORI**

In aggiunta al sistema AB0, sulla membrana degli eritrociti, vi sono ulteriori complessi antigenici.

➤ **SISTEMA RHESUS “Rh”**

In seguito al sistema AB0, il complesso Rh è il secondo sistema per importanza clinica, particolarmente nell'ambito trasfusionale. Comprende circa 50 antigeni. Si tratta di proteine non glicosilate integrali di membrana/trasmembrana.

I geni che regolano questi antigeni sono due: RHD e RHCE, sono allocati sul cromosoma 1 e seguono una via di trasmissione ereditaria autosomica dominante, per cui i soggetti omozigoti presentano il doppio dei siti antigeni rispetto agli eterozigoti. L'antigene D è codificato dal gene RHD ed è il più immunogeno, rispetto agli altri antigeni eritrocitari. Uno studio ha stimato che “che dal 30 all'85% delle persone D negative che ricevono una trasfusione D positiva svilupperà l'anti-D.” (*“TechnicalManual”* AABBeditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide). Da questa considerazione si evince il motivo per cui la determinazione della presenza o assenza dell'antigene D è diventata una prassi routinaria nelle pratiche trasfusionali.

A differenza del sistema AB0, dove sono presenti antigeni eritrocitari e corrispondenti anticorpi sierici, il sistema Rh comprende antigeni eritrocitari, come ad esempio l'antigene D, ma è privo di anticorpi fisiologici anti-D. Gli anticorpi si sviluppano nel siero del soggetto solo di seguito ad un'esposizione all'antigene D di natura trasfusionale o gravidica.

Ulteriori antigeni appartenenti a questo sistema sono: C, E, c, e. Essi sono codificati dal gene RHCE, di cui sono presenti diverse varianti alleliche implicate nelle molteplici espressioni fenotipiche: RHCE, RHCe, RHce, RHcE. Come detto in precedenza per l'antigene D, anche per gli antigeni sopracitati, i relativi anticorpi non sono naturalmente presenti nel siero, ma sono sviluppati a seguito di un'esposizione antigenica.

In ordine di immunogenicità, gli antigeni sopracitati sono: “c, E, C, e.” (*“TechnicalManual”* AABBeditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide).

Gli anticorpi anti-Rh sono immunoglobuline di tipo IgG, motivo per cui permangono in circolo per molti anni, non legano il complemento, presentano una reazione ottimale a 37°C e sono particolarmente implicati nello sviluppo dell’anemia emolitica autoimmune da sviluppo di autoanticorpi e della malattia emolitica del neonato (MEN).

### ➤ **SISTEMA KELL**

Il sistema Kell comprende antigeni espressi a bassa densità sulla membrana degli eritrociti, codificati da un singolo gene.

Il complesso raggruppa circa 40 antigeni, di cui vengono generalmente ricercati e studiati nella pratica clinica e trasfusionale: K e k, i quali si trovano peraltro in condizione di co-dominanza l’uno con l’altro.

La frequenza dei fenotipi del sistema Kell nella popolazione presenta tali valori statistici: “Kk” 1/10, “KK” 2/1000, “kk” 9/10. (*“TechnicalManual”* AABBeditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide).

Di seguito agli anticorpi anti-AB0 e anti-Rh, gli anticorpi anti-K sono i più frequenti e immunogeni. Sono responsabili di reazioni trasfusionali immediate e ritardate, solitamente extra vascolari, nonché di MEN e gravi anemie fetali. Nonostante questo, le odierne tecniche trasfusionali di determinazione fenotipica consentono l’assegnazione di sacche compatibili per il sistema Kell.

La maggioranza dei donatori di sangue non presenta l’antigene K espresso, per cui si evince come sia facile reperire sacche per pazienti Kell negativi o positivi al relativo anticorpo.

L’anticorpo anti-k presenta le medesime caratteristiche sierologiche, ma è meno frequente del precedente.

L'anticorpo anti-Kp<sup>a</sup> è piuttosto raro e per questo motivo poco significativo.

➤ **SISTEMA KIDD**

Il complesso Kidd espone due antigeni: Jk<sup>a</sup> e Jk<sup>b</sup>. Essi sono localizzati sulla proteina di trasporto dell'urea, codificata dal gene HUT11. Le emazie negative per i due antigeni Kidd risultano molto resistenti all'azione litica dell'urea, mentre emazie recanti gli antigeni Kidd si rigonfiano fino a lisciarsi di seguito ad un contatto con l'urea.

I fenotipi riconosciuti dalla diversa espressione allelica del sistema Kidd sono: Jk(a+b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+) e Jk(a-b-). L'ultimo fenotipo è molto raro.

Gli anticorpi anti-Jk<sup>a</sup> e anti-Jk<sup>b</sup> sono piuttosto rari. Si tratta di IgG debolmente reattive. È stato riconosciuto il loro coinvolgimento in reazioni trasfusionali ritardate ed episodi di MEN in forma leggera. Questi anticorpi presentano inoltre la particolarità di fissare il complemento, perciò possono causare reazioni trasfusionali intravascolari. Diminuiscono la loro forza più rapidamente rispetto agli altri anticorpi, motivo per cui si trovano spesso al di sotto del livello di rilevabilità degli strumenti del laboratorio, determinando una ricerca anticorpi negativa e prove di compatibilità altrettanto negative.

➤ **SISTEMA LEWIS**

Si tratta di un sistema composto da due antigeni: Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>. Sono sintetizzati dall'allele Le che codifica per una glicosiltransferasi, che trasporta una molecola di zucchero a livello del precursore. Nello specifico l'antigene Le<sup>a</sup> viene espresso solo quando l'allele Le viene ereditato insieme all'allele se, mentre Le<sup>b</sup> è generato quando l'allele Le viene ereditato con almeno uno degli alleli Se. Nel momento in cui l'allele riconosciuto come silente o amorfo: le viene ereditato,



indipendentemente da quale sia la controparte genica secretrice presente, non viene elaborato alcun antigene Lewis.

Questi antigeni presentano una peculiarità: non risultano interconnessi alla membrana eritrocitaria come accade per gli altri, bensì sono solubili nei liquidi biologici e vengono adsorbiti sui globuli rossi.

“I fenotipi identificati sono: Le(a+b+): molto raro nella popolazione europea e africana, ma estremamente diffuso in Asia, Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-).” (*“Technical Manual”* AABB Editore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide).

Gli anticorpi anti-Le<sup>a</sup> e anti-Le<sup>b</sup> sono naturalmente presenti nei soggetti con fenotipo Le(a-b-), che non hanno subito alcuna esposizione agli antigeni. Soggetti recanti un fenotipo Le(a-b+) non sviluppano anticorpi anti-Le<sup>a</sup> perché sono presenti delle minime quantità di antigene non convertito nella saliva e nel plasma. Solitamente non sono osservabili anticorpi anti-Le<sup>b</sup> nel caso di un fenotipo Le(a+b-). Gli anticorpi osservati nel plasma sono quasi sempre IgM, che per la loro natura non possono attraversare la placenta. L'anti-Le<sup>a</sup> è potenzialmente emolitico, motivo per cui a questi pazienti deve essere somministrato sangue Le<sup>a</sup>-, mentre l'anticorpo anti-Le<sup>b</sup> non è clinicamente rilevante, solo in rari casi può agglutinare le cellule Le<sup>b</sup>+ a 30°C o superiore, in questi casi è buona norma assegnare sacche Le<sup>b</sup>-.

#### ➤ **SISTEMA MNS**

E' un sistema complesso formato da oltre 40 antigeni posti su glicoproteine o molecole ibride di due proteine. Gli antigeni M, N, S e s sono i più importanti in campo trasfusionale.

Gli antigeni M e N sono localizzati sulla glicoforina A, mentre S e s sulla glicoforina B. Il gene codificante questi antigeni eritrocitari è posto sul cromosoma 4.

Per via della presenza di molteplici antigeni, la loro espressione, piuttosto che la loro assenza, può dare origine a differenti espressioni fenotipiche.

Gli anticorpi sviluppati contro gli antigeni M o N sono IgM, che si comportano come deboli agglutinine fredde e non sono clinicamente rilevanti. In molti casi si riscontra la presenza di anti-M in pazienti che non hanno mai subito un'esposizione antigenica.

Gli anticorpi anti-S o anti-s invece si presentano come IgG reattive a 37°C e clinicamente rilevanti. Entrambi gli anticorpi sono prodotti per immunizzazione eritrocitaria e sono in grado di determinare reazioni emolitiche trasfusionali e malattie emolitiche nel feto e nel neonato.

#### ➤ **SISTEMA DUFFY**

Il sistema Duffy comprende due antigeni: Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, codificati da alleli co-dominanti di un singolo gene (FY), ubicato sul cromosoma 1.

Dalle diverse combinazioni di questi due antigeni discendono quattro differenti fenotipi: Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) e Fy(a-b-).

Da ricerche epidemiologiche e statistiche è emersa la distribuzione dei fenotipi sopracitati nella popolazione globale: “Nei caucasici i fenotipi Fy(a+b-), Fy(a+b+) e Fy(a-b+) sono comuni mentre gli individui con fenotipo Fy(a-b-) sono estremamente rari. Nei neri, invece, la frequenza del fenotipo Fy(a-b-) è del 68%.” (*Technical Manual* AABBEditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide).

La glicoproteina codificata dal gene Duffy attraversa la membrana dell'eritrocita molteplici volte e presenta un'attività recettoriale nei confronti del parassita malarico noto come “Plasmodium vivax”. Individui con un fenotipo Fy(a-b-) sono resistenti a infezioni malariche.

Gli anticorpi diretti contro il sistema Duffy sono piuttosto comuni e prodotti esclusivamente da stimolazione ematica (in seguito a trasfusioni). Nonostante l'esposizione gli anticorpi vengono rilevati solo in una piccola parte di pazienti trasfusi, motivo per cui si è concluso che si tratta di antigeni debolmente immunogeni. Gli anticorpi anti-Fy<sup>a</sup> (IgG) sono i più comuni e generalmente determinano reazioni trasfusionali emolitiche extra vascolari e MEN, mentre gli anticorpi anti-Fy<sup>b</sup> (sempre IgG) sono piuttosto rari e poco reattivi, nonostante siano state documentate eccezionali deboli reazioni trasfusionali ed episodi di MEN.

➤ **SISTEMA LUTHERAN**

Questo sistema comprende gli antigeni: Lu<sup>a</sup> e Lu<sup>b</sup>. I fenotipi originati sono quattro: Lu(a+b+), Lu(a+b-), Lu(a-b+) e Lu(a-b-): molto raro nella popolazione.

Gli anticorpi anti-Lu<sup>a</sup> sono naturali, per cui non presentano alcuna origine immune. Gli anticorpi anti-Lu<sup>b</sup> sono stati identificati come causa di una ridotta sopravvivenza di emazie incompatibili trasfuse e in correlazione a episodi MEN di modesta entità.

## **CAPITOLO III, L'ALLOIMMUNIZZAZIONE ANTIERITROCITARIA**

### **3.1-COS'È L'ALLOIMMUNIZZAZIONE ANTIERITROCITARIA**

L'alloimmunizzazione antieritrocitaria è una complicanza provocata dall'atto della trasfusione ematica, ma ugualmente può verificarsi di seguito a gravidanze o trapianti. Può essere rilevata mediante una ricerca degli anticorpi irregolari positiva, una prova crociata pre-trasfusionale positiva o con una reazione trasfusionale, anche se nella maggior parte dei casi risulta una complicanza silente e sospettabile solo nel caso di un'inspiegata riduzione della sopravvivenza eritrocitaria e un'inefficacia terapeutica della trasfusione.

Le possibili manifestazioni cliniche dell'alloimmunizzazione antieritrocitaria sono: reazione emolitica intravascolare acuta (causata generalmente da incompatibilità ABO), reazione emolitica ritardata (causata da alloanticorpi ematici, entro 24 ore dalla trasfusione) e malattia emolitica del feto o del neonato (causata dall'immunizzazione materna in seguito al contatto di sangue fetale, riconducibile solitamente a precedenti gravidanze).

La reazione di immunizzazione consiste nell'attivazione del sistema immunitario nei confronti di antigeni presenti sulle emazie del donatore, non riconosciuti come propri, poiché differenti rispetto all'assetto antigenico dei globuli rossi del ricevente. E' possibile comprendere come questa complicanza nasca dalla diversità antigenica tra il donatore e il ricevente e che la specificità di un alloanticorpo in una determinata popolazione dipenda proprio dal profilo antigenico della suddetta popolazione. Ne consegue che, nel momento in cui sussiste un'elevata omogeneità tra donatori e riceventi, il tasso di alloimmunizzazione risulta basso. "I dati relativi alla percentuale di alloimmunizzazione di popolazioni omogenee in Italia e in Grecia mostrano una quantità di casi pari al 5%-10%. Un indice più elevato, pari al 20,8% è stato identificato in Asia."<sup>2</sup> (Sylvia T. Singer et al., «*Alloimmunization and Erythrocyte Autoimmunization in Transfusion-*

*Dependent Thalassemia Patients of Predominantly Asian Descent.*»), poiché la maggior parte dei donatori appartiene alla popolazione Europea e i pazienti risultano prevalentemente Asiatici, tale per cui è facile comprendere la ragione dell'elevato tasso di immunizzazione, in seguito ad una differenza antigenica così significativa.

La maggior parte degli antigeni descritti in letteratura<sup>3</sup> come “ clinicamente significativi ” riflettono dei polimorfismi a singolo amminoacido tra donatore e ricevente, mentre taluni altri presentano multiple differenze amminoacidiche, che possono essere rilevate tra i donatori ed essere assenti nei riceventi o viceversa. In particolare il sistema RhD e RhCE offre una vasta gamma di varianti antigeniche osservabili in numero molto differente tra la popolazione di discendenza Europea e quella di discendenza Africana. Nella popolazione di discendenza Europea le varianti antigeniche del sistema RhD e RhCE sono state riscontrate in numero molto limitato: “ da <1% sino al 2% ”<sup>3</sup> (Stella T. Chou « *Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act.* »). Al contrario, nella popolazione di discendenza Africana le varianti antigeniche sono state identificate in numero molto più abbondante. Queste varianti codificano per antigeni alterati, che spesso sono responsabili di complesse alloimmunizzazioni Rh in pazienti SCD, a causa della somministrazione di antigeni convenzionali. Di seguito a queste scoperte, negli ultimi anni è stata posta una particolare attenzione, nel corso delle pratiche trasfusionali, sulle varianti antigeniche collegate alla diversa origine etnica di donatori e pazienti, cercando, nel limite del possibile, di rispettare la corrispondenza etnica delle unità ematiche.

L'effetto concreto dell'alloimmunizzazione è determinato dalla produzione di alloanticorpi irregolari diretti verso antigeni estranei. Si definiscono quindi “alloanticorpi irregolari” tutti quegli anticorpi diretti contro antigeni eritrocitari, ad eccezione degli anticorpi naturali anti-A ed anti-B.

Ulteriori fattori che possono concorrere allo sviluppo di tale fenomeno sono:

- ✓ L'assetto immunologico del paziente e l'eventuale patologia di base, che verosimilmente possono favorire l'insorgenza di anticorpi antieritrocitari.

Soggetti con una buona condizione di salute presentano un rischio minore di sviluppare un'alloimmunizzazione rispetto a pazienti in stato infiammatorio o affetti da condizioni patologiche al momento della trasfusione, quali: sindrome toracica, infezione virale o disordini infiammatori. Altre popolazioni ad elevato pericolo sono i pazienti mielodisplastici, talassemici, falcemici e affetti da patologie autoimmuni. I pazienti mielodisplastici che non stanno affrontando una cura chemioterapica sono soggetti ad un rischio di alloimmunizzazione più alto rispetto ad altri pazienti in ciclo chemioterapico immunosoppressivo. Gli individui colpiti da patologie autoimmuni, quali: Lupus Eritematoso e Artrite Reumatoide presentano un rischio relativamente alto, dal momento che le trasfusioni in questo ambito clinico, in alcune realtà ospedaliere, non sono amministrate nella maniera corretta. Pazienti con diagnosi di Morbo di Chron o ulcere hanno un pericolo alto rispetto alla popolazione generale, mentre individui che subiscono terapie immunosoppressive ne registrano un calo.<sup>4</sup>

Nello studio di Jariwala K., Mishra K. e Ghosh K. "*Comparative study of alloimmunization against red cell antigens in sickle cell disease & thalassaemia major patients on regular red cell transfusion.*"<sup>5</sup> viene espressa una percentuale di alloimmunizzazione nei pazienti falcemici nove volte superiore rispetto ai pazienti affetti da Talassemia Major. È largamente espresso in letteratura che i pazienti falcemici presentano il tasso di alloimmunizzazione più alto dell'intera popolazione. Questo può essere ricondotto all'elevato numero di trasfusioni effettuate nel corso della loro vita e alle varianti del sistema Rh riscontrate nei soggetti di discendenza Africana, che sviluppano frequentemente questa malattia.

- ✓ Le caratteristiche dell'antigene eritrocitario, tra cui la capacità immunogenica. "L'immunogenicità è il termine usato per indicare la capacità di un antigene di stimolare la produzione del corrispondente

anticorpo in una persona che manchi dell'antigene.” (Ortho Diagnostic System S.p.a. “*Antigeni e anticorpi gruppo ematici.*”).

La superficie del globulo rosso risulta ricoperta da numerosi antigeni (zuccheri e proteine) saldamente ancorati alle proteine e ai lipidi di membrana.

L'importanza clinica di questi antigeni, nei riguardi di una trasfusione ematica o di un trapianto tissutale/d'organo risiede nella capacità di tali molecole di scatenare una risposta immunitaria, inoltre l'estrema variabilità del grado di immunogenicità deve essere considerata con riguardo in un ambito pre-trasfusionale. I carboidrati generalmente attivano una risposta immunitaria timo-indipendente, ove gli antigeni stimolano direttamente i linfociti B, i quali, senza l'aiuto dei linfociti T helper, sono i responsabili della sintesi di anticorpi di classe IgM, reattivi a 22°C. Alcuni soggetti possono non presentare sulla superficie dei propri globuli rossi alcuni antigeni carboidratici, motivo per cui possono incorrere nello sviluppo di anticorpi di classe IgM definiti come “naturali”, probabilmente sintetizzati in seguito alla stimolazione ambientale da parte di antigeni batterici. Tra gli antigeni di natura carboidratica più rilevanti, ai fini della pratica trasfusionale, vengono descritti gli antigeni A e B, i quali sviluppano naturalmente, nei soggetti che non li presentano, anticorpi anti-A e/o anti-B di classe IgM. Essi sono peraltro molto pericolosi, poiché sono stati riscontrati in numerose reazioni immediate e severe di emolisi intravascolare, di seguito a incompatibilità ematica. Gli antigeni proteici, al contrario, possiedono la peculiarità di poter stimolare una risposta immunitaria timo-dipendente, con la conseguente produzione di anticorpi di classe IgG, reattivi a 37°C. Tali anticorpi sono stati descritti nel corso di differenti reazioni di clearance extra vascolare delle cellule positive per il suddetto antigene e in episodi di malattia emolitica neonatale, per via della loro capacità di poter attraversare la placenta.

Gli antigeni maggiormente immunogeni, in accordo con gli studi ritrovati in letteratura, sono quelli del sistema Rh e del sistema Kell. In

ordine di immunogenicità decrescente si evidenziano: “D>K>c>E>C>e”<sup>6</sup>. (Raj Nath Makrool et al. “*Rh and Kell phenotype matched blood versus randomly selected and conventionally cross matched blood on incidence of alloimmunization.*”).

Inoltre alcuni antigeni sono espressi ad “alta densità” sulla superficie delle emazie, mentre altri antigeni mostrano il cosiddetto “effetto dose”, che determina una maggior quantità di antigene in omozigosi, rispetto all’eterozigosi. Gli antigeni espressi ad alta densità potrebbero essere meno immunogeni rispetto a quelli a densità moderata e gli antigeni a bassa densità mostrano livelli di immunogenicità molto bassa. Alcuni antigeni si sviluppano molto rapidamente già dalla tenera età, mentre altri necessitano alcuni anni per la loro completa sintesi e maturazione, questa caratteristica si può evincere nel corso della determinazione del gruppo sanguigno dei neonati.

- ✓ La quantità di emazie trasfuse e il tempo di esposizione antigenica. In accordo con quanto riportato nello studio di Nevia Arreghini et al. “*IAT e DAT in una popolazione di pazienti trasfusi.*”<sup>7</sup> effettuato presso il Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale di Venezia: “è possibile immunizzare un ricevente trasfondendo emoderivati contenenti almeno cinque millilitri di emazie”<sup>7</sup>.

Come è emerso da molteplici studi<sup>5-14</sup>, i pazienti sottoposti a regime trasfusionale cronico, come ad esempio pazienti affetti da emoglobinopatie (Anemia Falciforme e Talassemia) sono soggetti ad uno sviluppo molto più frequente di alloanticorpi antieritrocitari, rispetto a quei pazienti che ricevono trasfusioni isolate. Di seguito alla trasfusione di molteplici unità di emazie risulta possibile e non rara la possibilità di identificare un’alloimmunizzazione diretta contro più di un antigene gruppo ematico eritrocitario.<sup>7</sup>

L’articolo di Raj Nath Makrool et al. “*Rh and Kell phenotype blood versus randomly selected and conventionally cross matched blood on incidence of alloimmunization.*”<sup>6</sup> riporta dei dati che descrivono una frequenza di alloimmunizzazione mondiale. In accordo con



l'omogeneità tra donatore e ricevente, con l'età di trasfusione e con la tipizzazione delle unità di emazie, il tasso di alloimmunizzazione è identificato da un range ampio, che parte da un minimo del 3%, fino ad massimo del 50%. Lo studio prosegue descrivendo anche dei dati registrati in vari stati: la percentuale riportata in Danimarca è del 1,35%, negli USA: 0,3/2% e in Germania: 0,78%. In seguito, vengono esposti diversi studi: il primo si riferisce alla ricerca svolta allo scopo di pubblicare tale articolo, dove si apprende come, dall'osservazione di 500 pazienti, solo uno di loro abbia sviluppato un alloanticorpo a 4 settimane dall'episodio trasfusionale. La percentuale risulta del 0,2%, in comparazione al 0,46% e al 3% riportato da alcuni studi pubblicati circa episodi di trasfusioni episodiche. La seconda ricerca presentata invece è stata effettuata da Ko et al. In questo caso sono stati passati al vaglio 22463 pazienti chirurgici per la durata di due anni, riscontrando la quota di 340 alloimmunizzati. Per ultimo lo studio retrospettivo della durata di 20 anni di Schonewille et al. ha registrato una percentuale di alloimmunizzazione tra l'1% e il 10% in una popolazione di 653 pazienti accidentalmente trasfusi.

- ✓ L'età delle prima trasfusione ricevuta. Trasfusioni effettuate nei primi anni di vita possono sviluppare immuno-tolleranze verso gli antigeni ricevuti, tali da non sviluppare alcuna immunizzazione.<sup>2</sup>

Un fattore da prendere in considerazione in corso di valutazione circa l'alloimmunizzazione antieritrocitaria è la frequenza con cui un antigene si ritrova nella popolazione. Se un solo individuo su migliaia non possiede un determinato antigene, pur essendo un potente immunogeno, esso non costituirà mai un rischio per l'intera popolazione. Qualora invece si tratti di un antigene largamente diffuso nella comunità, esso rappresenta una problematica per quei rari soggetti che ne sono sprovvisti.

Negli ultimi anni è stato osservato un allungamento dell'aspettativa di vita, che ha incrementato considerevolmente il numero di pazienti recanti una patologia degenerativa. Contemporaneamente, le tecniche chirurgiche hanno visto rapidamente accrescere la loro complessità. In un panorama di

invecchiamento della popolazione e progresso scientifico-tecnologico, le richieste di trasfusioni ematiche hanno avuto una veloce impennata, aumentando anche il rischio di sviluppare alloanticorpi.

Oggi giorno, i test pre-trasfusionali di ricerca di anticorpi irregolari e di *Crossmatch* sono diventati esami routinari di massima importanza, senza i quali non è possibile assegnare alcuna unità di sangue. La ricerca di anticorpi irregolari è chiamata: *Test di Coombs Indiretto*. Si tratta di un primo screening effettuato sul plasma del paziente con lo scopo di segnalare la presenza o l'assenza di anticorpi antieritrocitari clinicamente significativi. Il *Crossmatch* invece risulta essere un controllo finale che delibera (in caso di negatività) la somministrazione delle unità assegnate, dal momento che esso consente l'identificazione di anticorpi a bassa incidenza. È fondamentale rilevare la presenza di alloanticorpi irregolari allo scopo di definire la necessità di ricercare e testare delle unità di emazie concentrate, non recanti il suddetto antigene. Si tratta di un'attività che impegna tempo, personale e alcune volte può comportare anche un ritardo nel trattamento trasfusionale.

Il significato di un alloanticorpo diventa " clinicamente rilevante " quando esso è in grado di ridurre la sopravvivenza delle emazie trasfuse o quando si trova implicato in casi di malattia emolitica del feto e del neonato (MEFN). Di seguito all'identificazione di un alloanticorpo risulta fondamentale stabilire qual è il suo significato clinico, attraverso una tipizzazione: gli anticorpi reattivi a 37°C sono potenzialmente " clinicamente significativi ", poiché possono causare reazioni emolitiche nei pazienti trasfusi, nel feto o nel neonato, mentre quelli reattivi a temperatura ambiente o a temperature inferiori, generalmente non lo sono.

Un ulteriore aspetto dell'alloimmunizzazione, oggetto di recenti discussioni e relativi studi è il tempo di comparsa e il tempo di scomparsa degli alloanticorpi. Il tempo di sintesi di un anticorpo può variare da un minimo " di tre giorni sino a 97 giorni " <sup>8</sup> (Vitor Mendonça Alves et al. «*Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study.*»). La scomparsa degli anticorpi invece è un fattore

fondamentale in ambito trasfusionale, poiché il fatto che un alloanticorpo possa scendere al di sotto del limite di rilevabilità, può essere pericoloso in termini di incompatibilità e reazioni emolitiche trasfusionali. In accordo con gli studi pubblicati<sup>4</sup> vengono classificati come alloanticorpi a più alto tasso di scomparsa: anti-Kidd/ Lutheran/ Kell, mentre sembra che gli antigeni del sistema Rh (in particolare D e c) siano associati a risposte immunitarie più durature, che inducono una permanenza degli anticorpi più lunga. In seguito alla definizione dei vari tassi di scomparsa, è importante definire come gli alloanticorpi possano sparire molto velocemente, dopo la loro induzione iniziale. Alcuni non vengono più rilevati dopo un solo mese, mentre, in certi casi, se la risposta immunitaria è più forte alcuni alloanticorpi possono essere rilevati anche dopo anni, con una discesa del titolo anticorpale graduale.<sup>4-8</sup>

Recentemente, attraverso alcune ricerche<sup>4</sup>, sono stati individuati ulteriori fattori presumibilmente coinvolti nell'insorgenza dell'alloimmunizzazione. I primi riguardano le unità di emazie concentrate: è stato evidenziato come ogni unità di globuli rossi trasfusa contenga al suo interno un numero variabile di globuli bianchi (WBC), piastrine (PLT) e microparticelle. La discussione è stata sollevata in merito alla probabilità che i globuli bianchi, le particelle da essi prodotte (quali: citochine e DAMPS), le microparticelle e le piastrine potrebbero influire sul rischio di alloimmunizzazione, in seguito alla stimolazione del sistema immunitario. Allo stesso modo, la durata della conservazione delle unità risulta sotto inchiesta. I Centri Trasfusionali si interrogano se la trasfusione di unità vicine alla data di scadenza possa determinare un fattore di rischio verso un'immunizzazione. È stato dimostrato come unità prossime alla scadenza incrementino l'emolisi extra vascolare, il valore della transferrina e il tasso di ferro libero circolante. Sono stati condotti molti studi, ma ad oggi non si possiedono ancora conferme definitive su questa ipotesi. Ulteriori fattori riguardano i donatori di sangue. Nuovi studi hanno mostrato come i globuli rossi degli uomini siano più suscettibili a fragilità osmotica, emolisi ossidativa e degenerazione durante la conservazione rispetto ai globuli rossi delle donne.

Nelle principali ricerche immunoematologiche pubblicate, precedentemente citate, gli alloanticorpi rilevati, in termini di frequenza e di importanza clinica, sono prevalentemente diretti contro antigeni del sistema Rh (D,E,C), Kell, Duffy, Lewis e MNS.

Dai Centri Trasfusionali giunge un dato molto positivo: dal secolo scorso ad oggi, il tasso di alloimmunizzazione è considerevolmente calato, forse in risposta ad una diffusione della tipizzazione del fenotipo Rh del donatore e del ricevente e all'introduzione di sistemi di identificazione degli anticorpi irregolari più sensibili e capaci di rintracciare un maggior numero di anticorpi.

Lo studio di Vitor Mendonça Alves et al. "*Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study.*"<sup>8</sup> espone uno studio effettuato in Brasile, tra luglio 2018 e marzo 2010 su 143 pazienti chirurgici o su soggetti in stato di emergenza clinica afferenti presso: Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Triângulo Mineiro. I risultati indicano che dei 143 pazienti, in precedenza risultati negativi alla ricerca anticorpi irregolari, 15 hanno sviluppato alloanticorpi in seguito alla trasfusione ematica ricevuta. Di questi 15 pazienti, 4 presentano un anticorpo anti-K, 3 presentano anticorpi rivolti verso differenti antigeni Rh, uno presenta anticorpi rivolti verso diversi antigeni del sistema Rh, Kell e Lewis e un ultimo caso è stato refertato come: multipli anticorpi non identificabili. Dalle informazioni ricavate è stato possibile trarre delle conclusioni: in primo luogo è stato definito come ad un elevato numero di trasfusioni corrisponda un tasso di alloimmunizzazione più alto. In seguito è stato osservato come il 13,33% dei pazienti con una pregressa storia trasfusionale, abbia poi sintetizzato alloanticorpi. Questi individui, nonostante avessero dimostrato una negatività alla ricerca anticorpi irregolari, potrebbero essere andati incontro ad una seconda risposta immunitaria verso gli antigeni eritrocitari. Come accade nel caso di pregresse gravidanze, non è da escludere la possibilità che la prima sensibilizzazione fosse avvenuta al contatto con il sangue fetale. Molteplici anticorpi risultano clinicamente significativi e sono indirizzati contro

antigeni del sistema Rh e Kell. Tali alloanticorpi non risultano comunque a titolo elevato e non sono stati più rilevabili dopo 15 mesi dall'episodio trasfusionale. Non sono state riscontrate differenze importanti nel tasso di alloimmunizzazione per quanto concerne età, sesso, etnia, gruppo ABO o patologia.

Inoltre la casistica proposta dallo studio di Nevia Arreghini et al. "*IAT e DAT in una popolazione di pazienti trasfusi*"<sup>7</sup> effettuato presso il Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale di Venezia e presentante come oggetto di ricerca 18783 pazienti trasfusi presso il SIT di Mestre, riferisce una frequenza di alloimmunizzazione stimata attorno al 1,5%.

Come descritto in letteratura<sup>8-10</sup> le immunizzazioni più frequentemente identificate permangono quelle del sesso femminile, a causa della importante sensibilizzazione a cui le donne sono sottoposte nel corso della gravidanza. Lo sviluppo di anticorpi nel plasma avviene in seguito al contatto del sangue fetale, incompatibile con quello materno. La problematica risiede nella capacità di tali alloanticorpi di attraversare la placenta e causare reazioni emolitiche nel feto e/o soppressione dell'eritropoiesi fetale. L'alloimmunizzazione più frequente, per la quale viene effettuata una profilassi nelle madri a rischio, resta quella contro l'antigene D. In aggiunta, sono state identificati casi di alloanticorpi di interesse gestazionale, quali: "anti-C/c, anti-E/e, anti-Kell, anti-Duffy, anti-Kidd, anti-MNS."<sup>4</sup> (Christopher A. Tormey et al. "*Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences.*").

Ogni Centro Trasfusionale è tenuto a seguire le disposizioni definite dal proprio Primario, in accordo con la casistica analizzata sul territorio di competenza. Per quanto concerne i suggerimenti ritrovati nei recenti studi pubblicati<sup>9</sup>, viene consigliato di assegnare le unità di emazie concentrate rispettando la tipizzazione dei principali antigeni immunogeni dei sistemi Rh e Kell e dei sistemi minori, quali: Kidd, Duffy e MNS. Tale disposizione è principalmente riferita a pazienti affetti da patologie croniche (ad esempio affetti da SCD), sottoposti a regime trasfusionale cronico.

Negli articoli consultati<sup>3-4</sup> viene ampiamente trattata l'innovazione della genotipizzazione, considerata, negli ultimi anni, come maggiormente accurata rispetto alla fenotipizzazione sierologica e come guida trasfusionale per la terapia di pazienti affetti da SCD. Anche i pazienti mielodisplastici e talassemici, soggetti ad un elevato rischio di immunizzazione, vengono diretti ad una genotipizzazione con scopo profilattico. Questa tecnica ha dimostrato l'elevato numero di polimorfismi tra i diversi alleli codificanti gli antigeni ematici, spiegando come sia complesso il processo di prevenzione dell'alloimmunizzazione trasfusionale.

### **3.2-IL SISTEMA IMMUNITARIO E LE SUE COMPONENTI**

Il sistema immunitario è una difesa naturale e altamente sofisticata, il cui scopo consiste nel proteggere il corpo umano da agenti patogeni. Possiede la caratteristica di riconoscere e discriminare molecole appartenenti al corpo umano, definite: "self", da sostanze estranee, poiché provenienti dall'esterno, chiamate: "non self".

Questa distinzione permette al sistema immunitario di proteggere l'individuo, attivando una difesa immunitaria nel momento in cui egli viene a contatto e riconosce una sostanza "non self". Gli agenti in questione possono comprendere: virus, batteri, cellule anormali (tumorali) ecc.

Una volta riconosciuti tali agenti come estranei, il sistema immunitario mette in moto un complesso meccanismo, che racchiude al suo interno diversi attori preposti alla distruzione degli agenti nocivi e inoltre attiva una risposta infiammatoria volta ad accelerare la guarigione.

I due principali meccanismi di difesa sono:

→l'immunità innata

→l'immunità adattativa

*L'immunità innata*, detta anche naturale o nativa, è la prima barriera che protegge l'uomo da patogeni esterni, agisce in modo aspecifico, indiscriminato, poiché riconosce un repertorio di antigeni limitato e risulta la tipologia di immunità evolutivamente più antica. Il compito dell'immunità nativa è quello di bloccare l'ingresso di agenti patogeni e nel

caso in cui questi siano riusciti a penetrare, si occupa di eliminarli il più rapidamente possibile. Gli attori dell'immunità innata sono: le barriere anatomiche, quali la cute e le mucose, che impediscono fisicamente l'entrata e le difese aspecifiche: si tratta di cellule e sostanze (cellule dendritiche, macrofagi, cellule natural killer, complemento e citochine) che distruggono in maniera indiscriminata ogni elemento estraneo. In conclusione, l'immunità naturale pone il corpo in una condizione generale di allarme e favorisce l'attivazione dell'immunità adattativa.

*L'immunità adattativa*, detta anche acquisita o specifica, si sviluppa più lentamente e produce una risposta immunitaria più specifica, mirata ed efficace, poiché è capace di riconoscere qualunque forma di antigene. I protagonisti dell'immunità adattativa sono i linfociti, i quali presentano sulla loro membrana dei recettori utilizzati per riconoscere le sostanze estranee ("non self"). Al momento del contatto tra l'antigene e il recettore, il linfocita si attiva e inizia a dividersi producendo un clone di cellule, ripartite in due gruppi:

→ *Cellule effettrici*: maturano rapidamente ed esplicano la loro azione solo per un periodo limitato, che corrisponde alla durata dell'infezione. Entrano in azione per prime, nel corso della "risposta immunitaria primaria", con lo scopo di eradicare subito il contagio.

→ *Cellule della memoria*: sono longeve e permangono nell'individuo per molto tempo. Vengono attivate in seguito a successive infezioni, da quella che viene chiamata: "risposta immunitaria secondaria". Grazie al clone di cellule della memoria, ogni qual volta si ripresenti il medesimo antigene, esse possono riconoscerlo e in breve tempo (normalmente minore rispetto al primo incontro) possono moltiplicarsi producendo un clone di cellule effettrici e un secondo clone di cellule della memoria, conseguendo ad un'eradicazione del patogeno.

I linfociti vengono poi distinti in sottopopolazioni dotate di funzioni diverse e specifiche:

→ *Linfociti B*: nascono e maturano nel midollo osseo e si differenziano in cellule effettrici: le plasmacellule, che producono e secernono gli anticorpi

(immunoglobuline) e le cellule della memoria. Costituiscono quella tipologia di immunità definita come “*umorale*”.

→ *Linfociti T*: hanno origine nel midollo osseo e maturano successivamente nel timo. Rappresentano l’immunità “*cellulo-mediata*”, in quanto attaccano fisicamente gli elementi patogeni esterni al corpo o le cellule tumorali. Si distinguono ancora a loro volta in linfociti T helper, i quali possiedono il ruolo di regolare il sistema immunitario e linfociti T citotossici, che degradano direttamente le sostanze nocive.

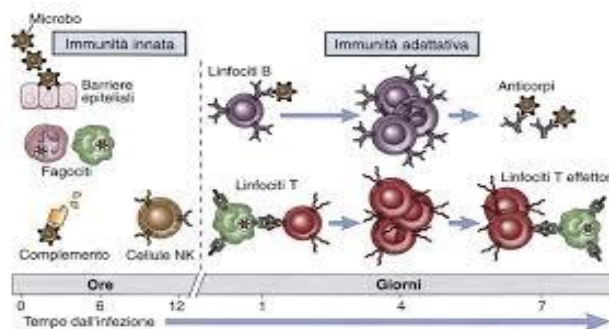


Figura 7: Rappresentazione temporale dell’attività del sistema immunitario nel corso di un’infezione.

### 3.3-GLI ANTICORPI

Gli anticorpi prodotti dalle plasmacellule sono chiamati anche “*immunoglobuline*”. Si tratta di molecole proteiche formate da quattro catene polipeptidiche, ciascuna delle quali contiene una porzione variabile e una porzione costante: due catene pesanti uguali fra loro e due catene leggere anch’esse identiche. Presentano una tipica conformazione a Y.

Ogni anticorpo contiene due siti di legame per l’antigene, identici tra di loro e può legare un’ampia varietà di antigeni. La porzione di antigene che l’anticorpo riconosce e lega è chiamato “*epitopo*” o “*determinante antigenico*”.

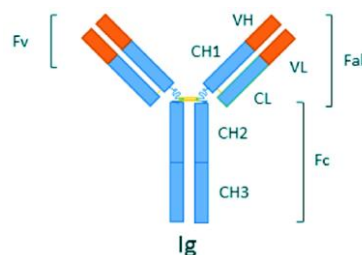


Figura 8: Rappresentazione schematica di un anticorpo.



In base alla catena pesante presente gli anticorpi sono classificati in classi o isotipi:

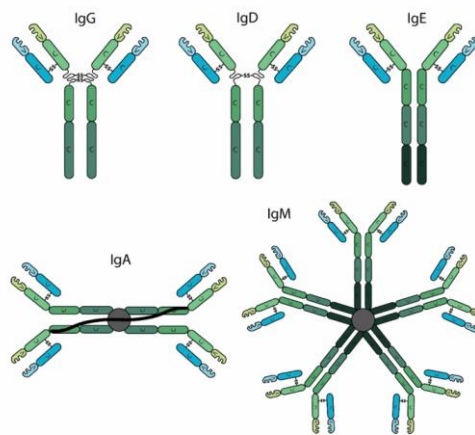
IgM: molecole pentameriche. Possiedono attività recettoriale per l'antigene dei linfociti B naïve e attivano il sistema del complemento.

IgG: molecole monomeriche. Attivano il sistema del complemento, manifestano l'attività citotossica mediata da anticorpi e potendo attraversare la placenta sono responsabili di malattie emolitiche neonatali.

IgD: molecole adese alla membrana dei linfociti B naïve con attività recettoriale.

IgA: molecole monomeriche o dimeriche preposte all'immunità mucosale.

IgE: molecole monomeriche secrete in seguito a reazioni allergiche o infezioni parassitarie.



*Figura 9: Rappresentazione schematica delle varie classi anticorpali.*

Gli anticorpi antieritrocitari sono prodotti nel momento in cui sussiste una stimolazione antigenica, rappresentata da eventi trasfusionali o gravidanze. Nel primo caso, le unità trasfuse presentano determinanti antigenici differenti rispetto all'assetto antigenico del ricevente. Nel secondo caso, si osserva un passaggio placentare di emazie fetto-materne che possono stimolare il sistema immunitario.

Gli anticorpi coinvolti sono nella maggior parte dei casi: IgM e IgG e in minima misura anche IgA.

Essi vengono ancora distinti sulla base della temperatura di reazione. Gli anticorpi che presentano un optimum termico di reazione a temperatura

ambiente sono definiti: freddi e nella maggior parte dei casi sono IgM, ma possono presentarsi anche IgG. Gli anticorpi caldi, al contrario, reagiscono contro l'antigene ad un optimum termico di 37°C e per la maggior parte sono IgG, con rari casi di IgM.

Un'ulteriore suddivisione viene poi effettuata sulla base della capacità degli anticorpi di agglutinare sospensioni di globuli rossi, in vitro. Sono definiti completi quegli anticorpi in grado di agglutinare globuli rossi recanti i rispettivi antigeni, mentre sono incompleti quegli anticorpi che non effettuano alcuna agglutinazione.

Al momento della prima esposizione verso un antigene eritrocitario non proprio, il processo di riconoscimento di tale molecola, come estranea, è complesso, lento. La produzione di anticorpi, nei confronti di tale antigene, può manifestarsi anche dopo 2/6 mesi e prende il nome di "*risposta primaria*". Nel caso in cui invece una persona abbia già avuto un primo contatto con questo antigene, a prescindere dalla presenza o meno di anticorpi, nel momento in cui essa è esposta nuovamente alla stessa molecola, il sistema immunitario produrrà una notevole quantità di anticorpo, rilevabile dopo poche ore, giorni o al massimo settimane. Questa risposta prende il nome di "*risposta secondaria*" o "*della memoria*".

Una differenza tra queste due risposte, oltre che per le tempistiche e per le quantità di anticorpi prodotti, risiede nella classe di immunoglobuline sintetizzate. La risposta primaria si contraddistingue per la sintesi di IgM, mentre nella secondaria prevalgono le IgG. Non esistono poi solo ed esclusivamente anticorpi prodotti dalla stimolazione antigenica propriamente detta (esempio: trasfusione ematica), ma, in natura, sono state identificate strutture che possono mimare gli antigeni gruppo ematici, favorendo in questo modo la produzione di anticorpi "naturali". Normalmente seguono una risposta primaria, motivo per cui si tratta di IgM.

### **3.4-LA REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO**

La reazione antigene-anticorpo è il nodo cruciale di tutta la diagnostica immunoematologica. Il legame tra gli antigeni eritrocitari ed i rispettivi

anticorpi può determinare diversi fenomeni: sensibilizzazione, inibizione o neutralizzazione, fissazione del complemento, emolisi, agglutinazione e precipitazione.

**La sensibilizzazione:** consiste nella reazione tra un determinante antigenico, esposto sulla membrana eritrocitaria e l'anticorpo complementare, per mezzo di forze non covalenti.

**L'inibizione o neutralizzazione:** consiste nell'inibizione della reazione di agglutinazione da parte di antigeni solubili.

**Fissazione del complemento:** la reazione di fissazione del complemento viene eseguita unendo al siero del paziente un sistema composto da globuli rossi di pecora e emolisine anti-pecora. L'osservazione di emolisi rivela la presenza del complemento nel campione, mentre l'assenza di emolisi indica che, verosimilmente, il complemento è stato totalmente consumato dalla fissazione ai complessi antigene-anticorpo. Questo fenomeno viene largamente impiegato per mostrare la presenza di attività immunologiche in grado di fissare il complemento.

**La precipitazione:** consiste nella formazione di un complesso insolubile, determinato dal legame tra una antigene solubile e il rispettivo anticorpo solubile. Affinché la reazione possa esplicarsi è necessario che le due componenti siano presenti in proporzione ottimale. Generalmente questo fenomeno è visibile nei test in provetta e appare come un sedimento o un anello.

**L'agglutinazione:** viene definita in questo caso specifico come *emoagglutinazione* e consiste nell'aggregazione di globuli rossi per mezzo di anticorpi (agglutinine) che legano specifici determinanti antigenici (agglutinogeni), espressi sulla membrana eritrocitaria. Si tratta di una reazione chimica reversibile definita in due fasi: la prima è la sensibilizzazione, durante la quale avviene l'attacco degli anticorpi agli antigeni espressi sulla membrana eritrocitaria e successivamente si osserva la creazione di ponti tra i diversi eritrociti sensibilizzati, al fine di formare un reticolo, che determina visibilmente l'agglutinato. Tale reazione è sfruttata nelle metodiche di diagnostica immunoematologica che impiegano

emazie e anticorpi. Essa infatti consente di mostrare il legame tra anticorpi diretti contro antigeni eritrocitari e i globuli rossi che presentano gli antigeni in questione.

Queste reazioni sono finalizzate ai seguenti scopi:

→Conoscere gli antigeni presenti sui globuli rossi: tipizzazione dei globuli rossi.

→Ricerca anticorpi antieritrocitari in un paziente in attesa di trasfusione di sangue, con lo scopo di prevenire gravi reazioni trasfusionali.

Gli agglutinati formati potranno presentarsi con differenti dimensioni: da chiaramente visibili ad occhio nudo, sia in provetta che su vetrino, a visibili solo al microscopio ottico. Le dimensioni degli agglutinati dipenderanno dal numero di legami formati tra gli anticorpi e le cellule. Nel caso delle agglutinazioni per la determinazione del gruppo ABO la reazione sarà osservabile facilmente ad occhio nudo, dato il numero importante di antigeni A e B presenti sulla membrana del globulo rosso e le dimensioni degli anticorpi (IgM), che possono fare da ponte tra i molteplici globuli rossi.

In alternativa nei laboratori di Immunoematologia vengono utilizzate delle schedine, al cui interno sono presenti micro colonne di gel o di microsfere, che permettono di rilevare in modo semplice ed evidente l'agglutinazione. La reazione tra le emazie e il plasma del paziente avviene esattamente al di sopra della colonna di gel. La schedina viene poi centrifugata e in seguito si determina la positività o la negatività del test: se vi sono delle cellule agglutinate, queste non riescono a passare le maglie di gel, rimanendo quindi stratificate sopra la colonnina o intrappolate al loro interno. In caso di negatività le cellule libere sedimentano sul fondo.

L'intensità della reazione è variamente graduata ed è universalmente riconosciuto il sistema della AABO:

4+: aggregato solido, senza cellule libere e surnatante limpido.

3+: numerosi grossi aggregati, con poche cellule libere e surnatante limpido.

2+: aggregati di grandezza media, con alcune cellule libere e surnatante limpido.

1+: piccoli aggregati appena visibili, con molte cellule libere visibili e surnatante torbido, rossastro.

W+: reazione debole (W) con tenui aggregati di tipo pulverulento, molte cellule e surnatante torbido, rossastro.

MF: campi misti (mixed field), pochi aggregati, molte cellule libere e surnatante rosso.

0: negativo, assenza di aggregati e surnatante rosso per la sospensione di cellule libere.

**L'emolisi:** consiste nella rottura dei globuli rossi con conseguente rilascio dell'emoglobina. Nei test eseguiti al fine di identificare gli anticorpi antieritrocitari, l'emolisi ne identifica la positività, perché determina l'unione dell'antigene con l'anticorpo e di seguito la rispettiva attivazione della cascata del complemento.

## **CAPITOLO IV, GESTIONE DELLE RICHIESTE TRASFUSIONALI**

Secondo la normativa vigente<sup>1</sup>, al fine della gestione delle richieste trasfusionali, il Centro Trasfusionale deve attenersi ad uno specifico protocollo.

Tale protocollo inizia con la compilazione di una richiesta da parte del medico richiedente l'emocomponente. "La richiesta deve essere compilata su apposito modulo fornito dal servizio trasfusionale, approvato dal Comitato Ospedaliero per il buon uso del sangue e dalla direzione sanitaria aziendale/ospedaliera, ovvero su carta intestata del medico richiedente in caso di paziente domiciliare, o su carta intestata della struttura sanitaria di degenza del ricevente. Può essere trasmessa per via elettronica, secondo specifiche procedure definite dal servizio trasfusionale, condivise con le strutture di ricovero e la direzione sanitaria. Se la richiesta in formato elettronico non prevede l'apposizione della firma elettronica digitale valida ai sensi di legge, essa deve essere comunque seguita, prima della consegna degli emocomponenti, dall'invio di richiesta cartacea firmata dal medico richiedente. Ai fini di garantire la tracciabilità, copia della richiesta di emocomponenti deve essere conservata nella cartella clinica o nella documentazione sanitaria del paziente."<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015).

Tali richieste vengono recapitate presso il Centro Trasfusionale insieme ad una provetta contenente sangue intero del paziente. La richiesta trasfusionale viene quindi accettata da un tecnico sanitario di laboratorio presente al Centro Trasfusionale, il quale procede alla verifica della richiesta inviata. Secondo la normativa vigente<sup>1</sup> essa deve contenere i seguenti dati:

- ✓ Dati anagrafici del paziente (nome, cognome, sesso, data e luogo di nascita).
- ✓ Dati nosologici del paziente (ospedale, reparto, codice identificativo/nosografico).

- ✓ Tipo e quantità/volume di emocomponente richiesto e il suo eventuale trattamento (ad esempio emazie irradiate o standard).
- ✓ Patologia e motivo della richiesta di emocomponenti.
- ✓ Indicazioni alla trasfusione.
- ✓ Grado d'urgenza, alcune richieste infatti sono 'urgenti', per cui il reparto richiede le unità entro un'ora, altre al contrario sono definite 'urgentissime', in questi casi le richieste necessitano della consegna delle unità entro pochissimo tempo, senza attendere l'esito dei test pre-trasfusionali, per il grave pericolo di vita del paziente. In tale circostanza vengono assegnate unità di gruppo 0 Rh negativo (compatibili universalmente), dedicate a tale necessità.
- ✓ Dati di laboratorio essenziali per la valutazione dell'appropriatezza della richiesta e dati di anamnesi immunoematologica (se il paziente ha subito trasfusioni o se la paziente è in stato di gravidanza).
- ✓ Data e ora della richiesta e firma leggibile del medico richiedente e dell'operatore che ha eseguito il prelievo.

La mancanza di uno di questi campi o la sua incompletezza è causa di non idoneità della richiesta. L'incorretta identificazione del paziente o dei campioni ematici è la prima causa di gravi errori correlati ad incompatibilità ABO.

In seguito un dirigente medico del Centro Trasfusionale valuta l'appropriatezza della richiesta trasfusionale secondo i criteri previsti dalle Linee Guida.

Come suddetto, tutte le richieste di emocomponenti devono essere accompagnate da un campione di sangue del paziente. Se il paziente risulta sconosciuto al Centro Trasfusionale, il reparto deve effettuare un ulteriore prelievo ematico, in un momento successivo rispetto al precedente. Su entrambe le provette sarà necessario determinare il gruppo sanguigno, tramite due determinazioni differenti. La doppia determinazione di gruppo è necessaria ai fini della corretta identificazione del paziente.

Le provette dovranno riportare obbligatoriamente: dati anagrafici del paziente (nome, cognome, data di nascita), data del prelievo, reparto e firma

dell'operatore che ha eseguito il prelievo e l'ora. Il tecnico è tenuto a controllare, oltre alla conformità della richiesta, anche che tutti i dati sopraelencati, presenti sulle provette, siano effettivamente riportati correttamente e che corrispondano tra di loro. Se, sia la richiesta, sia i campioni sono conformi, è possibile procedere all'accettazione della richiesta.

Al fine di assegnare al paziente l'emocomponente e consegnare al reparto le unità richieste è necessario prima effettuare dei test pre-trasfusionali, sulla provetta di sangue e sulle sacche da assegnare.

Tali test sono:

- I. *Prima determinazione del gruppo sanguigno (diretta e indiretta) e del sistema Rh(D):* consiste nella determinazione degli antigeni A-B-AB-D adesi ai globuli rossi e degli anticorpi naturali presenti nel plasma del paziente, “eseguita anche nei tempi antecedenti alla richiesta, nel rispetto dei criteri di sicurezza relativi all'identificazione del paziente”<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015). Tale esame viene effettuato ponendo a contatto i globuli rossi del paziente, con anticorpi monoclonali presenti negli anti-sieri (per la prova diretta) e il plasma/siero del paziente con le emazie note, utilizzate come test (per la prova indiretta).
  
- II. *“Controllo del gruppo AB0 (prova diretta) e del sistema Rh (D) sul secondo campione ematico del paziente, prelevato in un momento diverso rispetto al campione utilizzato per la prima determinazione del gruppo sanguigno. Il controllo del gruppo AB0 (prova diretta) e del tipo Rh (D) del ricevente deve essere ripetuto ad ogni richiesta trasfusionale, sul campione ematico che accompagna la richiesta.”*<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015).



I test appena descritti sono fondamentali al fine di determinare il gruppo e in alcuni casi il fenotipo Rh e Kell del paziente, poiché una volta ricavate queste informazioni sarà possibile passare alla ricerca di sacche compatibili. Secondo il protocollo trasfusionale adottato nei Centri Trasfusionali oggetto di studio la compatibilità per il fenotipo esteso Rh (C-c-E-e) e Kell viene rispettato nei seguenti pazienti:

- Pazienti pediatrici
- Donne in età fertile (< 50 anni)
- Uomini < 18 anni
- Pazienti affetti da Emoglobinopatie
- Pazienti affetti da patologie Ematologiche
- Pazienti da sottoporre a trapianto di Midollo od organo solido

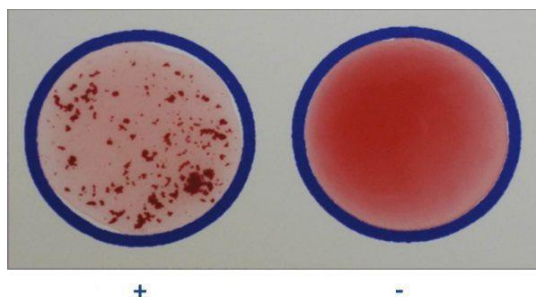
Tale operatività mira al contenimento dell'alloimmunizzazione rispetto a tali antigeni.

III. *Ricerca di alloanticorpi antieritrocitari, Test di Coombs Indiretto (TCI):* consiste nella ricerca di anticorpi irregolari di rilevanza trasfusionale, che non si ritrovano normalmente circolanti nel sangue. Questo esame viene realizzato ponendo il plasma/siero del paziente a contatto con emazie note, usate come test, le quali espongono sulla loro superficie gli antigeni contro cui sono rivolti gli eventuali anticorpi.

Se il risultato del test TCI è negativo si può procedere alla ricerca e alla valutazione di una sacca compatibile per il paziente in carico. La normativa vigente<sup>1</sup> dispone che “in caso di negatività della ricerca di alloanticorpi irregolari antieritrocitari può essere omessa la prova crociata di compatibilità, adottando le procedure di type and screen. Nel caso in cui siano stati rilevati alloanticorpi antieritrocitari, le prove crociate di compatibilità devono essere obbligatoriamente eseguite.”<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015).

Nel caso in cui il TCI risulti positivo al momento della lettura del risultato, l'operatore dovrà procedere all'allestimento di un pannello identificativo contenente, non più tre emazie, bensì undici. Dal risultato finale di tale prova il clinico potrà procedere all'identificazione dell'anticorpo irregolare o degli anticorpi irregolari presenti nel plasma del paziente. La caratterizzazione del/degli anticorpo/i irregolare/i presente/i è fondamentale per poter procedere alla ricerca e all'assegnazione di sacche compatibili, in termini di assenza dell'antigene contro cui è rivolto l'anticorpo identificato, motivo per cui è necessario procedere ad una tipizzazione delle sacche scelte.

- IV. *Prova crociata o prova di compatibilità, "Crossmatch"*: in certi casi (alcune tipologie di pazienti) e sicuramente in caso di positività del TCI, anche solo come dato anamnestico, è necessario assegnare le unità previa esecuzione di prove crociate o prove di compatibilità: Crossmatch. Si tratta di un esame che pone a contatto il plasma del paziente con le emazie delle sacche scelte. Il risultato della prove consente di fare emergere possibili incompatibilità, risultanti dalla presenza di eventuali anticorpi circolanti nel plasma del paziente. Il risultato positivo di tale esame segnala l'avvenuto legame degli antigeni espressi sui globuli rossi dell'unità di emazie concentrate, con gli anticorpi presenti nel plasma del paziente, manifestando quindi l'incompatibilità delle unità testate. Questo risultato blocca di conseguenza il processo di assegnazione delle unità, che non possono essere assolutamente trasfuse e richiede di ricercare all'interno dell'emoteca del Centro Trasfusionale altre sacche compatibili, da sottoporre all'esame Crossmatch. L'interpretazione del risultato di questi test si basa sul medesimo principio: *l'agglutinazione*, ossia il legame che si forma tra antigene e anticorpo. L'avvenuta agglutinazione rappresenta un risultato positivo, poiché attesta la presenza dell'antigene (come nel caso del gruppo diretto) o dell'anticorpo (come nel caso del TCI), mentre l'assenza di agglutinato rimanda ad un risultato negativo del test.



*Figura 10: Rappresentazione della reazione di emoagglutinazione: positiva a sinistra e negativa a destra.*

Alla conclusione dei test pre-trasfusionale, il personale tecnico e medico provvede alla scelta degli emocomponenti. Questi vengono assegnati al ricevente mediante gestionale informatico.

Come indicato dalla normativa vigente<sup>1</sup>: “All’atto della consegna degli emocomponenti, il Servizio Trasfusionale deve applicare una specifica procedura per la verifica dell’identità del ricevente cui sono state assegnate le unità delle quali viene richiesta la consegna. Ogni unità di emocomponenti è accompagnata da apposita modulistica recante le informazioni relative agli emocomponenti consegnati e al ricevente cui gli emocomponenti stessi sono destinati. Su ogni unità di emocomponente assegnata è applicata un’etichetta (etichetta di assegnazione) recante i dati anagrafici del ricevente cui l’emocomponente è destinato, l’attestazione di compatibilità e i dati identificativi dell’emocomponente stesso.”<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015).

In seguito alla trasfusione “la struttura nell’ambito della quale viene effettuata la trasfusione deve far pervenire sistematicamente al servizio trasfusionale la dichiarazione di avvenuta trasfusione e di eventuali reazioni avverse e in caso di reazioni avverse gravi, il servizio trasfusionale assicura le valutazioni, le registrazioni e le notifiche previste dalle normativa vigente.”<sup>1</sup> (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.», 2015).

## **CAPITOLO V, MATERIALI E METODI**

Gli esami effettuati nel corso della stesura di questo elaborato sono stati eseguiti per mezzo di metodiche differenti e due sono le principali: *agglutinazione in schedina e agglutinazione su piastra*.

Il principio alla base di suddetti test permane il medesimo: l'agglutinazione. Questa consiste nel legame tra un antigene, eventualmente presente sulla superficie dei globuli rossi del paziente o delle emazie note, utilizzate come test e un anticorpo, eventualmente presente nel siero del paziente o fornito come anticorpo monoclonale dai reagenti, noti come anti-sieri. L'unica differenza tra le due metodiche è il supporto in cui avviene la reazione, in un primo caso si tratta di schedine a sei micro pozzetti e nel secondo caso di micro piastre a pozzetti multipli.

Gli esami effettuati in schedina possono prevedere, a seconda del test in questione, l'utilizzo di schedine già pre-dispensate con anti-sieri (ad esempio per il gruppo sanguigno o il fenotipo) o schedine in Coombs, nelle cui colonne è dispensato un anti-siero anti IgG o "siero di Coombs", necessario per evidenziare al meglio la reazione antigene-anticorpo. Il siero di Coombs si lega alla reazione antigene-anticorpo creando legami immunologici (ponti) tra le immunoglobuline adese ai globuli rossi, favorendo la creazione del reticolo di agglutinato. In ambe i casi nelle colonne delle suddette schede è sempre presente un mezzo separatore (gel o biglie), che permette di evidenziare l'avvenuta o meno reazione di agglutinazione. Le schedine dispensate devono incubare, se definito dalla procedura, alle temperature e nei tempi indicati e effettuare una centrifugazione necessaria alla lettura dei risultati. La reazione di positività (+) si rileva da una stratificazione degli agglutinati nella porzione superiore del micro pozzetto, che per la loro dimensione non possono superare le maglie del mezzo separatore. La negatività (-) al contrario, si registra da un sedimentamento delle emazie al fondo del pozzetto, poiché i globuli rossi non agglutinati sono liberi di passare attraverso le maglie del mezzo separatore depositandosi al fondo. In base a quanto su detto si evidenziano diversi

gradi di positività: 4+, 3+, 2+, 1+ a seconda della quantità di agglutinati formati.

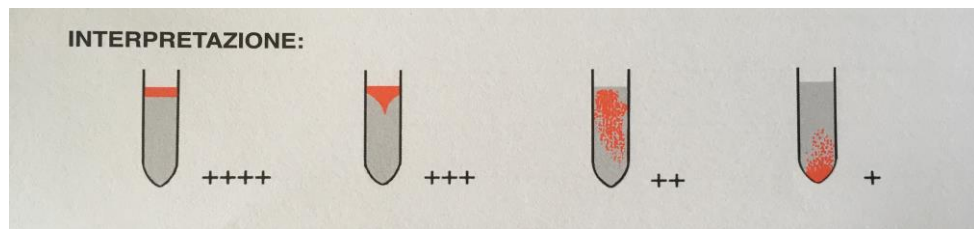


Figura 11: Rappresentazione dei diversi gradi di positività della reazione di agglutinazione in scheda.

Negli esami effettuati in micro piastra, la medesima reazione di agglutinazione avviene nei pozzetti della piastra. In questo caso è possibile impiegare piastre con pozzetti vuoti, piuttosto che contenenti anti-sieri (ad esempio per la determinazione del gruppo sanguigno) o antigeni specifici (ad esempio per l'esame TCI). Indipendentemente da questo punto le piastre devono incubare, se necessario, alle temperature e per i tempi richiesti dalla procedura e effettuare un ciclo di centrifugazione. La positività verrà letta con soli due score: positivo (+) e negativo (-), a seconda della presenza di eventuali agglutinati, le cui modalità di rilevazione sono differenti tra il test di determinazione del gruppo sanguigno e il TCI.

In questo capitolo sono descritte le suddette procedure per ciascun test.

**1.** Determinazione diretta del gruppo sanguigno (A, B, AB, D, 0) con metodica in scheda: si tratta di un test eseguito in schede contenenti al loro interno anticorpi monoclonali specifici contro gli antigeni gruppo ematici A, B e antigene D. Il diluente utilizzato è una soluzione di LISS per la sospensione di emazie, il quale deve essere necessariamente portato a temperatura ambiente prima dell'uso. Tale soluzione ha come funzione principale quella di favorire la reazione attraverso la riduzione della forza ionica della soluzione di emazie e anticorpo. I campioni necessari a questa indagine contengono sangue intero. Normalmente vengono inviati presso il Centro Trasfusionale provette tappo viola contenenti sangue intero a contatto con l'anticoagulante EDTA, le quali vengono successivamente centrifugate a

5000 giri per 5 minuti al fine di sperare emazie e plasma. La procedura prevede l'allestimento (manuale se l'operatore decide di effettuare manualmente la metodica o eseguita automaticamente dallo strumento) di una provetta per la sospensione delle emazie, la quale viene realizzata unendo diluente LISS a sangue intero oppure sedimento. Una parte di tale sospensione si pipetta poi nei pozzetti della schedina, quest'ultima viene poi posta a centrifugare e successivamente viene letta. L'interpretazione è la medesima per tutti gli esami effettuati su schedina.

La procedura effettuata su piastra si basa sull'uso di anticorpi monoclonali disidratati, per la determinazione del gruppo sanguigno ABO e antigene D. Il reagente necessario è una soluzione di bromelina, per la preparazione della sospensione eritrocitaria, che agisce distendendo la membrana del globulo rosso, favorendo l'esposizione dei vari siti antigenici. La metodica consiglia di eseguire la determinazione su un campione fresco o conforme alla procedure di laboratorio.

Per la determinazione degli antigeni: PROVA DIRETTA è necessario preparare una sospensione di emazie con la soluzione di bromelina, portando il reagente a T.A. prima dell'uso. Pipettare la bromelina in una provetta pulita, aggiungere emazie concentrate o sangue intero, quindi risospendere e utilizzare la sospensione entro 15 minuti. Prima dell'uso, micro piastre, emazie test e campione devono essere posti a T.A., quindi rimuovere il foglio di alluminio dalla micro piastra e per la prova diretta pipettare la sospensione di eritrociti nei pozzetti della piastra. Incubare la piastra a T.A. per 10-15 minuti e al termine centrifugare per la lettura. La lettura prevede la rilevazione di un eventuale agglutinato, che per effetto della centrifugazione sarà visibile come un "bottone" al centro del pozzetto, che attesta il risultato positivo dell'esame (+). Al contrario una negatività verrà letta come alone omogeneo di emazie, disperse su tutto il pozzetto della piastra (-).

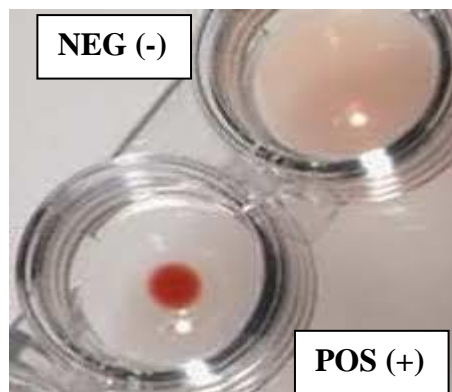


Figura 12: Rappresentazione di una reazione di emoagglutinazione su piastra e interpretazione dei risultati.

**2.**Determinazione indiretta del gruppo sanguigno ( $A_1, A_2, B, O$ ), l'esame viene effettuato con agglutinazione su piastra o agglutinazione in schedina.

Nel primo caso i reagenti, così come le piastre, sono i medesimi sopracitati nella determinazione diretta del gruppo sanguigno. Nel caso specifico della determinazione indiretta vengono impiegate le emazie test:  $A_1, A_2, B, O$ . I campioni devono essere centrifugati, così da poter separare il plasma o il siero da cimentare con le emazie test. La procedura prevede che, ai fini di eseguire una determinazione indiretta del gruppo sanguigno, si debbano pipettare plasma o siero nei singoli pozzetti della piastra e in seguito unirvi le emazie test. Quindi incubare a T.A. per 10-25 minuti e centrifugare per la lettura.

Nel secondo caso, la determinazione indiretta del gruppo sanguigno viene effettuata in schedine reverse diluent, impiegando le emazie test note  $A_1, A_2, B, O$  e il plasma del paziente. Dopo aver dispensato entrambe nei pozzetti, la schedina passa in centrifuga e in seguito viene letta attraverso le medesime modalità riportate in precedenza.

**3.**Determinazione del sistema Rh ( $CcEe$ ) e del sistema Kell ( $K$ ). Si tratta della determinazione del fenotipo di un individuo relativo ai sistemi Rh e Kell. La procedura prevede l'impiego di una schedina, dove, in ciascun pozzetto è pre-dispensato l'anti-siero corrispondente all'antigene ricercato. Viene preparata una sospensione di emazie, unendo LISS con sangue intero o emazie concentrate. Quindi, una volta dispensata la sospensione in ciascun

pozzetto, si procede immediatamente alla centrifugazione della scheda e alla lettura dei risultati.

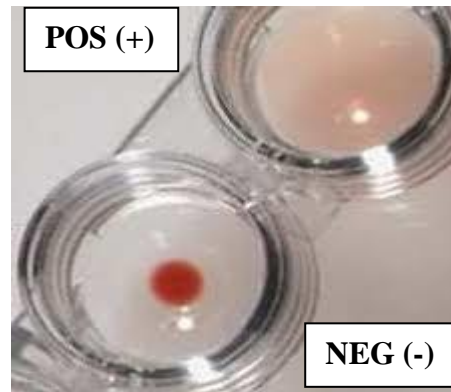
Per quanto concerne il sistema Kell, in presenza di una positività, si richiede l'effettuazione della determinazione dell'antigene Cellano (k), per valutare la presenza di tale antigene e quindi un fenotipo Kk o la sua assenza e quindi un fenotipo KK. La metodica in piastra prevede l'impiego di antisieri, costituiti da anticorpi monoclonali. La positività viene letta dalla formazione di un bottone di agglutinazione al centro del pozzetto, mentre la negatività è attestata da un'assenza di agglutinazione.

**4.** Ricerca anticorpi irregolari (TCI), nel caso in cui si utilizzi la metodica di agglutinazione in schedina, le schedine usate presentano LISS/Coombs. Le emazie test impiegate ai fini della ricerca anticorpi irregolari sono tre: I+II+III. I campioni devono essere centrifugati in modo da separare plasma o siero. La procedura prevede l'unione di emazie test, con siero o plasma, quindi le schedine vengono incubate 15 minuti a 37°C e la lettura presenta le medesime caratteristiche della determinazione del gruppo sanguigno.

In alternativa si può ricorrere ad una metodica di esecuzione del TCI su piastra. Il principio permane quello dell'agglutinazione, ma il supporto in questo caso è una piastra, motivo per cui si parla di un sistema di detection anticorpale in fase solida. La superficie dei pozzetti della piastra è ricoperta da membrane di globuli rossi disidratate, poiché gli antigeni esposti su tali membrane verranno impiegati per catturare eventuali anticorpi antieritrocitari dispersi nel plasma del paziente. In seguito alla dispensazione di una quantità nota di plasma nei pozzetti della piastra, questa permane per un determinato tempo in incubazione. Dopo di che tutte le aspecificità di reazione, non legate, vengono eliminate e sostituite con una sospensione di emazie indicatrici anti-IgG. La centrifugazione a seguire porta tali emazie a contatto con gli eventuali anticorpi legati alle membrane disidratate, alla base del pozzetto. In caso di positività (+) le emazie indicatrici permangono adese all'agglutinato formato, determinando visivamente un alone esteso su tutta la base del pozzetto. Nell'eventualità



della negatività (-) invece, le emazie indicatrici non incontrano alcun agglutinato, motivo per cui si raggruppano nel centro del pozzetto, formando un bottone.



*Figura 13 : Rappresentazione di una reazione di emoagglutinazione su piastra e interpretazione dei risultati.*

**5.**Identificazione anticorpi irregolari, la medesima procedura riportata per il TCI, può essere estesa all'identificazione anticorpi irregolari, con l'unica eccezione che in questo caso specifico le emazie test non sono più tre, bensì undici, al fine di raggiungere un'identificazione della specificità anticorpale.

**6.**Coombs diretto (TCD), si basa su un'agglutinazione in schedina. Le schedine contengono LISS/Coombs per la determinazione aspecifica del TCD, mentre nel caso di una valutazione specifica i pozzetti presentano Coombs monospecifici: IgG-IgA-IgM-Cec-C3d-Ctl. Il diluente utilizzato è LISS per la sospensione eritrocitaria. I campioni presentano sangue trattato con anticoagulante. La procedura prevede di allestire una provetta per la sospensione eritrocitaria, realizzata unendo il diluente LISS con le emazie concentrate e quindi di dispensarne una quantità in ciascun pozzetto della schedina. Essa deve essere immediatamente centrifugata e letta, seguendo gli stessi parametri riportati in precedenza per l'interpretazione.

**7.**Prove di compatibilità, si basa su un'agglutinazione in schedina. Le schedine contengono LISS/Coombs. Il diluente è LISS per la sospensione di emazie del donatore. Il campione è rappresentato dal sangue del donatore ricavato da un codino della sacca scelta, da cimentare con il plasma o con il

siero del paziente/ricevente. La procedura prevede di pipettare la sospensione di emazie del donatore insieme al plasma/siero del paziente, in un pozzetto della schedina e incubare a 37°C per 15 minuti. Al termine centrifugare e leggere con le medesime linee guida dei test precedenti.

**8. Tipizzazione**, si basa su un'agglutinazione in schedina.

→DETERMINAZIONE DEGLI ANTIGENI S/s, Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>, le schede sono: ANTI-S/s: S-s-ctl/S-s-ctl e ANTI-Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>: Fy<sup>a</sup>-Fy<sup>b</sup>-ctl/ Fy<sup>a</sup>-Fy<sup>b</sup>-ctl. Il diluente è LISS modificato, impiegato per la sospensione di emazie. Si esegue in schedine conservate a T.A., nelle cui colonne non è presente l'anti-siero, bensì il siero di Coombs, necessario per evidenziare al meglio la reazione. L'anti-siero, conservato in cella frigo a 4°C, viene aggiunto dopo aver dispensato le emazie diluite nei vari pozzetti. L'incubazione è di 15 minuti a 37°C, in seguito le schedine vengono poste in centrifuga ed è possibile leggere i risultati.

→DETERMINAZIONE DEGLI ANTIGENI Le<sup>a</sup>/Le<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>. Le schede sono ANTI-Le<sup>a</sup>/Le<sup>b</sup>: Le<sup>a</sup>-Le<sup>b</sup>-ctl/Le<sup>a</sup>-Le<sup>b</sup>-ctl e ANTI-Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>: Jk<sup>a</sup>-Jk<sup>b</sup>-ctl/ Jk<sup>a</sup>-Jk<sup>b</sup>-ctl. Il diluente impiegato è una soluzione di bromelina per la sospensione di emazie. I campioni possono essere di sangue coagulato o trattato con anticoagulante, si possono utilizzare sangue intero o sedimenti di globuli rossi. Il test viene eseguito in schedine contenenti già il siero con gli anticorpi specifici all'interno dei pozzetti e vengono conservate in frigorifero a 4°C. La procedura prevede la realizzazione di una sospensione di globuli rossi (diluente LISS unito a sangue intero o emazie concentrate), lasciata ad incubare 10 minuti a T.A. prima dell'uso. Quindi viene dispensata una quantità indicata dalla procedura in ciascun pozzetto della scheda, successivamente questa incuba circa 10 minuti a T.A., viene centrifugata e letta.

→DETERMINAZIONE DEGLI ANTIGENI M/N. Le schede sono ANTI-M/N: M-N-ctl/M-N-ctl. Il diluente impiegato è LISS modificato per la sospensione di emazie. Il test viene eseguito su schedine, conservate a 4°C. Prima di eseguire il test è necessario portarle a temperatura ambiente.

L'anti-siero è già presente nelle schedine. I campioni possono essere di sangue coagulato o trattato con anticoagulante, ma è possibile utilizzare sangue intero o sedimenti di globuli rossi. La procedura prevede la realizzazione di una sospensione di globuli rossi (diluente LISS unito a sangue intero o emazie concentrate), lasciata ad incubare 10 minuti a T.A. prima dell'uso. Quindi viene dispensata una quantità indicata dalla procedura in ciascun pozzetto della scheda, successivamente segue un'incubazione di 15 minuti a T.A., viene centrifugata e letta.

Tali test vengono effettuati su macchinari automatizzati, che provvedono alle fasi di dispensazione, incubazione, centrifugazione e lettura. L'interpretazione dei dati viene eseguita da un operatore tecnico e da un dirigente finale con conseguente emissione del referto.

## **CAPITOLO VI, ANALISI**

Nell'ambito di questa ricerca, eseguita ai fini della suddetta tesi, si è cercato di stabilire l'incidenza del fenomeno di alloimmunizzazione antieritrocitaria nei pazienti sottoposti a terapia trasfusionale.

A tale scopo sono stati valutati i dati riguardanti i risultati dei Test di Coombs Indiretto (TCI), test specifico per rilevare l'immunizzazione alloeritrocitaria, eseguiti sui pazienti afferenti presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Mondovì (ASLCN1) e presso il Centro Trasfusionale dell'ASO S. Croce e Carle di Cuneo negli anni 2017-2018 e 2019 (fino al mese di giugno compreso). I pazienti risultati positivi alla ricerca di alloanticorpi antieritrocitari sono stati stratificati in base alla presenza o meno di richiesta trasfusionale, utilizzando come comune denominatore il numero totale di pazienti associato a una richiesta trasfusionale nell'arco dei tre anni di interesse per questo elaborato, corrispondente a: 10246 , di cui 2599 presso l'Ospedale di Mondovì e 7697 presso l'Ospedale di Cuneo. In seguito tale sottogruppo (pazienti con test TCI positivi, associati a una richiesta trasfusionale) è stato analizzato, valutando la progressiva esposizione a terapia trasfusionale.

### **6.1-ANALISI SU GRUPPO TOTALE PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI**

I pazienti risultati positivi al test TCI nel periodo di osservazione sono stati in totale 225, di cui 67 pazienti presso l'Ospedale di Mondovì e 158 pazienti presso l'Ospedale S. Croce e Carle di Cuneo. Di questi è stata valutata la tipologia di anticorpo rilevato ed è stato evidenziato che 23 pazienti presentavano un'immunizzazione multipla, la cui specificità è descritta nella tabella 2.

La tipologia di anticorpi è riportata nel grafico sottostante (tabella 1).

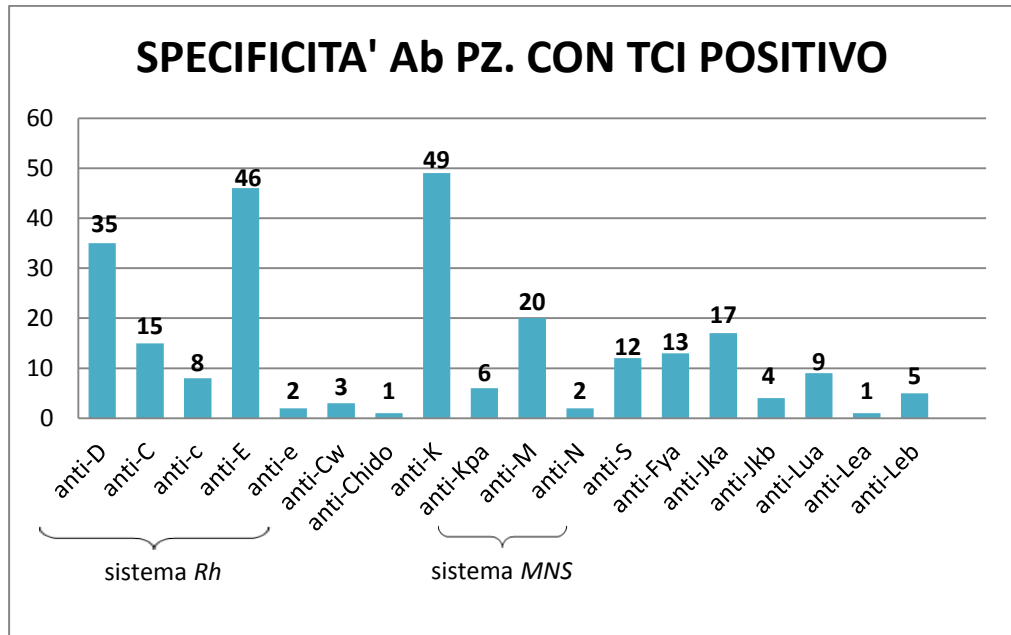


Tabella 1

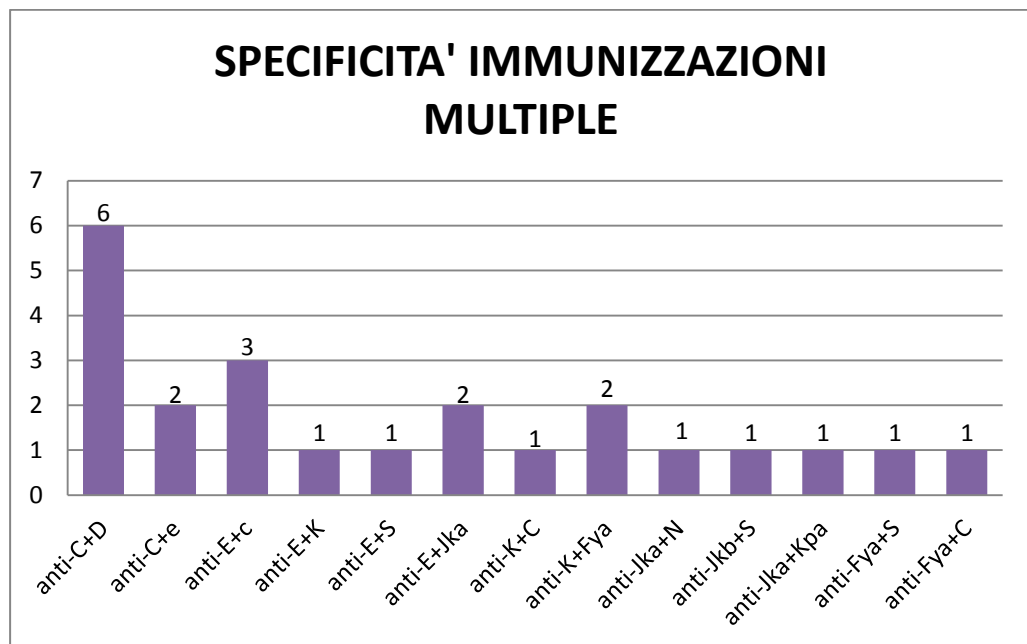


Tabella 2

I pazienti positivi al TCI (225), sono stati stratificati in:

- Gruppo pazienti con sola richiesta TCI e non sottoposti a terapia trasfusionale, composto da 54 pazienti (27 presso l'Ospedale di Mondovì e 27 presso l'Ospedale di Cuneo).
- Gruppo pazienti con TCI richiesto come test pre-trasfusionale, associato quindi a una richiesta trasfusionale, composto da 171

pazienti (40 presso l’Ospedale di Mondovì e 131 presso l’Ospedale di Cuneo).

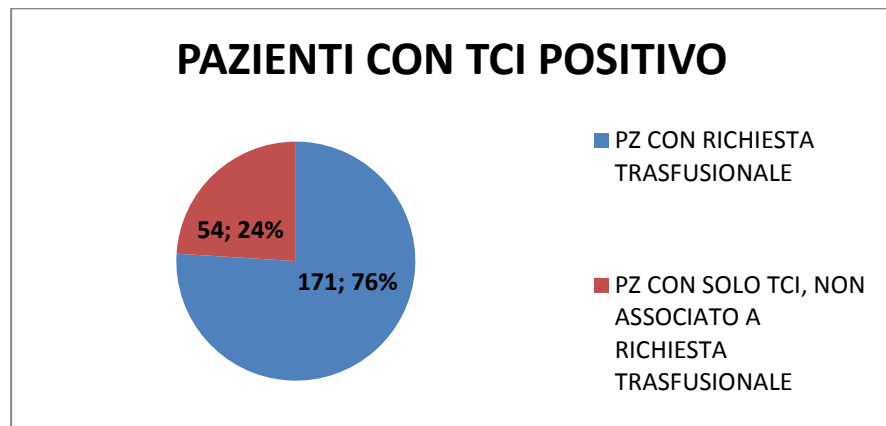


Tabella 3

I 54 pazienti con sola richiesta di TCI sono:

- 27 donne con TCI positivo in corso di gravidanza. Tale test viene normalmente richiesto per la prevenzione dell’alloimmunizzazione feto-materna.

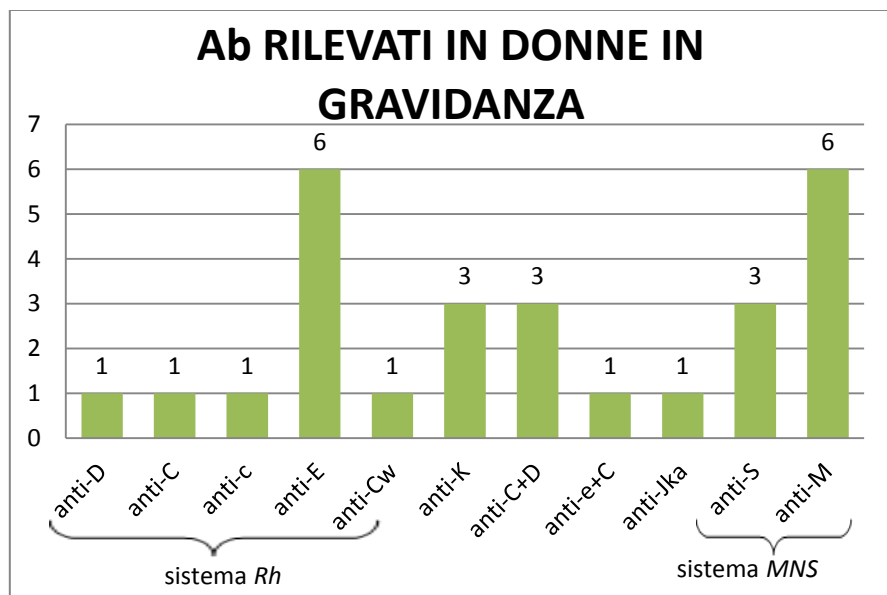


Tabella 4

- 27 pazienti con richiesta di solo TCI in assenza di dati anamnestici che chiariscano la natura dell’immunizzazione rilevata.

## 6.2-ANALISI SU GRUPPO PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI, ASSOCIATI A RICHIESTA TRASFUSIONALE

L'analisi dell'incidenza dell'alloimmunizzazione si è concentrata sul gruppo di pazienti con TCI associato a richiesta trasfusionale è stato analizzato al fine di identificare l'incidenza dell'alloimmunizzazione antieritrocitaria associata a pregressa trasfusione.

Di questi è stato valutato:

- Sesso: 66 uomini e 105 donne.

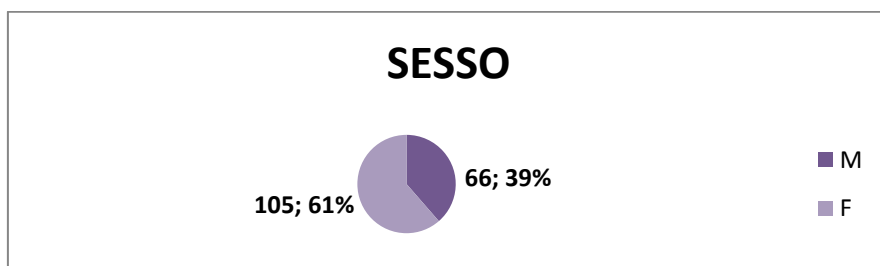


Tabella 5

- Et : 96 con et   $\geq 75$  anni, 60 con et   $>50$  e  $<75$  anni, 15 con et   $\leq 50$  anni.

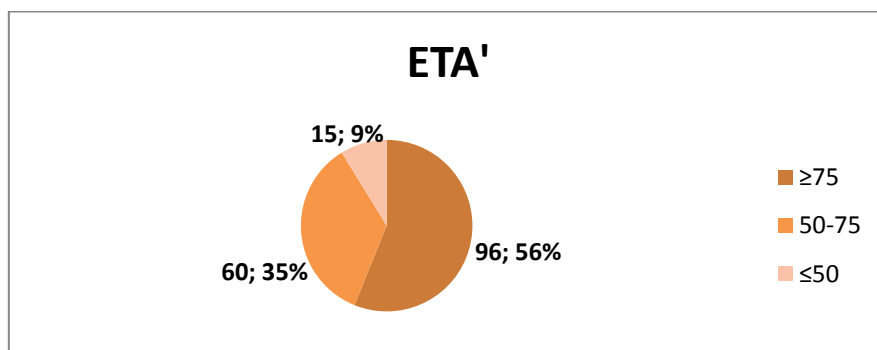


Tabella 6

- Reparto: i pazienti sono stati stratificati in base al reparto di degenza da cui   stata inviata la richiesta di emocomponenti. In base ai dati del reparto di degenza i pazienti sono stati raggruppati in:
  - pazienti ricoverati per patologie mediche: 54
  - pazienti ricoverati per patologie chirurgiche: 80
  - pazienti oncologici: 19
  - pazienti ematologici: 18

I dati riguardanti i reparti di degenza sono riportati nel grafico sottostante (tabella 7).

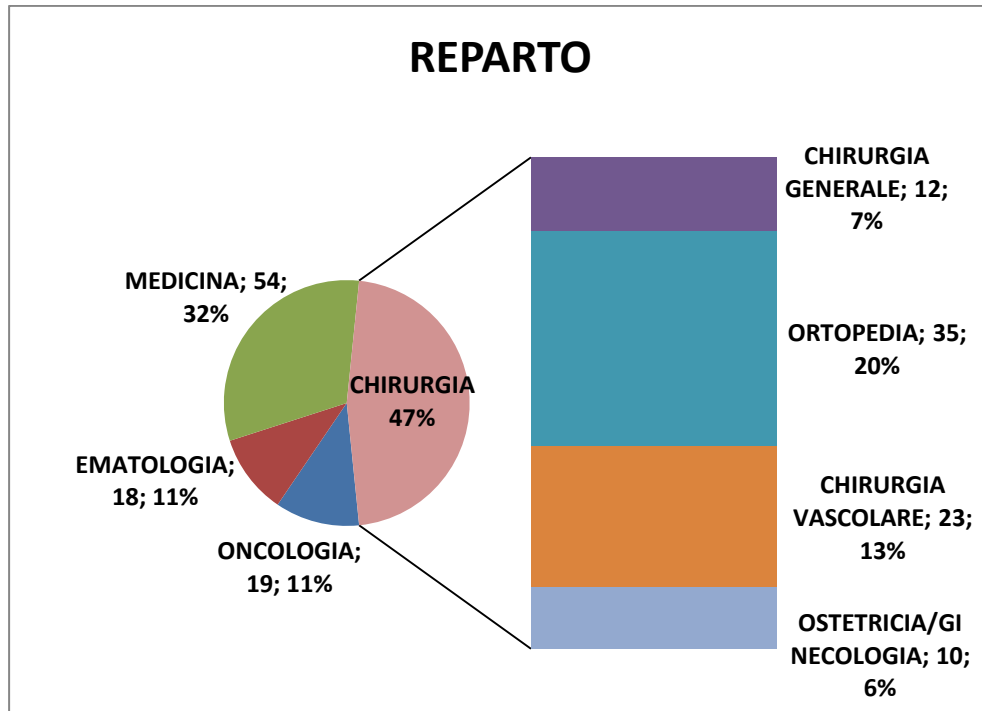


Tabella 7

- Tipologia di anticorpo rilevato. Per quanto riguarda questo punto i dati raccolti sono stati stratificati in base all'appartenenza ai sistemi antigenici di maggior rilevanza clinica e sono stati descritti nella tabella 8. Inoltre 16 pazienti hanno manifestato un'immunizzazione multipla, la cui specificità anticorpale è riportata nella tabella 9.

Il maggior numero di anticorpi rilevati appartiene al sistema Rh (D, E, e, C, c), a dimostrazione dell'elevata immunogenicità correlata a tali antigeni. Analisi a parte va posta sulla rilevazione di anticorpi anti-D, la cui prevalenza maggiore è su pazienti di sesso femminile, Rh negative. L'elevata incidenza di immunizzazione anti-D in tali soggetti è verosimilmente correlata a pregresse esposizione antigenica durante le gravidanze, essendo oltretutto pazienti anziane, non sottoposte quindi a protocollo di immunoprofilassi anti-D, ormai in uso da molti anni, atto a limitare la alloimmunizzazioni fetto-materne di tipo D. Interessanti sono invece i 5 casi di immunizzazione anti-D in soggetti di sesso maschile, di cui 4 non è nota la anamnesi trasfusionale (precedente trasfusione con unità di eritrociti Rh positive?) e di un paziente che in passato è stato trasfuso con



un'unità di eritrociti contenenti una variante del D (D variant), correlata a un rischio minimo di alloimmunizzazione.

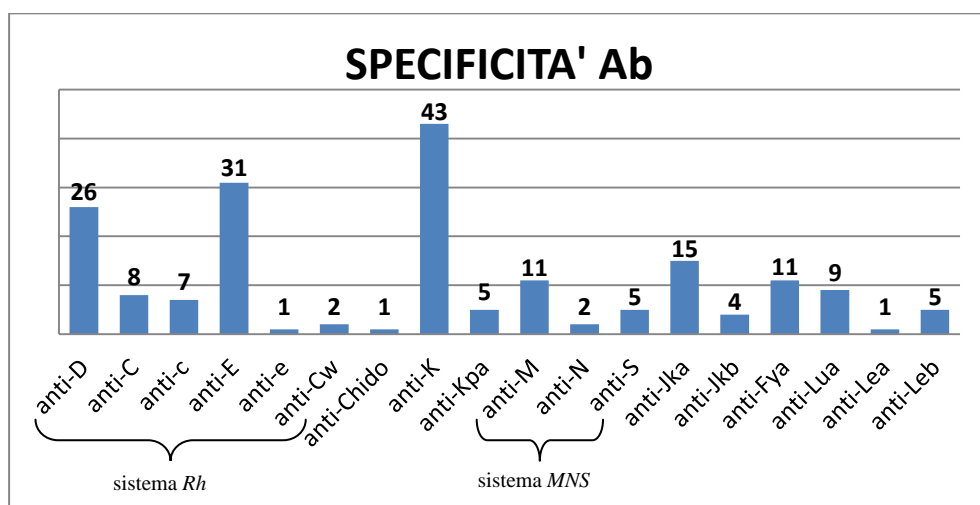


Tabella 8

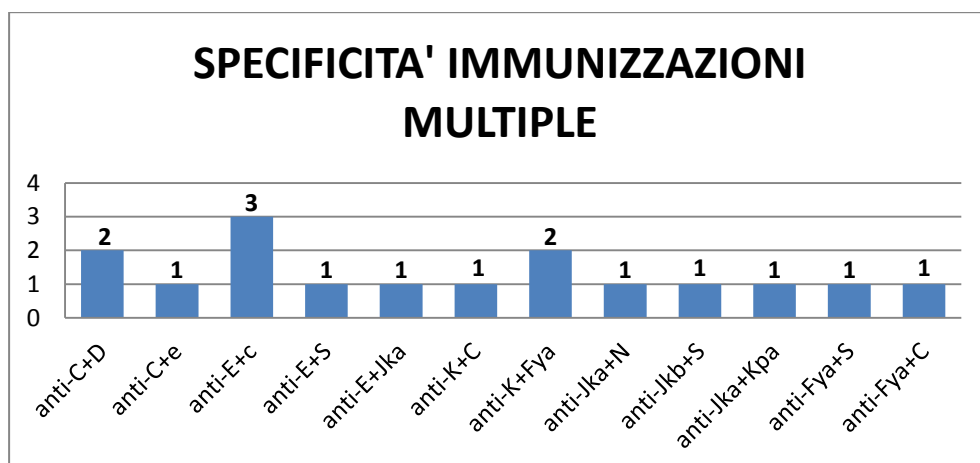


Tabella 9

### 6.3-ANALISI SU GRUPPO PAZIENTI POSITIVI AL TEST TCI, ASSOCIATI A RICHIESTA TRASFUSIONALE E PRESENTANTI ANAMNESI TRASFUSIONALE PREGRESSA CERTA

I pazienti con richiesta trasfusionale sono stati infine suddivisi in un ulteriore sottogruppo tenendo conto dei dati relativi all'anamnesi trasfusionale, ovvero la pregressa o meno esposizione a precedenti trasfusioni di emazie concentrate, per cercare di verificare la pregressa esposizione agli alloantigeni alla base dell'alloimmunizzazione.

I soggetti sono stati stratificati in:

- I pazienti immunizzati con anamnesi trasfusionale pregressa certa sono 100 (presso l'Ospedale di Mondovì sono 18, corrispondenti al 46% e presso l'Ospedale di Cuneo sono 82, corrispondenti al 63%).
- I pazienti immunizzati con anamnesi trasfusionale incerta sono 71 (presso l'Ospedale di Mondovì sono 22, corrispondenti al 55% e presso l'Ospedale di Cuneo sono 49, corrispondenti al 37%).

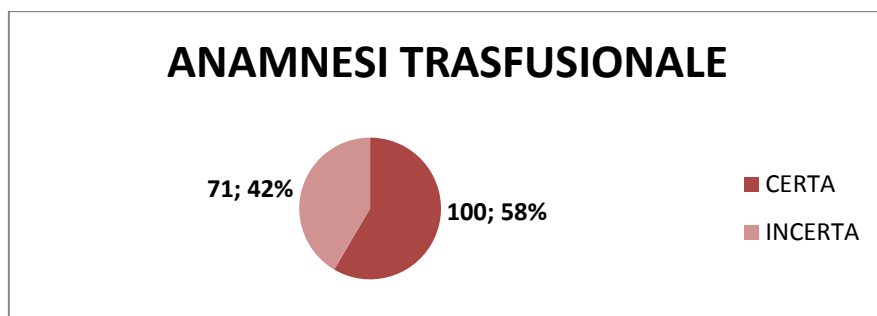


Tabella 10

Nel gruppo di pazienti immunizzati con anamnesi trasfusionale certa si è proceduto ad una stratificazione in base a:

- Et : 57 con et   $\geq 75$  anni, 36 con et   $>50$  e  $<75$  anni, 7 con et   $\leq 50$  anni.

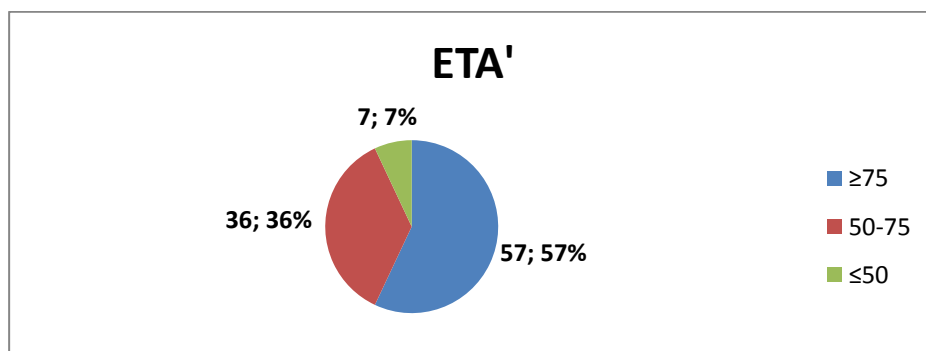


Tabella 11

- Sesso: 47 uomini e 53 donne.

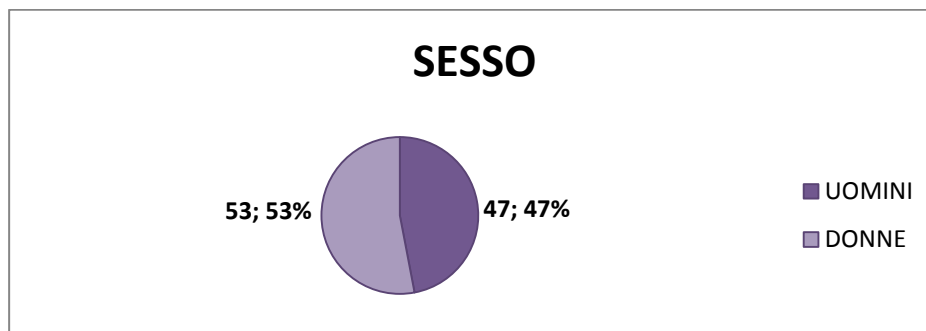


Tabella 12

- Reparto: i pazienti sono stati stratificati in base al reparto di degenza da cui è stata inviata la richiesta di emocomponenti. In base ai dati del reparto di degenza i pazienti sono stati raggruppati in:
  - pazienti ricoverati per patologie mediche: 38
  - pazienti ricoverati per patologie chirurgiche: 38
  - pazienti oncologici: 10
  - pazienti ematologici: 14

I dati riguardanti i reparti di degenza sono riportati nel grafico sottostante (tabella 13).

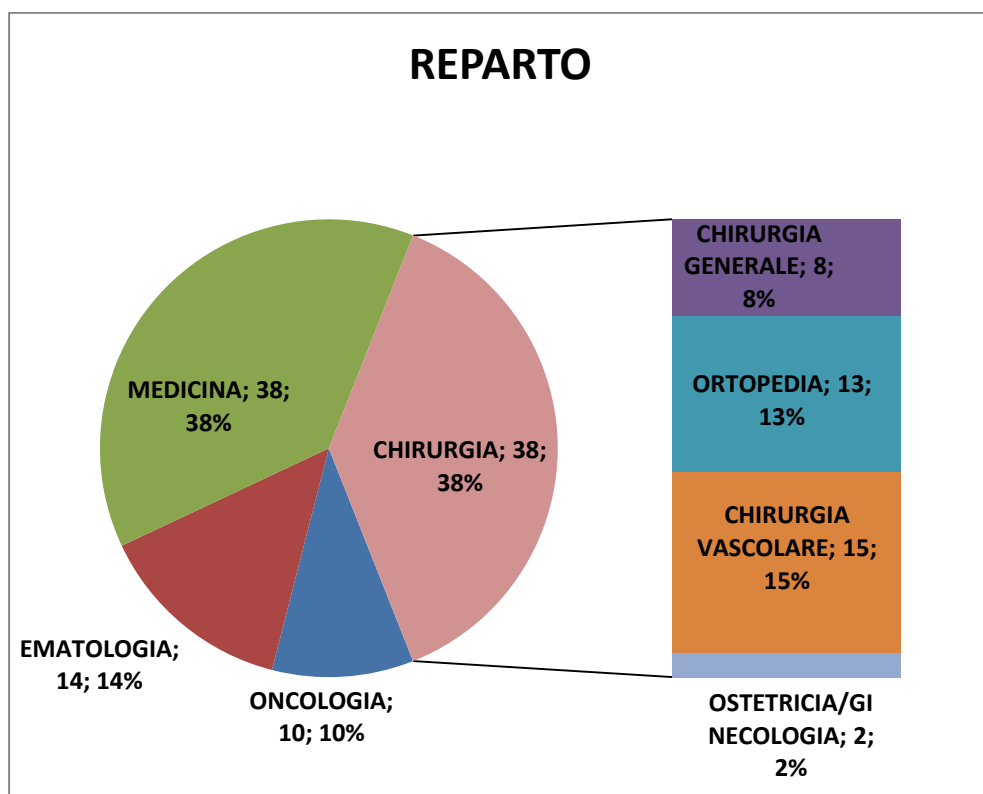


Tabella 13

## CAPITOLO VII, CONCLUSIONI

### 7.1- FREQUENZA ALLOIMMUNIZZAZIONE

Alla luce dei dati raccolti e delle informazioni riportate nel capitolo precedente sono state elaborate le seguenti conclusioni.

Il 90% dei pazienti risultati positivi al TCI nel periodo in esame (225 pazienti) ha un'alloimmunizzazione verso un singolo antigene eritrocitario.

Il 10% (23 pazienti) presenta invece un'alloimmunizzazione multipla (presenti 2 anticorpi antieritrocitari differenti).

Gli anticorpi rilevati in ordine di frequenza sono riportati nella seguente tabella (tabella 14).

*Tabella 14*

K	20%
E	19%
D	14%
M	8%
Jk <sup>a</sup>	7%
C	6%
Fy <sup>a</sup>	5%
S	5%
Lu <sup>a</sup>	4%
c	3%
Kp <sup>a</sup>	2%
Le <sup>b</sup>	2%
Jk <sup>b</sup>	2%
Cw	1%
e	1%
N	0,5%
Chido	0,5%
Lea	0,5%

Analizzando i dati relativi alla frequenza degli anticorpi rilevati si conferma l'alta immunogenicità del sistema Rh, con gli antigeni: D, C, c, E, e (43% degli anticorpi rilevati).

Per quanto riguarda gli anticorpi anti-D rilevati (14%), come descritto nel capitolo 'Analisi', sono relativi prevalentemente a soggetti di sesso femminile (28 soggetti), in età avanzata (media età: 69 anni), correlati verosimilmente a esposizione antigenica durante la gravidanza, in un'epoca antecedente alla sistematica applicazione dell'immunoprofilassi anti-D eseguita in tutte le donne Rh Negative.

Bassa è infatti la frequenza degli anticorpi anti-D correlati a pregresse trasfusioni, poiché i protocolli trasfusionali prevedono l'assegnazione di emazie gruppo AB0 e RhD compatibili: nel periodo di osservazione sono stati rilevati infatti solo 7 pazienti con anti-D di sesso maschile (3%), di cui in un solo caso è stato possibile correlare la positività con una pregressa trasfusione di emazie con Dvariant, correlata ad un rischio minimo di alloimmunizzazione anti-D.

46 anticorpi rilevati sono rivolti verso l'antigene E (19%): tale antigene rappresenta sicuramente il fattore immunogeno del sistema Rh più importante per la popolazione caucasica, poiché la maggior parte dei soggetti non possiede tale antigene.

La frequenza degli antigeni appartenenti al sistema Rh nei caucasici è riportata qui di seguito:

D	85%
C	68%
c	80%
E	29%
e	98%

Tabella 15- "Caratteristiche immunoematologiche delle popolazioni locali" Dott.ssa Cinzia Paccapelo, AVIS REGIONE LOMBARDIA.

A seguire 55 sono i pazienti che hanno sviluppato anticorpi rivolti verso il sistema Kell (22%), la maggior parte dei quali verso l'antigene K, a conferma dell'alta immunogenicità di tale antigene, come riportato in letteratura (tabella 16), correlata alla bassa incidenza dello stesso nella popolazione caucasica.

K	9%
k	99,8%
Kp <sup>a</sup>	2%
Kp <sup>b</sup>	>99,9%

Tabella 16- “Caratteristiche immunoematologiche delle popolazioni locali” Dott.ssa Cinzia Paccapelo, AVIS REGIONE LOMBARDIA.

I restanti anticorpi sono relativi ai sistemi MNSs (14%), sistema Duffy (5%), sistema Kidd (9%), Lutheran (4%), Lewis (2,5%).

La frequenza dell’alloimmunizzazione è maggiore nei pazienti di sesso femminile (67%), rispetto al sesso maschile (33%), tale dato potrebbe essere legato al ruolo della presentazione di alloantigeni durante le gravidanze, dato tutt’ora in corso di valutazione nei vari studi in letteratura<sup>8-10</sup>.

Analizzando il gruppo totale di pazienti, l’età nella quale si evidenzia la maggiore percentuale di alloimmunizzazioni corrisponde alla fascia di età superiore ai 75 anni (45%), di seguito i pazienti con età compresa tra i 50 anni e i 75 anni (32%) e in ultimo i pazienti di età inferiore ai 50 anni (23%). Tale dato sembrerebbe correlato più alla tipologia di pazienti, che nel contesto degli Ospedali oggetto di analisi ricorrono ad una terapia trasfusionale cronica, fondamentalmente costituiti da soggetti anziani con patologie croniche. La media dell’età dei pazienti immunizzati è pari a 65 anni, dato che conferma quanto detto.

Quanto riportato in letteratura<sup>11</sup> evidenzia come pazienti episodicamente trasfusi non presentino alcuna correlazione significativa riguardo l’immunizzazione e l’età al momento della trasfusione eseguita. Al contrario, per quanto concerne i soggetti sottoposti a terapia trasfusionale cronica sussiste una relazione, statisticamente significativa, con l’età avanzata: in tali soggetti il rischio di sviluppare alloimmunizzazioni antieritrocitarie aumenta ad ogni unità di emazie concentrate trasfusa nel corso degli anni.

## 7.2- INCIDENZA ALLOIMMUNIZZAZIONE

L'incidenza dell'alloimmunizzazione è stata calcolata sui pazienti con TCI positivo associato a richiesta trasfusionale, poiché è noto il numero totale dei pazienti con richiesta trasfusionale nel periodo in esame.

Il totale dei pazienti con richiesta trasfusionale nei due Ospedali è 10246, 171 sono i pazienti con TCI positivo: in tali pazienti l'incidenza di alloimmunizzazione è pari al 1,7%. Questo dato è un dato cumulativo che riguarda il gruppo preso in esame, caratterizzato da patologie differenti. Tale percentuale è strettamente dipendente dal denominatore utilizzato: maggiore è l'ampiezza del denominatore, minore risulta essere l'incidenza di alloimmunizzazione rilevata e viceversa. Quanto detto giustifica inoltre la variabilità dell'incidenza riportata in letteratura. Il nostro dato rientra nella casistica descritta nei vari studi, che riportano una percentuale di alloimmunizzazione antieritrocitaria in base alla tipologia di pazienti in esame, come di seguito riportato: nei pazienti non trasfusi cronicamente l'incidenza varia dallo "0.2% al 3%"<sup>6</sup>, aumentando al "17%"<sup>12</sup> nei pazienti affetti da Mielodisplasia e attestandosi "oltre il 40%"<sup>11</sup> nei pazienti affetti da Drepanocitosi, che rappresentano sicuramente la tipologia di pazienti a più alto rischio immunizzazione, legato al ricorso cronico alla terapia trasfusionale.

Ritornando all'analisi dei pazienti con TCI positivo associato a richiesta trasfusionale, la maggiore frequenza nello sviluppo di anticorpi irregolari si riscontra nei soggetti di sesso femminile (61%), rispetto a quello maschile (39%) e nei soggetti di età superiore a 75 anni (56%), dati sovrapponibili all'intero gruppo in esame.

La correlazione dell'immunizzazione con la patologia di base è stata eseguita stratificando il gruppo di pazienti con richiesta trasfusionale in base al reparto di degenza, individuando 4 aree mediche: ematologia, oncologia, medicina e chirurgia. La distribuzione dei pazienti nelle varie aree mediche non è uniforme, essendo prevalente negli Ospedali in esame l'area di tipo chirurgico. La maggior frequenza dell'immunizzazione nei pazienti chirurgici (47%) potrebbe dipendere quindi dalla numerosità degli stessi

rispetto ai pazienti delle restanti aree. Interessante è il dato dei pazienti ematologici (18 pazienti, 11%): la maggior parte dei pazienti immunizzati è affetto da Mielodisplasia (8 pazienti, 44%), patologia per la quale la terapia trasfusionale di tipo cronico rappresenta il principale supporto terapeutico, motivo per il quale l'alloimmunizzazione è una frequente complicanza: anche tale dato concorda con quanto riportato in letteratura<sup>13</sup>. Tra i pazienti ematologici due sono i pazienti con immunizzazione ed emoglobinopatie (Talassemia e Drepanocitosi), che da letteratura rappresentano il maggior gruppo a rischio alloimmunizzazione. Negli Ospedali in esame tuttavia la frequenza di pazienti affetti da tali patologie è bassa. In tali pazienti, poiché sottoposti a terapia trasfusionale cronica, viene applicato un protocollo di fenotipizzazione completa del sistema Rh, del sistema Kell e degli antigeni dei sistemi minori (Duffy, Kidd, MNSs). Nella scelta degli emocomponenti da assegnare in caso di trasfusioni viene sicuramente rispettato il fenotipo Rh e Kell e si cerca, nel limite delle risorse disponibili, di rispettare anche il fenotipo esteso, cercando di limitare quanto più e possibile l'esposizione ad alloantigeni. L'elevata incidenza di alloimmunizzazione in soggetti affetti da emoglobinopatie (soprattutto nell'Anemia Falciforme) è confermato da vari studi in letteratura.

Lo studio di Jariwala K., Mishra K. e Ghosh K. "*Comparative study of alloimmunization against red cell antigens in sickle cell disease & thalassaemia major patients on regular red cell transfusion.*"<sup>5</sup> rivela una percentuale di alloimmunizzazione nei pazienti falcemici nove volte superiore rispetto ai pazienti affetti da Talassemia Major, nonostante questi ultimi siano stati sottoposti ad una terapia trasfusionale più intensa ("11% Anemia Falciforme, contro 1,2% Talassemia"<sup>5</sup>). Quanto detto sembrerebbe correlato a fatto che i pazienti affetti da Anemia Falciforme presentano uno stato infiammatorio cronico che sovra regola molti dei geni del sistema immunitario, favorendo l'iper-reattività nei confronti degli alloantigeni eritrocitari. L'elevata incidenza di alloimmunizzazione riscontrata in tali pazienti sembrerebbe inoltre essere correlata ad una profonda diversità tra l'etnia dei donatori di sangue e l'etnia dei pazienti riceventi: la



Drepanocitosi è una emoglobinopatia ad alta incidenza nella popolazione africana, spesso la terapia trasfusionale di supporto viene eseguita in Paesi di etnia diversa con, di conseguenza, una notevole diversità antigenica eritrocitaria.

Nell'articolo di Salam Alkindi et al. *“Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease and Thalassemia: Experience of a Single Centre in Oman.”*<sup>14</sup> la maggior incidenza di alloimmunizzazione post-trasfusionale nei pazienti drepanocitici rispetto ai pazienti affetti da Talassemia è associata al fatto che “i pazienti talassemici sono di solito trasfusi in giovane età e ad intervalli regolari. La risposta del sistema immunitario sembrerebbe essere influenzata dall'età del paziente alla prima trasfusione e dal numero di unità di emazie che il paziente ha ricevuto. Si ritiene che le trasfusioni in tenera età possano offrire una certa tolleranza immunitaria e protezione contro l'alloimmunizzazione. La correlazione tra il numero di unità ematiche trasfuse e la formazione di anticorpi non è stata dimostrata nella talassemia, ma è un fattore importante per un aumento dell'alloimmunizzazione nei soggetti, inclusi i pazienti drepanocitici, che ricevono più trasfusioni.”<sup>14</sup>. Anche in tale studio è riportato come fattore di rischio lo stato infiammatorio cronico e gli stimoli pro-infiammatori che caratterizzano la Drepanocitosi, come fattori favorevoli all'alloimmunizzazione. Nell'articolo inoltre vengono citati studi che suggeriscono, almeno nei pazienti con Drepanocitosi, che “la composizione genetica è molto rilevante per lo sviluppo di anticorpi, in particolare la presenza di alleli Rh o Kell alterati potrebbe essere alla base dello sviluppo di questi anticorpi, con un meccanismo geneticamente guidato”<sup>14</sup>.

Frequente nei pazienti emoglobinopatici è inoltre il riscontro di alloimmunizzazioni complesse. Situazione che caratterizza i due pazienti individuati nello studio: entrambi presentano alloimmunizzazione multipla, a prova del fatto che un regime trasfusionale cronico aumenta il rischio di sviluppare multiple immunizzazioni, dato peraltro riscontrato ampiamente in letteratura. Il paziente affetto da Drepanocitosi presenta un anticorpo anti-E (già presente al momento del suo ingresso presso l'Ospedale di degenza) e

successivamente in corso di terapia trasfusionale sviluppa un secondo anticorpo diretto contro l'antigene Jk<sup>a</sup>. Il secondo paziente, affetto da Talassemia, presenta un quadro di immunizzazione multipla (anti-c e anti-E) già al primo accesso in Ospedale e possiede un'anamnesi di terapia trasfusionale cronica presso altra struttura.

### **7.3- PREGRESSA TERAPIA TRASFUSIONALE**

In ultimo il gruppo pazienti con TCI positivo, associato a richiesta trasfusionale è stata stratificato in base all'anamnesi trasfusionale: 100 soggetti, pari al 58% ha un'anamnesi positiva per pregresse trasfusioni. Di 71 soggetti, pari al 42%, invece non è stato possibile risalire a pregressa terapia trasfusionale.

L'analisi del gruppo "anamnesi trasfusionale certa" ha dato esiti sovrapponibili in termini di età e distribuzione nelle aree mediche. Interessante è la riduzione della percentuale tra uomini e donne (53% donne e 47% uomini): pur rimanendo maggiore il gruppo di sesso femminile, la presenza di pregressa esposizione ad alloantigeni durante le pregresse trasfusioni fa aumentare la % di immunizzazione negli uomini.

### **7.4- OSCILLAZIONI DEL TITOLO ANTICORPALE**

Interessanti i dati relativi alle oscillazioni del titolo anticorpale degli anticorpi rilevati. Si tratta di pazienti che presentano un test TCI positivo a ridosso dell'evento immunizzante (trasfusione con emazie contenenti l'alloantigene) e a distanza di tempo l'anticorpo non è più rilevato dal TCI eseguito. La positività ritorna evidente a seguito di nuova esposizione antigenica. In letteratura è riportato tale dato ed è associato ad un fenomeno anche noto come "evanescenza degli alloanticorpi"<sup>4-15-16</sup>. Si tratta della scomparsa di un alloanticorpo, motivata dal calo del suo titolo anticorpale. Diversi studi riportati in letteratura<sup>4</sup> indicano che tale fenomeno riguarda un gruppo di anticorpi a specificità antigenica diversa. I principali antigeni associati a tale fenomeno appartengono al sistema Kidd (*Jk<sup>a</sup>*, *Jk<sup>b</sup>*), al sistema Lutheran (*Lu<sup>a</sup>*) e al sistema Kell (*Js<sup>a</sup>*). Gli antigeni del sistema Rh, quali *c* e

*D*, al contrario, risultano associati con ad una risposta di tipo umorale duratura. Diversi studi<sup>15</sup> hanno definito che il grado di estraneità, fattore determinante nell'immunogenicità di un antigene, potrebbe verosimilmente essere correlato con il suddetto fenomeno di evanescenza, impattando la durata della risposta umorale. La spiegazione risiede nella diversità amminoacidica degli antigeni gruppo ematici: l'antigene *D* viene riconosciuto dai linfociti T come particolarmente estraneo, provocando una risposta immunitaria duratura, al contrario l'antigene *Jk<sup>a</sup>*, che differisce per la sostituzione di un solo amminoacido, potrebbe determinare una risposta immunitaria molto più debole. È stato inoltre ipotizzato che determinate varianti amminoacidiche potrebbero risultare più o meno immunogeniche e favorire o meno una risposta immunitaria maggiore, su questo punto non vi sono evidenze scientifiche e vi sono diversi studi in corso. Altri studi<sup>16</sup> individuano una possibile spiegazione a tale fenomeno nei limiti di sensibilità degli strumenti immunoematologici impiegati nei test trasfusionali.

Nel presente lavoro di ricerca sono stati rilevati diversi casi riguardanti il suddetto fenomeno. Dei 100 pazienti associati a TCI positivo, a richiesta trasfusionale e ad un'anamnesi trasfusionale pregressa certa, il 7% (7 pazienti) presenta tale caratteristica. Interessante il fatto che le specificità anticorpali evidenziate siano:

- antigene *Jk<sup>a</sup>*:2 casi rilevati
- antigene *Lu<sup>a</sup>*:1 caso rilevato
- antigene Chido: 1 caso rilevato
- antigene *D*: 1 caso rilevato
- antigene *K*: 1 caso rilevato
- antigene *E*: 1 caso rilevato

Molteplici invece sono le evidenze di test TCI positivi a ridosso dell'evento immunizzante (trasfusione di emocomponenti) e poi negativi, verosimilmente per l'assenza di successive stimolazioni antigeniche e conseguente riduzione del titolo anticorpale al di sotto del valore soglia intercettabile dalle metodiche laboratoristiche.

Inoltre, nel presente lavoro, sono stati evidenziati casi di test TCI risultati negativi a ridosso della prima esposizione all'antigene immunizzante, poi positivizzati, in seguito ad un successivo contatto con tale antigene: evidentemente tale antigene non è sufficientemente immunogeno da determinare lo sviluppo di alloanticorpi con una sola esposizione. Entrambe le evidenze potrebbero confermare quanto detto nell'articolo di Gary Stack e Christopher A. Tormey "*Detection rate of blood group alloimmunization base on real-world testing practice and kinetics of antibody induction and evanescence.*"<sup>16</sup>, riguardo la diversa sensibilità degli strumenti, che potrebbero non rilevare l'anticorpo circolante, per via del basso titolo. Tecniche via via più sensibili potrebbero rappresentare la soluzione a tale problematica, spesso associata a reazioni trasfusionali importanti, permettendo di identificare prima un anticorpo e prolungare il suo periodo di rilevazione.

## BIBLIOGRAFIA

### LEGGI E ARTICOLI CONSULTATI

1. (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 02 NOVEMBRE 2015 «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.»), 2015)
2. Sylvia T. Singer et al., «*Alloimmunization and Erythrocyte Autoimmunization in Transfusion-Dependent Thalassemia Patients of Predominantly Asian Descent.*» Blood, 15 November 2000, Volume 96, Number 10
3. Stella T. Chou «*Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act.*» Hematology 2013
4. Christopher A. Tormey et al. “*Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences.*” Blood First Edition Paper, February 26, 2019, DOI 10.1182/blood-2018-08-833962
5. Jariwala K., Mishra K. e Ghosh K. “*Comparative study of alloimmunization against red cell antigens in sickle cell disease & thalassaemia major patients on regular red cell transfusion.*” (Indian J. Med. Res. 2019 Jan;149(1):34-40)
6. Raj Nath Makroo1 et al. “*Rh and Kell Phenotype Matched Blood Versus Randomly Selected and Conventionally Cross Matched Blood on Incidence of Alloimmunization.*” Indian J Hematol Blood Transfus (Apr-June 2017) 33(2):264–270
7. Nevia Arreghini et al. “*IAT e DAT in una popolazione di pazienti trasfusi.*” La Trasfusione del Sangue Vol.45, Num.5, Settembre-Ottobre 2000 (264-269)
8. Vitor Mendonça Alves et al. «*Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study.*» Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, March 2012
9. Stella T. Chou et al. “*Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies.*” British Journal of Hematology, 2012, 159, 394-404

10. Santos FW et al. “*Post Transfusion red alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies.*” Rev Bras Hematol Hemoter 2007; 29(4):369-72
11. Stella T. Chou et al. “*High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors.*” Blood, 8 August 2013, V112, N6
12. Lyn Y. et al. “*Prophylactic RhCE and Kell antigene matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes.*” Vox Sang. 2017 Jan;112(1):79-86. doi: 10.1111/vox.12455. Epub 2016 Oct 19
13. Stiegler G. et al. “*Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome.*” Ann Hematol 2001 Jun; 80(6); 330-3
14. Salam Alkindi et al. “*Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease and Thalassemia: Experience of a Single Centre in Oman*”. Mediterr J Hematol Infect Dis 2017; 9; e2017013
15. Christopher A. Tormey and Gary Stack “*The persistence and evanescence of blood group alloantibodies in men.*” TRANSFUSION, Volume 49, November 2009
16. Gary Stack and Christopher A. Tormey “*Detection rate of blood group alloimmunization base on real-world testing practice and kinetics of antibody induction and evanescence.*” TRANSFUSION, Volume 56, November 2016

## **SUPPORTO TECNICO E SCIENTIFICO**

- “*Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*”. Published by the Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), allée Kastner CS 30026 F-67081 STRASBOURG, FRANCE. Recommendation No. R(95) 15, 17th edition.
- “*Raccomandazioni SIMTI sul corretto utilizzo degli emocomponenti e dei plasmaderivati*” Gruppo di Redazione: G. Liumbruno, F.

Bennardello, A. Lattanzio, P. Piccoli, G. Rossetti. Edizione SIMTI.  
1°edizione, settembre 2008

- Morselli, Enrico. “*La trasfusione del sangue*” Loescher, 1896
- Francesco Bacci et al. “*Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici*”, Sante Tura. Società Editrice Esculapio, 1 set 2015
- Fagiolo, Enzo. “*Immunoematologia*” Mediserve s.r.l., 2007.
- “*Technical Manual*” AABBeditore- Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide
- Ortho Diagnostic System S.p.A. “*Antigeni ed anticorpi gruppo ematici.*”
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, e Suresh Pillai. “*Immunologia Cellulare e Molecolare: Edizione Aggiornata.*” Elsevier srl, 2011.
- Lichtman, Andrew H., Abul K. Abbas, e Shiv Pillai. “*Le basi dell’immunologia: Fisiopatologia del sistema immunitario.*” Edra Masson, 2015.
- Spagnoletti G., Ciavarella N. “*Ematologia e emostasi*” UTET, 1993
- DiaMed ITALIANA- MANUALE OPERATIVO

#### **SITI INTERNET CONSULTATI**

- <http://www.fidas-emiliaromagna.it/web/storia-ed-origini-della-trasfusione/>
- <https://www.avis.it/donazione/la-donazione/>
- <https://fidas.it/perche-donare-sangue/>
- <https://www.avis.it/2001/01/25/decreto-del-ministero-della-sanita-del-25-gennaio-2001/>
- <https://www.avis.it/donazione/il-sangue/>
- <http://ebook.scuola.zanichelli.it/sadavabiologiablu/il-corpo-umano/l-apparato-cardiovascolare-e-il-sangue/la-composizione-e-le-funzioni-del-sangue#17280>
- <https://www.centronazionale sangue.it/>
- <http://www.simti.it/>

## **RINGRAZIAMENTI**

*A conclusione di questo lavoro, che rappresenta, non solo l'ultimo anno universitario, ma racchiude tutti gli sforzi, le soddisfazioni e le delusioni, che hanno portato ad una grande crescita personale.*

*Voglio ringraziare innanzitutto la mia relatrice, la Dott.ssa Prucca e la mia correlatrice, la Dott.ssa Tornello, per il sostegno e l'appoggio dimostratomi. Ringrazio il personale tecnico del Centro Trasfusionale di Cuneo che mi ha aiutato nella mia crescita professionale e ringrazio le dottoresse, i tecnici e gli infermieri del Centro Trasfusionale e del Laboratorio Analisi di Mondovì, con cui ho trascorso la maggior parte del tirocinio. Ho scoperto in loro delle persone splendide, sia dal lato professionale, che da quello personale. Li ringrazio di cuore, perché mi hanno accolta come parte di una famiglia, non avrei potuto chiedere di meglio a conclusione del mio percorso.*

*Ringrazio la mia coordinatrice, i tutor di tirocinio, le guide di tirocinio e i docenti che mi hanno seguita in questi anni e hanno condiviso con me il loro sapere, portandomi allo sviluppo di un bagaglio professionale.*

*Ringrazio la mia famiglia, la mia prima sostenitrice. Ringrazio Andrea, per l'amore e per la pazienza costante. Grazie alle mie amiche, le mie spalle, che mi hanno sempre saputo incoraggiare in ogni situazione. Non ultima, grazie alla mia compagna Titti, senza di lei non sarei arrivata dove sono, con lei ho scoperto un'amicizia vera.*

*In conclusione, voglio dedicare questo lavoro ad una persona speciale, che purtroppo non potrà essere al mio fianco fisicamente come vorrei e non potrà assistere alla presentazione di questo elaborato, ma che spero di aver reso infinitamente orgoglioso, perché ogni successo è sempre stato dedicato*

*a lui.*

*Grazie.*

*Cecilia*