



Il mondo degli Ab anti-HLA: 50 anni di storia

L'esperto risponde

Emanuele Cozzi, MD, PhD

S.S.D. Immunologia dei Trapianti

Azienda Ospedaliera di Padova

Una osservazione importante

Il 50% dei malati perde l'organo entro
15 anni dal trapianto

La maggior parte delle perdite “tardive” del rene dopo il trapianto è causata dalla **presenza di anticorpi** diretti contro il donatore

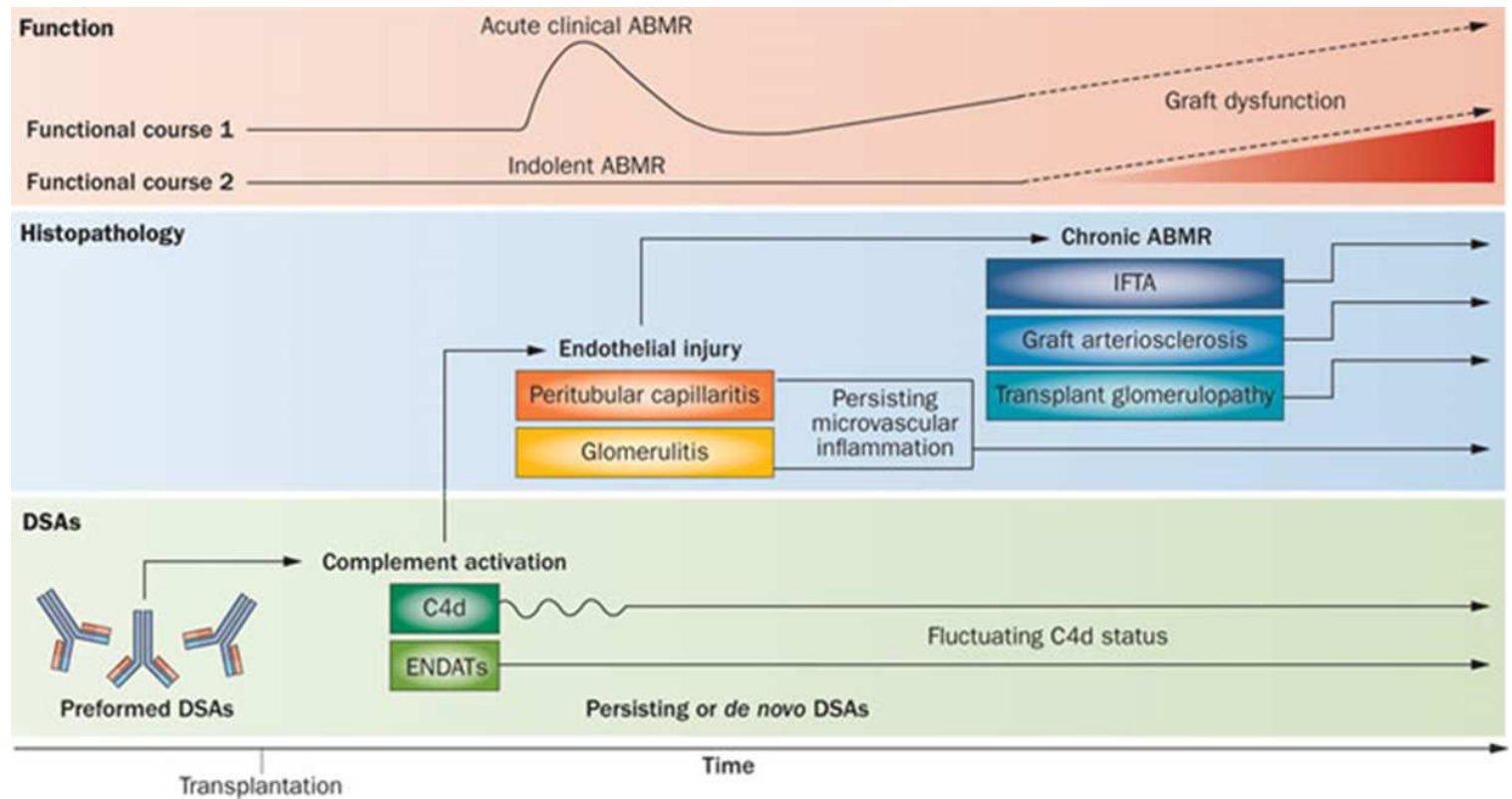
[Colvin et al, Nat. Rev. Nephrol 2012]

Storia naturale del danno mediato dagli anticorpi

Stage III:
Function

Stage II:
Pathology

Stage I:
DSA



[Loupy et al, Nat Rev Nephrol 2012]

Quali anticorpi?

Anticorpi importanti nel trapianto di rene

- Anti HLA
- Anti non-HLA:
 - MICA
 - MICB
 - AT1R
 - Perlacan,
 - Vimentin...

Chi è il paziente con anticorpi anti-HLA?

Il paziente [iper]immune

- Per immune, si intende un paziente che presenta anticorpi solitamente diretti contro gli antigeni HLA (pazienti con PRA positivo).
- Il paziente con PRA $\geq 80\%$ viene detto iperimmune

Il trapianto di rene nel paziente iperimmune: gravità del problema

- 25% soggetti in lista sono immunizzati (hanno anticorpi anti-HLA)
- 12% soggetti in lista sono iperimmunizzati (PRA \geq 80%)

Il trapianto di rene nel paziente iperimmune: gravità del problema

- 25% soggetti in lista sono immunizzati (hanno anticorpi anti-HLA)
- 12% soggetti in lista sono iperimmunizzati (PRA ≥ 80%)

**Lunga attesa
(>10aa)**

**Rischio
aumentato**

**Rischio di NON
utilizzo di molti
donatori viventi**

Quali sono gli eventi immunizzanti?

Cause di immunizzazione

- Gravidanza
- Trasfusione
- Trapianti precedenti
- *DSA de novo*

Immunizzazione e gravidanza: Frequenza delle sensibilizzazioni

	Ratio cut-off	MFI>1000	Child- specific Ab
First live birth	70%	33%	21%
Second live birth	84%	62%	37%
≥ Third live birth	92%	75%	46%

- Hierarchy of sensitization (B>A>DRB1>C)
- A/B homozygosity is associated with a higher rate and broadness of sensitization

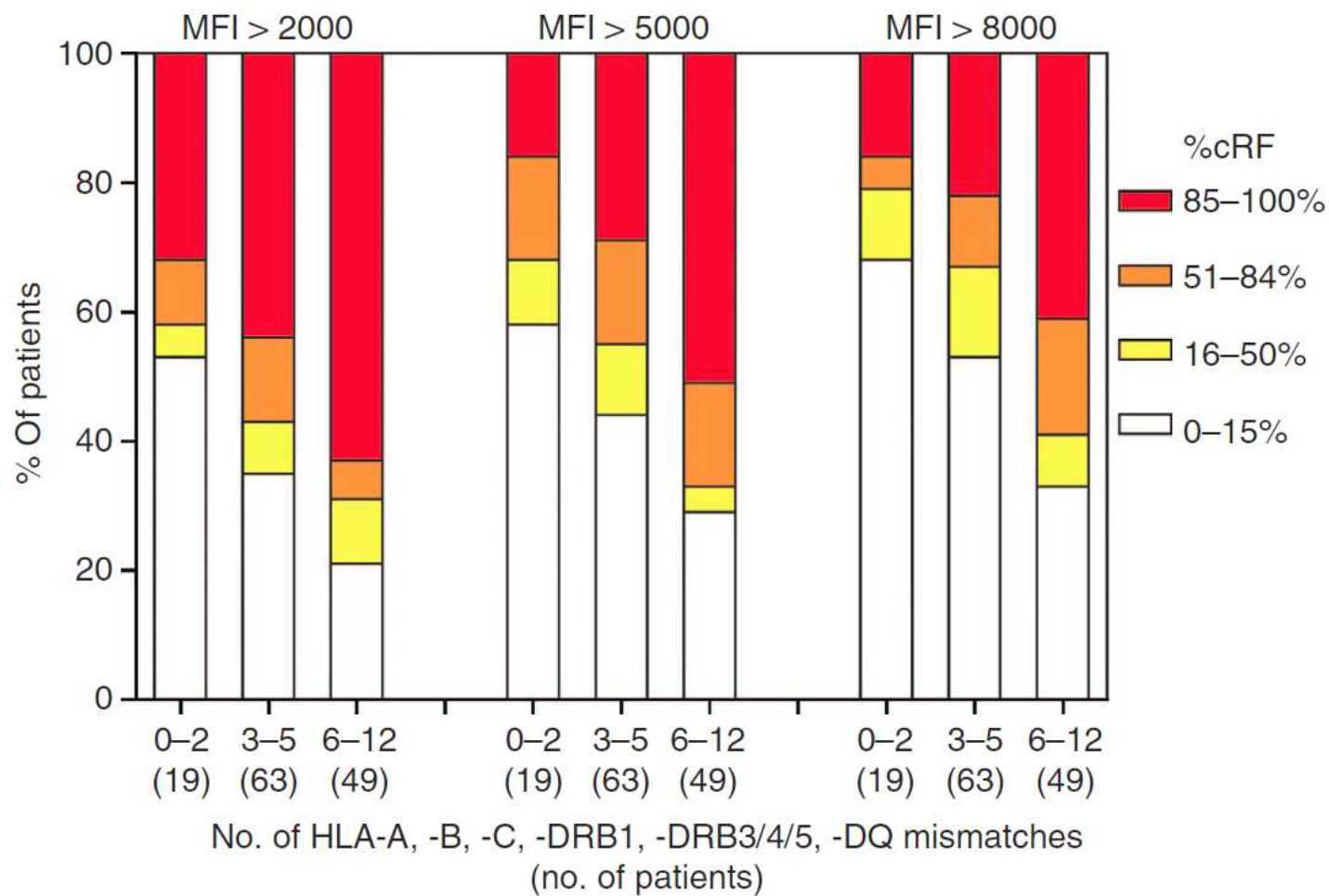
[Honger et al, AJT 2013]

Malato «HLA-incompatibile» e trasfusione: Frequenza delle sensibilizzazioni

Recipient	%sensitized		
	CDC	Solid phase	Titer
Transfusions alone			
Recent	10–12	10	Low
Distant		<2	
Children	35	35	Medium
Multiple	50 and up		Medium-high
Previous pregnancies alone			
Plus transfusions	5	24–33	Low-medium
Previous transplants alone			
Plus transfusions	40	52	High
Previous transplants alone			
Plus transfusions	17	72	Low-high
Plus transfusions			
	60–78		High

[Scornik et al, AJT 2011]

Frequenza delle sensibilizzazioni HLA in malati con precedenti trapianti



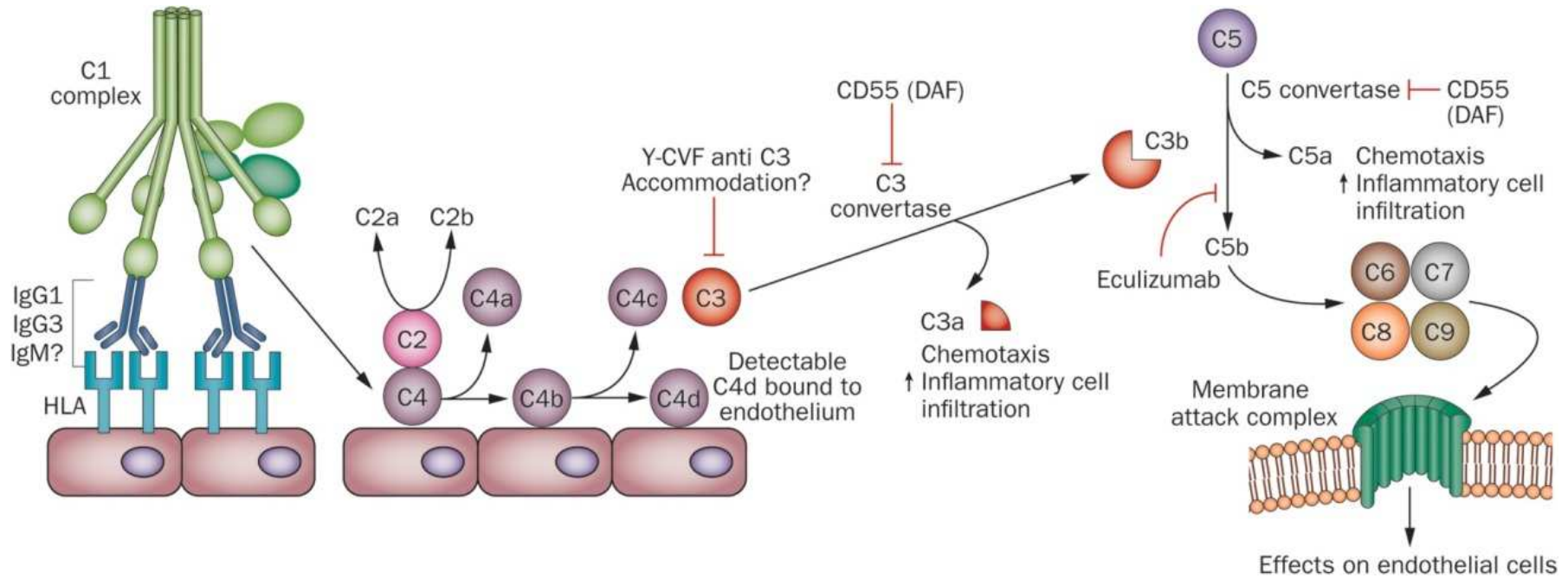
[Kosmoliaptsis et al, KI 2014]

Unexpected conditions associated with anti-HLA antibodies

- HLA-specific antibodies been demonstrated in non-transplanted nor transfused males
- It is possible that molecular mimicry between HLA molecules and some viruses and bacteria may induce alloreactive antibodies and T cell reactivity

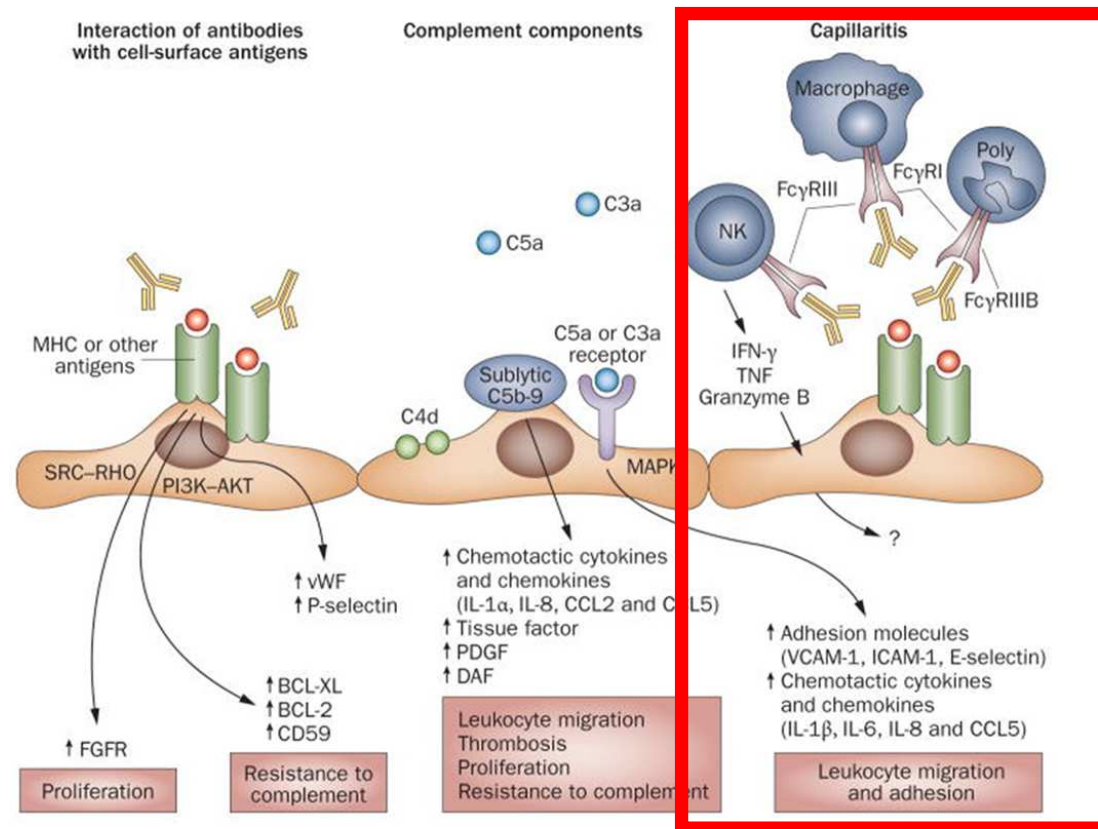
How do donor-specific antibodies lead to graft damage?

Complement-mediated graft damage



[Stegall et al, Nat Rev Nephrol 2012]

Complement-independent graft damage



Antibody mediated rejection is a «dynamic process»

It is influenced by the balance
between:

- The damage caused by DSA
- the ability of tissue to repair injury
- the efficacy of immunosuppression
to prevent or block AMR

Objective of the current antibody screening methods

Detect and assess antibodies for three major characteristics relevant to transplant outcomes:

- Specificity
- Isotype
- Strength

Techniques to detect donor-specific antibodies (DSAs)

Sensitivity

- CDC: lytic DSA Low sensitivity
- Elisa: lytic and non-lytic DSA Medium sensitivity
- Flow/Luminex: lytic and non-lytic DSA High sensitivity

Quali sono le molecole HLA importanti nel rigetto anticorpo-mediato?

Molecole HLA importanti nel rigetto anticorpo-mediato

- Anticorpi anti-HLA classe I (HLA-A, B e C)
- Anticorpi anti-HLA classe II (HLA-DR, DQ e DP)

Se presenti ad alto titolo, anticorpi diretti contro ciascuna di queste specificità HLA può causare un **rigetto iperacuto**

Classi e subclassi anticorpali

Accesso al trapianto e cross match

Solitamente il trapianto viene eseguito in pazienti con crossmatch citotossico negativo :

cioè in assenza nel siero [corrente] di anticorpi anti-HLA donatore-specifici di classe IgG che danno lisi dei linfociti del donatore.

Evolving techniques to detect donor-specific antibodies (DSAs)

Class and Sub-classes

- Class (IgM)
- Subclasses

some Ig subclasses are more «harmful»?

Preexisting IgM DSA: do they matter?

What about IgM DSA?

- IgM develop early in many immune responses
- They are good antigen binders and agglutinators;
- They fix complement
- However, it was widely believed that IgM antibodies are not harmful to the graft.

Positive crossmatches due to IgM class have generally not been considered a contraindication for transplantation.

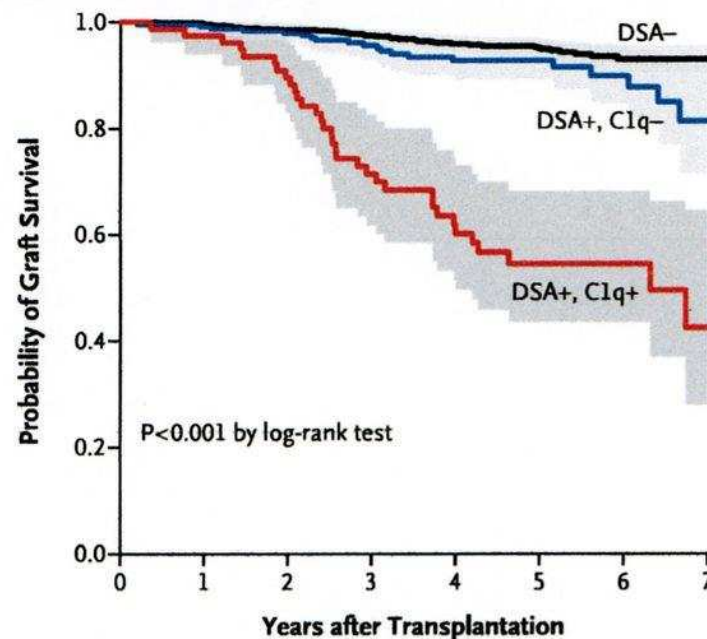
What about IgM DSA? (III)

- **IgM** DSA **prior** to transplantation predicted rejection of kidney allografts and the development of **TCAD** in heart transplants.
- There is no switch from IgM to IgG before the development of significant chronic rejection in heart transplants.
- The role of IgM may be more important than originally thought and deserves further evaluation.

DSA testing: Reliability, risk stratification and clinical practice

Role of C1q⁺ DSA

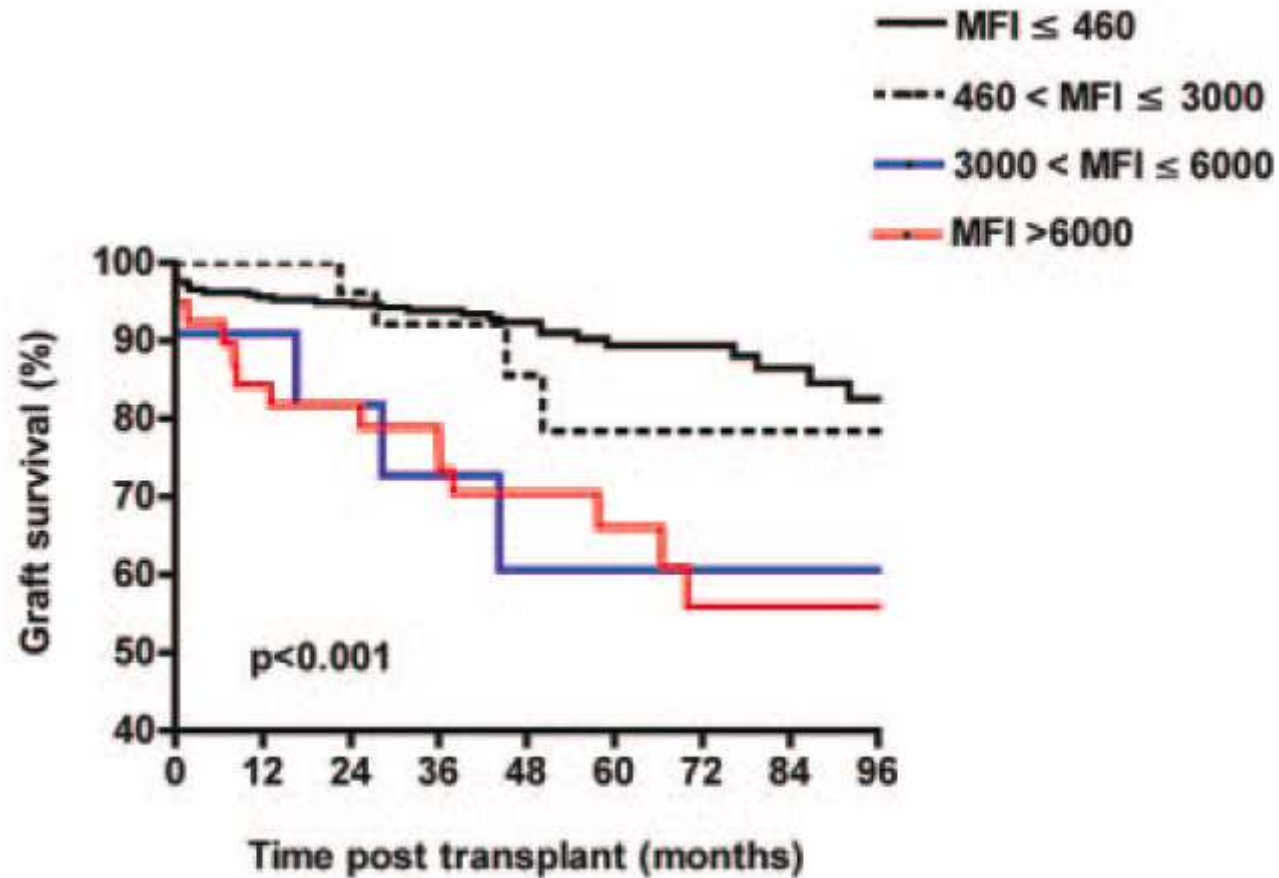
B Kidney-Allograft Survival According to DSA and C1q Status



No. at Risk	0	1	2	3	4	5	6	7
DSA-	700	698	667	612	504	338	164	38
DSA+, C1q-	239	237	227	181	139	80	44	14
DSA+, C1q+	77	75	68	48	37	20	12	5

[Loupy et al, NEJM 2013]

Immunological risk and DSA «strenght» (MFI)



[Lefaucheur et al, JASN 2010]

Immunological risk: AMR and «strenght» of preexisting DSA

	RR	95% CI	P-value
No DSA (reference)	1.0		
DSA MFI 1000–2999	–	–	1.0 ^a
DSA MFI 3000–5999	65.3	14.7–289.6	<0.001
DSA MFI ≥ 6000	156.8	37.6–653.1	<0.001

Nessun test di misurazione degli anticorpi
anti-HLA è perfetto

Nessun test di misurazione degli anticorpi anti-HLA è perfetto: alcune criticità

Antibody screening

Method ^a	Target antigens
CDC	Cell panel of known HLA phenotypes
ELISA	Pooled HLA Ags
IF-Bead ^b	Pooled HLA Ags

- Limitazioni legate a panel, sensibilità e vitalità cellulare
- Specificità rare!
- Specificità rare!

Nessun test è perfetto: alcune criticità

Antibody identification

Method ^a	Target antigens
CDC	Cell panel of known HLA phenotypes
ELISA	Individual class I or class II HLA phenotypes
IF-Bead ^b	Individual class I or class II HLA phenotypes
	Single HLA Ags

- Limitazioni legate a panel, sensibilità e vitalità cellulare
- Broadly sensitized
- I più sensibili e specifici però hanno delle limitazioni

No test is perfect: Limitations of solid phase immunoassays (SPI)

- SPI are semi-quantitative tests.
- Significant variation between different platforms,
- Significant variation between day-to-day runs on the same platform,
- Significant variation from lot-to-lot of the same assay
- variability in the concentration of antigens
- Variability in the degree of denaturation of antigens
- Beads can be saturated by excessive amounts of antibodies
- Interference of treatments (IVIg)
- Interference of IgM and pro-zone effects (complement)

Nessun test è perfetto: alcune criticità

Crossmatch

Method ^a	Target antigens
CDC	T and B lymphocytes
FCXM	T and B lymphocytes
SPI	Soluble, "captured" donor HLA class I or class II antigens

- Not specific for anti-HLA antibodies
- Not specific for anti-HLA antibodies
- Not all antibodies detected equally well

Cross match, timing del trapianto e virtual crossmatch

Il cross match può essere eseguito:

- **Prima** del trapianto (prospettico)
preferibile ma spesso non possibile
- **Dopo** il trapianto (retrospettivo)

Però, idealmente uno vuole evitare le situazioni di cross match positivo che sono **molto spesso prevedibili** attraverso l'uso del **virtual crossmatch**

Aspetti fondamentali del Virtual crossmatch (VXM)

Un VXM efficace è legato a:

- Una caratterizzazione accurata degli anticorpi anti-HLA presenti nel ricevente
- Una tipizzazione accurata degli antigeni HLA del donatore rilevanti
- Una identificazione del rischio immunologico del paziente e ad una capacità clinica di gestire tale rischio (antigeni «proibiti»)

Conclusioni

- Lo sviluppo di nuove tecniche molto sensibili permettono l'identificazione di livelli molto bassi di DSA
- Nessuna tecnica è perfetta
- Una collaborazione sempre più stretta tra laboratori di immunogenetica e clinici appare determinante per la corretta assegnazione dell'organo ed il buon esito di un trapianto