

ABSTRACT TESI sessione autunnale 2019

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico sede di Cuneo

BELLONE Enrica

Relatore: prof.ssa Dell'Oste Valentina

VALUTAZIONE DI UN METODO RAPIDO DI ESECUZIONE DEGLI ANTIBIOGRAMMI: CONFRONTO CON IL METODO UTILIZZATO IN ROUTINE

La sepsi persiste come principale causa di mortalità e morbosità globale: si stima che tuttora al mondo siano colpite 30 milioni di persone di cui 6 milioni vengono condotte a morte. L'esame *gold standard* per la diagnosi microbiologica di sepsi è rappresentato dall'emocoltura. Tale esame è pertanto urgente e necessita di *Turn Around Time* (TAT) minimo per impostare una *antibiotic stewardship* ottimale per il paziente.

Lo studio valuta l'attendibilità dei risultati di test combinati per identificazione ed antibiogramma (ID/AST) automatici su Phoenix M50 (BD) allestiti da patina ottenuta da emocoltura confrontati con la metodica validata da colonia, per anticipare la refertazione finale di 24 ore.

Da giugno 2018 ad agosto 2019 sono state valutate 91 emocolture positive la mattina e processate con protocollo standard fino all'identificazione ed antibiogramma da colonia. Dopo la colorazione di Gram, è stata effettuata la semina per l'isolamento delle colonie e l'allestimento dei pannelli combinati ID/AST per il sistema Phoenix M50 (BD) il giorno seguente. Per la stessa emocoltura si è proceduto all'allestimento degli stessi pannelli partendo da patina ottenuta dopo 6-8 ore d'incubazione. I risultati ottenuti da patina (TAT: 24 ore) e da colonia (TAT: 48 ore) sono stati confrontati per identificazione del germe, confidenza percentuale, MIC e relative interpretazioni (Sensibile-S; Sensibile a dosi incrementate-I; Resistente-R). Sono stati valutati l'*Essential Agreement* (E.A.) per le MIC e il *Categorical Agreement* (C.A.) fra le interpretazioni. Per le combinazioni germe/classe di antibiotici valutate, sono stati calcolati il "*Very Major Error*" (VME), indice di falsa sensibilità della patina rispetto alla colonia, il "*Major Error*" (ME), indice di falsa resistenza e il "*minor Error*" (mE), ovvero lo scambio fra interpretazioni (S, I, R) adiacenti.

Sono state escluse a priori le emocolture polimicrobiche al Gram e a posteriori quelle tali dopo la semina.

Il confronto dei risultati delle identificazioni ha mostrato un'identità del 98% con 2 errori per Stafilococchi Coagulasi-negativi (CoNS). La confidenza percentuale è stata superiore nel 20% delle patine rispetto alla colonia e inferiore nel 12%, con una variabilità del $\pm 2\%$.

L'E.A. ottenuto è, in media, del 97,2% (MAX: 99,1%; min: 96,2%); il C.A. ottenuto è, in media, del 97,2% (MAX: 99,3%; min: 96,5%), con massimi per *S. aureus* e minimi per i CoNS.

I VME, ME e mE sono risultati minimi (<1%) quando calcolati sul totale delle combinazioni germe/antibiotico considerate.

Per le combinazioni germe/classe di antibiotici valutate, si sono avuti E.A. e C.A. inferiori al 95% per i Glico/Lipopeptidi per gli Enterococchi. Gli Stafilococchi hanno avuto C.A. minimo per le Cefalosporine (88,9%) e le Tetracicline (93,2%) con discordanze principalmente a carico dei CoNS. Le Enterobatteriacee hanno mostrato minimi E.A. per Tetracicline (93,5%) e Fluorochinoloni (94,6%).

In conclusione, l'ID/AST automatico da patina può essere un valido aiuto nella rimodulazione della terapia con un anticipo di 24 ore con la necessaria collaborazione fra Laboratorio e Clinico e può essere un'alternativa a test più rapidi e costosi la cui applicabilità risulti ridotta dall'organizzazione dei singoli Laboratori.

È comunque necessario aumentare la casistica per coprire i germi e le combinazioni meno rappresentate.

BONELLI Cecilia

Relatore: dott.ssa Prucca Maristella

INCIDENZA DELL'ALLOIMMUNIZZAZIONE ANTIERITROCITARIA NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TERAPIA TRASFUSIONALE

Lo scopo del lavoro eseguito è la rilevazione dell'incidenza dell'alloimmunizzazione antieritrocitaria nei pazienti sottoposti a terapia trasfusionale. La terapia trasfusionale è un trattamento di elezione nella gestione di patologie caratterizzate da anemia cronica e nel trattamento di anemie acute, per cui la trasfusione di emocomponenti può essere salvavita, come nel caso di interventi chirurgici, traumi ed emorragie. Le complicanze della terapia trasfusionale possono essere molteplici e tra queste di notevole importanza è l'alloimmunizzazione antieritrocitaria. L'alloimmunizzazione antieritrocitaria consiste nello sviluppo, da parte del paziente che riceve una trasfusione ematica, di anticorpi antieritrocitari rivolti verso antigeni espressi sulle emazie trasfuse e presenta una correlazione fondamentale tra la diversità antigenica del donatore e

quella del ricevente. Si tratta di una complicanza importante poiché di seguito allo sviluppo di tali anticorpi, definiti come “irregolari”, il paziente dovrà essere trasfuso con emocomponenti non recanti l’antigene contro cui il sistema immunitario ha sviluppato anticorpi, limitando le risorse disponibili per il paziente stesso. L’incidenza di tale complicanza risulta correlata a diverse variabili: l’immunogenicità dell’antigene eritrocitario, lo stato immunologico del ricevente al momento della trasfusione e la frequenza della terapia trasfusionale.

Nel lavoro vengono valutati retrospettivamente i dati riguardanti la ricerca di alloanticorpi antieritrocitari attraverso i risultati del Test di Coombs Indiretto, 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 1° semestre 2019. Tale ricerca ha evidenziato fondamentalmente la frequenza dell’alloimmunizzazione sulla popolazione di pazienti in esame, suddividendo il gruppo iniziale di pazienti con TCI positivo (225) in base all’associazione del TCI ad una richiesta trasfusionale (171) o meno (54). È stata valutata quindi la frequenza dell’alloimmunizzazione nei pazienti con TCI positivo associato a richiesta trasfusionale in base a: età, sesso e patologia di base. Infine il gruppo di pazienti con TCI positivo associato a richiesta trasfusionale è stato ulteriormente suddiviso in base alla pregressa esposizione (100) o meno (71) a trasfusioni di emazie concentrate. Sono state quindi descritte le specificità anticorpali identificati e la loro frequenza di rilevazione. L’incidenza dell’alloimmunizzazione è stata calcolata utilizzando come denominatore il totale dei pazienti con richiesta trasfusionale, presenti nei due Ospedali nel periodo di osservazione (10246), sul totale di pazienti con TCI positivo associato a richiesta trasfusionale. La percentuale di alloimmunizzazione è pari al 1,7%, dato che rientra nella casistica riportata nei vari studi presenti in letteratura.

GALLIANO Emanuele

Relatore: dott.ssa UNGARI Silvana

BIOMARCATORI DI FARMACOTOSSICITA’ NELLA TERAPIA PERSONALIZZATA DEL CARCINOMA COLORETTALE CON FLUOROPIRIMIDINE E CAPECITABINA: DAL LABORATORIO ALLA CLINICA.

La Farmacogenetica nasce dalla fusione di più discipline quali la genetica, la biochimica e la farmacologia: il termine fu coniato nel 1959 da Friedrich Vogel, con l’intento di caratterizzare gli studi che si occupavano dell’influenza della genetica sulla risposta farmacologica. L’efficacia della terapia dipende infatti da molti fattori, tra i quali, quelli genetici: la presenza di varianti stabili del DNA (polimorfismi) a livello dei geni codificanti per gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, può provocare l’aumento o la riduzione, in termini di funzionalità, degli stessi. Ciò può influenzare la risposta al trattamento farmacologico. Al giorno d’oggi, dato lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento, si parla di Farmacogenomica, scienza concettualmente analoga alla Farmacogenetica ma con l’estensione dello studio all’intero genoma e non più rivolto a singoli geni. Queste due nuove scienze hanno portato alla nascita della Medicina Personalizzata, una moderna concezione della medicina secondo la quale il trattamento terapeutico deve essere programmato sulla base delle caratteristiche individuali di ogni paziente. Le Fluoropirimidine (5-Fluorouracile e Capecitabina) sono tra i chemioterapici più utilizzati in oncologia per il trattamento di molti tumori solidi: in questo lavoro di tesi è stato preso in esame il carcinoma del colon-retto. Il 5-Fluorouracile (5-FU) è un farmaco antitumorale che agisce bloccando la fase S del ciclo cellulare e quindi la replicazione; ciò avviene attraverso due meccanismi: il primo porta all’inibizione della sintesi del DNA, il secondo determina il blocco della sintesi proteica e l’aumento degli stimoli pro-apoptotici. Per quanto riguarda la Capecitabina, un profarmaco del 5-FU somministrato per via orale, essa viene bio-trasformata nella forma attiva in corrispondenza del sito neoplastico ed è, per questo motivo, utilizzata come alternativa terapeutica in caso di tossicità di alto grado nel paziente trattato con 5-FU. In entrambi i casi, tuttavia, il trattamento può essere associato a inefficacia terapeutica o a grave tossicità nel soggetto in relazione alla presenza di alcuni polimorfismi dei geni codificanti per i tre principali enzimi coinvolti nel metabolismo dei suddetti farmaci. Tali enzimi sono: diidropirimidina deidrogenasi (DPYD), metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR) e timidilato sintetasi (TYMS). Le varianti analizzate per questi geni (DPYD IVS14+1 G>A, DPYD A2846T, DPYD T1679G, MTHFR C677T, MTHFR A1298C e T5012C) possono causare l’aumento o, più spesso, la riduzione della funzionalità del prodotto proteico per cui codificano; ciò comporta, nel primo caso, una scarsa efficacia terapeutica e, nel secondo, manifestazioni di tossicità anche gravi tra cui diarrea, stomatite, neutropenia e sindrome mano-piede (hand-foot syndrome). Il carcinoma del colon retto (CRC) è uno dei principali tumori maligni in termini di frequenza, incidenza e mortalità in Europa, con un picco di diagnosi di nuovi casi nella settima decade di età: la chirurgia, associata a chemio-radioterapia adiuvante (post-chirurgica) o neoadiuvante (pre-operatoria), rappresenta ad oggi la principale terapia. Lo studio è stato condotto su 51 soggetti (31 dei quali affetti da carcinoma coloretale e 20 costituenti la popolazione sana) a partire da campioni di sangue intero periferico prelevato all’interno di provette da 5 mL contenenti EDTA tripotassico come anticoagulante. È stato estratto il DNA genomico con metodica

automatica, amplificato con PCR end-point mediante lo strumento Rotor-Gene ed in seguito sequenziato con la metodica del pyrosequenziamento per i polimorfismi (5 dei 6 indagati) dei seguenti geni: DPYD e MTHFR. Il materiale genomico estratto per il gene TYMS è stato amplificato con la metodica PCR end-point e la rivelazione è stata effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio preparato in laboratorio. Lo scopo di questo lavoro è stato verificare la applicabilità alla routine di laboratorio di test molecolari per la identificazione di marcatori genetici predittivi di rischio di eventi avversi alla terapia farmacologica e la loro potenziale utilità clinica ai fini della personalizzazione del trattamento. I risultati hanno dimostrato che il 42% dei pazienti affetti da carcinoma del colon e da noi esaminati ha minore probabilità di risposta al trattamento con 5-fluorouracile ed il 48% dei medesimi ha un aumentato rischio di tossicità.

GRECO MIANI Titti Martina

Relatore: prof.ssa Dell'Oste Valentina

MANIPOLAZIONE GENETICA DEL CITOMEGALOVIRUS UMANO ATTRAVERSO BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOMES (BAC)

Il citomegalovirus umano (HCMV) è β -herpesvirus a doppio filamento di DNA, appartenente alla famiglia *Herpesviridae*. L'infezione da HCMV è molto comune negli individui immunocompetenti, in cui spesso è asintomatica, mentre rappresenta un importante agente patogeno opportunistico tra soggetti immunocompromessi, come pazienti affetti da AIDS e trapiantati. HCMV è anche la causa infettiva più comune di difetti alla nascita, con infezione congenita nel neonato, causata da infezione primaria o riattivazione nella donna in gravidanza.

La replicazione di HCMV all'interno della cellula ospite inizia a livello del nucleo, dove avviene la replicazione del genoma e l'assemblaggio del nucleocapside, che in seguito trasloca dal nucleo al citoplasma per la maturazione completa del virione. Il complesso processo di replicazione virale implica il ruolo fondamentale di diverse proteine, senza le quali il virus non sarebbe in grado di replicare. Questi geni fondamentali alla replicazione vengono definiti "essenziali". Tra questi, il gene UL70, codifica per una proteina denominata pUL70, di 107 kDa identificata come primasi virale. Si tratta di una RNA polimerasi DNA-dipendente che si associa ad altre due proteine virali, pUL105 e pUL102, a formare il complesso elicasi-primasi di HCMV, necessario per la replicazione virale.

In questo lavoro di tesi, grazie all'utilizzo della tecnologia dei "Bacterial Artificial Chromosomes" (BAC), sono stati generati e caratterizzati virioni mutati a livello di due siti specifici del gene UL70, G294 e R465, attraverso una mutagenesi definita "En Passant", allo scopo di definire in che modo la proteina mutata potesse influire sulla replicazione di HCMV.

La crescita dei virus mutanti *in vitro* è stata successivamente caratterizzata su fibroblasti ottenuti da prepuzio (HFF) e cellule epiteliali ottenute dalla retina (ARPE-19) attraverso la tecnica "Focus Expansion Assay". Questo approccio ha permesso di evidenziare differenze nelle modalità di diffusione dei virus nelle due linee cellulari, presentando una diffusione extracellulare a livello delle HFF e una diffusione focale a livello delle ARPE-19. Inoltre, la quantificazione delle copie di genoma virale, attraverso Real Time RT-q-PCR, ha riscontrato un aumento del numero di copie, in entrambe le linee cellulari, nei virus mutanti rispetto al virus wild type, ad indicare che la mutazione indotta a livello del gene UL70 può aver incrementato l'efficacia della replicazione di HCMV. Questi risultati dimostrano un ruolo di rilievo di specifici siti di UL70 nella regolazione del genoma di HCMV, con possibili implicazioni sul loro impatto durante la patogenesi del virus *in vivo*.

NOE' Celeste Andrea

Relatore: dott.ssa UNGARI Silvana

INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI: RAPPRESENTAZIONE DELLO SCENARIO IN DIFFERENTI TIPI DI TUMORE UMANO ED IMPLICAZIONI IN IMMUNOTERAPIA

In genetica medica i microsatelliti si definiscono quali sequenze nucleotidiche costituite da motivi ripetuti in tandem di 1-6 paia di basi distribuite lungo l'intero genoma.

Nonostante l'alto livello di polimorfismo nella popolazione generale, la lunghezza delle sequenze ripetute in un individuo permane costante per tutta la vita ed è uguale in ogni tessuto.

Pertanto nelle cellule sane l'estensione dei microsatelliti è mantenuta stabile attraverso il meccanismo multienzimatico del Mismatch Repair (MMR) deputato alla correzione di appaiamenti errati di singoli nucleotidi e di piccole di inserzioni e delezioni che si originano durante la replicazione del DNA.

Alterazioni a carico di MMR impediscono la riparazione di questi errori favorendo l'instabilità delle sequenze nei microsatelliti (*MSI, Microsatellite Instability*) che è "sintomo" molecolare di aumentato rischio di mutazioni in oncogeni e nei geni oncosoppressori.

Nell'uomo l'inattivazione del complesso multienzimatico MMR può essere causata da alterazioni somatiche epigenetiche (prevalentemente ipermetilazione del promotore del gene MLH1), da mutazioni germinali nei geni MLH1, MSH2 o, più raramente, di MSH6 e PMS2 con inattivazione somatica del secondo allele (Sindrome di Lynch) o da doppia mutazione somatica nei geni MMR (Lynch-like syndrome).

Autorevoli lavori scientifici sottolineano l'associazione tra prognosi ed instabilità dei microsatelliti: pazienti affetti da tumori con alta instabilità microsatellitare (MSI-H) presentano una maggiore sopravvivenza rispetto a pazienti con neoplasie con stabilità microsatellitare (MSS).

Recenti evidenze, inoltre, indentificano lo stato MSI quale fattore predittivo di risposta alla terapia basata su farmaci inibitori del controllo immunitario. L'efficacia dell'immunoterapia, dimostrata in alcuni studi di fase I-II, trova il suo razionale biologico nella presenza di un elevato carico mutazionale dei tumori MSI-H con conseguente presenza di numerosi neo-antigeni che determinano attivazione di una risposta immunitaria anti-tumorale ed una elevata infiltrazione linfocitaria.

Sulla base dei dati clinici incoraggianti, il 23 maggio 2017 la Food and Drug Administration ha concesso l'impiego del pembrolizumab (anticorpo anti PD-1) per tutti i tumori con elevato tasso di instabilità microsatellitare (MSI-H).

Il 10 luglio 2018 l'ente governativo statunitense ha approvato l'utilizzo dell'anticorpo anti CTLA-4 ipilimumab, in associazione a nivolumab (anti PD-1) nel tumore del colon-retto metastatico ad elevata instabilità microsatellitare o con deficit nella riparazione del mismatch in pazienti di età ≥ 12 anni in progressione dopo precedente trattamento.

La determinazione dello stato MSI si esegue in routine per la neoplasia coloretta; l'intento della mia analisi è stato quello di valutare la presenza di questa forma di instabilità genetica in 16 differenti tipologie di neoplasie al fine di individuare coorti di tumori potenzialmente suscettibili alla terapia basata su farmaci inibitori dei checkpoint immunitario.

Per tale scopo è stato valutato il DNA tumorale proveniente da 187 pazienti selezionati in modo random dai registri di Genetica e Biologia Molecolare dell'azienda ospedaliera S. Croce e Carle di Cuneo, dal 2009 al 2019.

L'analisi mutazionale è stata eseguita su DNA estratto mediante l'utilizzo dell'analizzatore automatico Maxwell®16 IVD Instrument dell'azienda Promega e quantificato con il fluorimetro Quantus Fluorometer (Promega).

Per valutare il grado di instabilità dei microsatelliti i campioni sono stati amplificati in vitro mediante tecnica di PCR, utilizzando il sistema di analisi MSI versione 1.2 (Promega) contenente un pannello di primer fluorescenti per la co-amplificazione di cinque marcatori di ripetizione mononucleotidica (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27) e due marcatori di ripetizioni pentanucleotidici (Penta C e Penta D).

La separazione dei prodotti di PCR è stata eseguita mediante elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer e l'analisi è stata ottenuta utilizzando il programma GeneMapper® di Applied Biosystems.

I risultati derivati dall'indagine hanno rilevato instabilità microsatellitare in 32 campioni su 187, ovvero nel 17.11%.

Questa forma di instabilità genetica è stata riscontrata in 9 di 16 coorti di tumore esaminate con i valori più elevati nella neoplasia coloretta e più bassi nella neoplasia mammaria. Percentuali elevate di instabilità sono state osservate altresì nelle neoplasie gastrica, melanoma, tumore cerebrale, neoplasia endometriale e vescicale.

Nella casistica considerata non è stata identificata instabilità microsatellitare in 6 coorti di neoplasie quali tumore dell'esofago, del pancreas, della tiroide, del fegato, del peritoneo, del mesotelio e leucemie/linfomi.

Sulla base del ruolo predittivo e prognostico dei marcatori microsatellitari ed in virtù dell'elevata prevalenza di instabilità genetica nelle neoplasie maligne, è crescente l'interesse da parte dei clinici nell'ampliare la valutazione dello stato MSI a più tipi di tumore nell'ottica dell'utilizzo di questa caratteristica biologica sia quale criterio predittivo e prognostico sia come parametro per la stratificazione dei pazienti candidati alla terapia.

PALAZZI Scila

Relatore: dott.ssa Prucca Maristella

RUOLO DEL TECNICO DI LABORATORIO NEL PROCESSO DI MANIPOLAZIONE E CRIOPRESERVAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI ALLA LUCE DEGLI STANDARDS JACIE

Lo scopo del lavoro eseguito è descrivere le diverse attività svolte dal tecnico di laboratorio biomedico (TSLB) all'interno del Laboratorio di Manipolazione dell'Ospedale Santa Croce e Carle di Cuneo, in Criobanca e nel Reparto Clinico. Uno dei suoi compiti è la manipolazione delle cellule staminali (CSE): segue tutto il processo dall'accettazione della sacca contenente le staminali fino alla consegna del prodotto all'Unità Clinica per un eventuale trapianto. Il tecnico svolge attività "in vivo", ovvero strettamente

trapiantologiche, come la manipolazione minima delle CSE e la successiva criopreservazione (per il mantenimento delle caratteristiche morfologiche e funzionali) e crioconservazione per la conservazione a lungo termine del prodotto cellulare; e attività "in vitro" come la processazione di campioni di sangue periferico e sangue midollare, la colorazione dei vetrini con May-Grunwald Giemsa e la stesura di alcune procedure.

Questa tesi ha messo in evidenza il ruolo del TSLB nell'esecuzione delle attività manuali, nella gestione delle unità di CSE e nella convalida dei processi. Sono state evidenziate le responsabilità relative alla manipolazione, criopreservazione e validazione del prodotto per una possibile reinfusione nel paziente. Il tecnico deve essere formato adeguatamente e deve eseguire la convalida di alcuni processi secondo gli standard Jacie e la documentazione del Centro Nazionale Trapianti.

RIBA Simone

Relatore: dott.ssa Prucca Maristella

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI ALLELI HLA: PROTOCOLLO OPERATIVO DEL CENTRO DONATORI DI MIDOLLO OSSEO DI CUNEO PER LA DEFINIZIONE E L'INSERIMENTO NEI DATABASE INTERNAZIONALI

Il laboratorio di Tipizzazione Tissutale del Centro Donatori di Midollo Osseo di Cuneo dal 1994 ad oggi si occupa della tipizzazione HLA dei donatori di midollo osseo, dei pazienti ematologici e dei loro familiari, nonché di pazienti che presentano patologie autoimmuni correlate all'HLA. Requisito essenziale per svolgere tale attività è che il laboratorio sia accreditato dall'EFI (European Federation of Immunogenetics) e che partecipi a progetti di controlli di qualità esterni gestiti da strutture riconosciute dall'ente stesso, quali l'Istituto Superiore di Sanità, ISS, di Roma. Durante la normale attività di tipizzazione è possibile imbattersi nella scoperta di nuove sequenze alleliche mai descritte alle quali non è mai stato assegnato un nome ufficiale da parte del Comitato Internazionale per la Nomenclatura della WHO. Dal 2012 ad 2018 nel laboratorio cuneese su un totale di 4275 campioni ripartiti tra 3873 donatori, 332 pazienti e 70 controlli di qualità tipizzati in alta risoluzione sono stati trovati 4 nuovi alleli su 4 loci HLA differenti: HLA-A*02:393, HLA-B*27:02:04, C*15:159 e DRB1*11:196. La caratterizzazione di nuovi alleli avviene sempre mediante sequenziamento e richiede innanzitutto la ripetizione del dato con una seconda reazione e su un nuovo campione e la riconferma con altre metodiche, quali SSO ed SSP. Trattandosi di un nuovo allele HLA è necessario che ad esso venga assegnato un nome ufficiale e che la sequenza del nuovo allele sia depositata nelle banche dati internazionali. Pertanto è indispensabile l'inserimento della nuova sequenza allelica dapprima in un database di sequenze genomiche, quali GenBank e, successivamente, in un database specifico per il sistema HLA, com'è appunto l'IMGT/HLA. Negli ultimi anni, alcuni laboratori di tipizzazione tissutale hanno acquisito, anche in routine, la nuova metodica NGS, Next Generation Sequencing, e ciò, se da un lato permetterà di risolvere sempre più efficacemente le ambiguità, dall'altro aumenterà in modo esponenziale la probabilità di ritrovare nuovi alleli e varianti presenti anche in regioni non codificanti dei geni HLA.