



**AIBT**

# Summer School 2015

**Alloreattività e trapianti nell'uomo:  
le nuove metodiche di studio  
e i trapianti alternativi**

**Evoluzione della tecnologia  
Luminex®**

**Francesco Ingrassia**

**04 - 06 giugno 2015 Villaggio Cala la Luna Favignana (TP)**

# Evoluzione della tecnologia Luminex®

1. Principi di base della tecnologia Luminex ed evoluzione della **strumentazione**
2. Evoluzione della tecnologia Luminex applicata alla **Tipizzazione HLA**
3. Evoluzione della tecnologia Luminex applicata allo studio degli **Anticorpi**



# Principi di base della tecnologia Luminex®

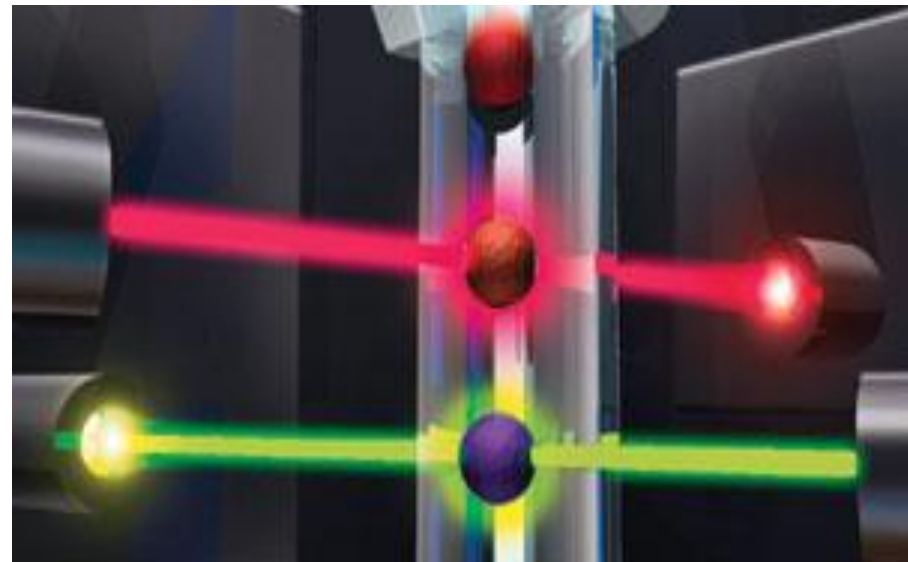
## Multiplex analysis

Capacità di misurare più analiti contemporaneamente in una singola reazione.

Si basa sulla combinazione di **microsfere** di grandezza nota avente differente colorazione alle quali vengono attaccate sonde, ed uno **strumento dotato di 2 laser** per acquisirle:

1. **Classification Laser (Laser Rosso)**: in grado di classificare le microsfere;
2. **Reporter Laser (Laser Verde)**: in grado di rilevare e misurare una seconda fluorescenza alla superficie di ciascuna microsfera

## Multi Analyte Profiling



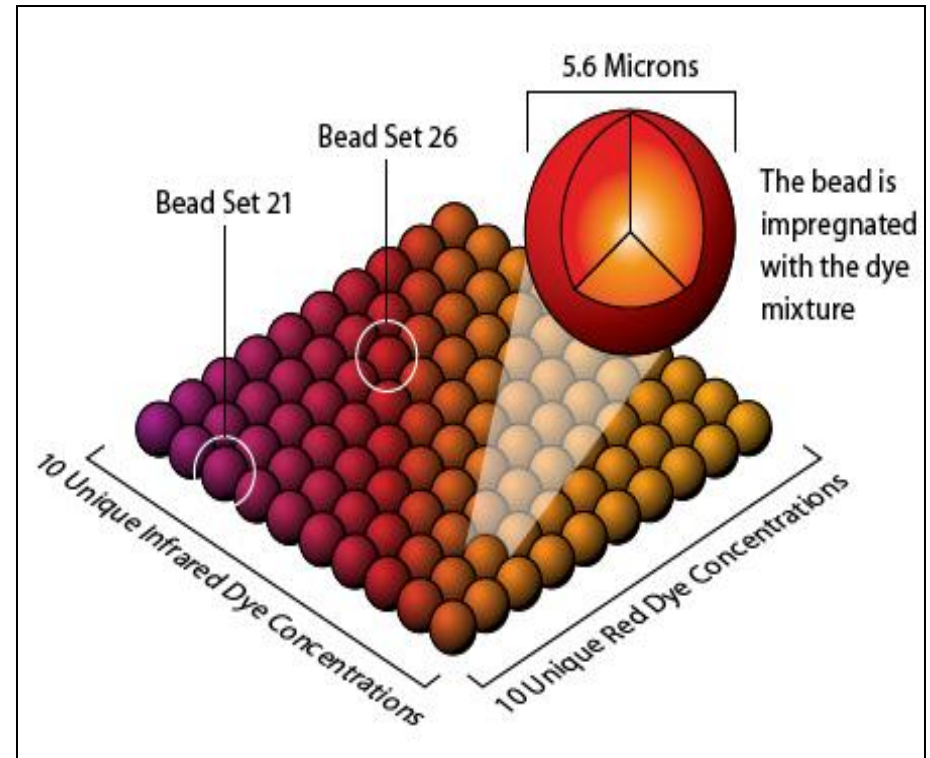
# Principi di base della tecnologia Luminex<sup>®</sup>

## Microsfere

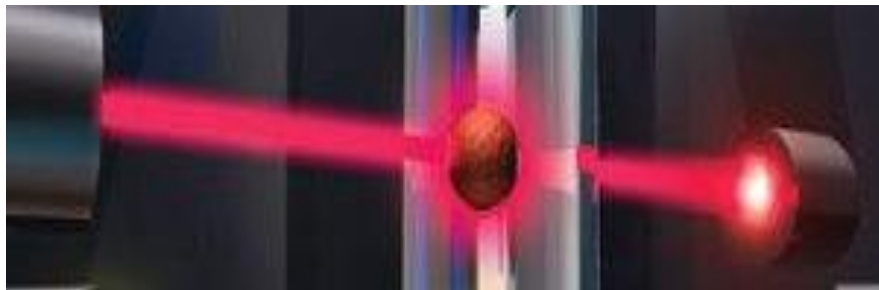
Ogni microsfera è codificata con due colori in modo da emettere due lunghezze d'onda differenti nel rosso e nell'infrarosso.



Set di 100 microsfere

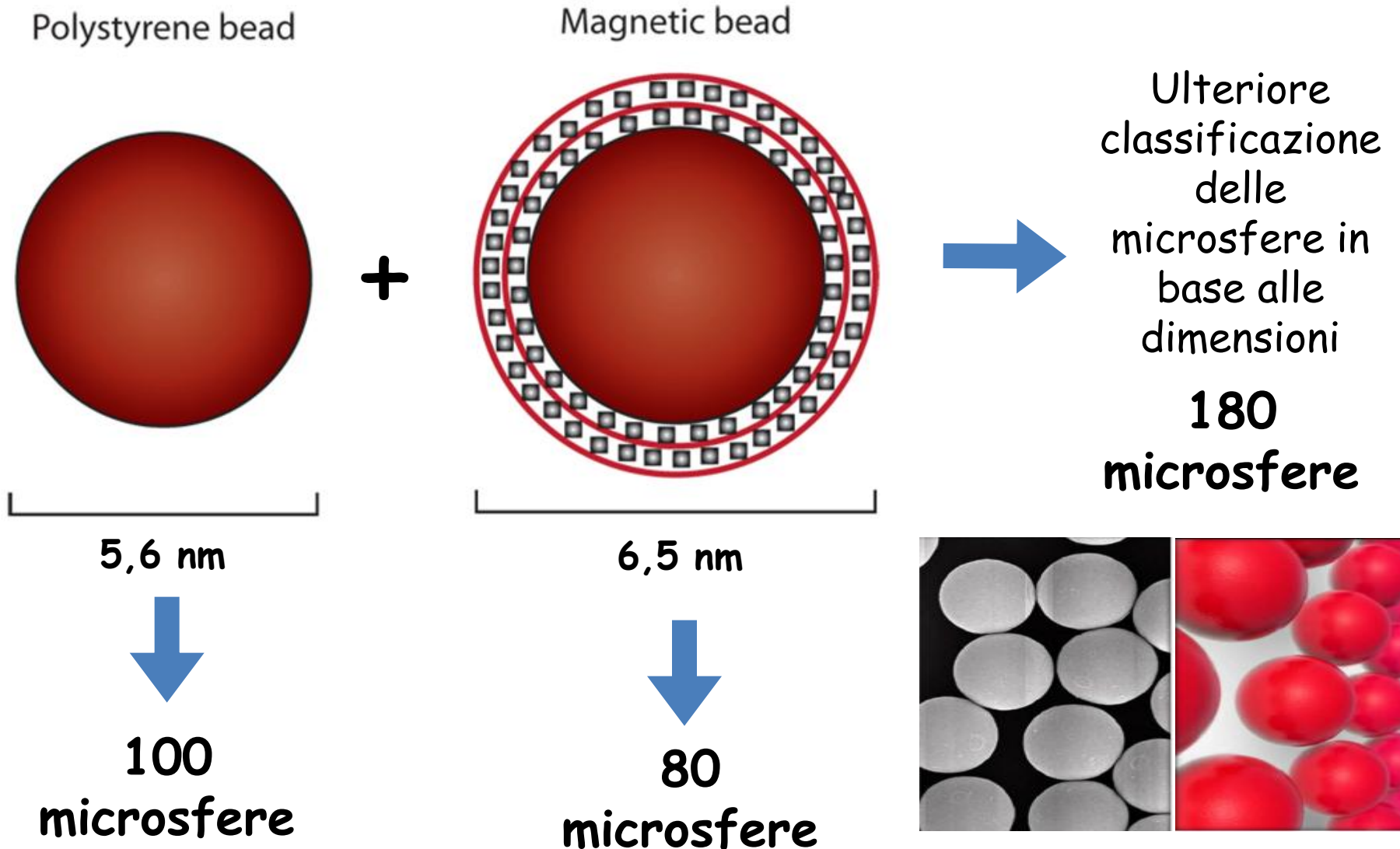


**Laser rosso a 638 nm**  
per eccitare i due coloranti  
interni alle microsfere e leggere  
due diverse lunghezze d'onda





# Principi di base della tecnologia Luminex<sup>®</sup>



# Principi di base della tecnologia Luminex®

Le singole sfere rappresentano il supporto solido di un reagente

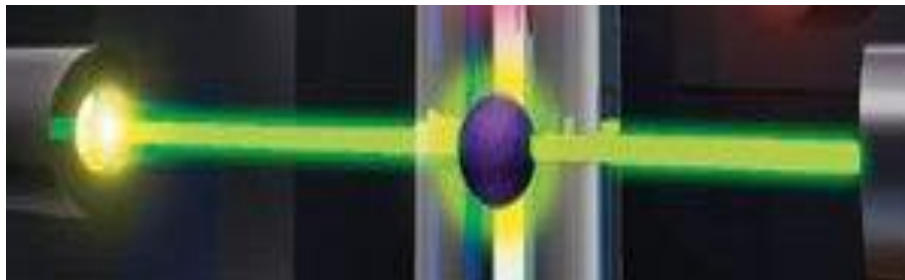
Una sonda oligonucleotidica



Un antigene



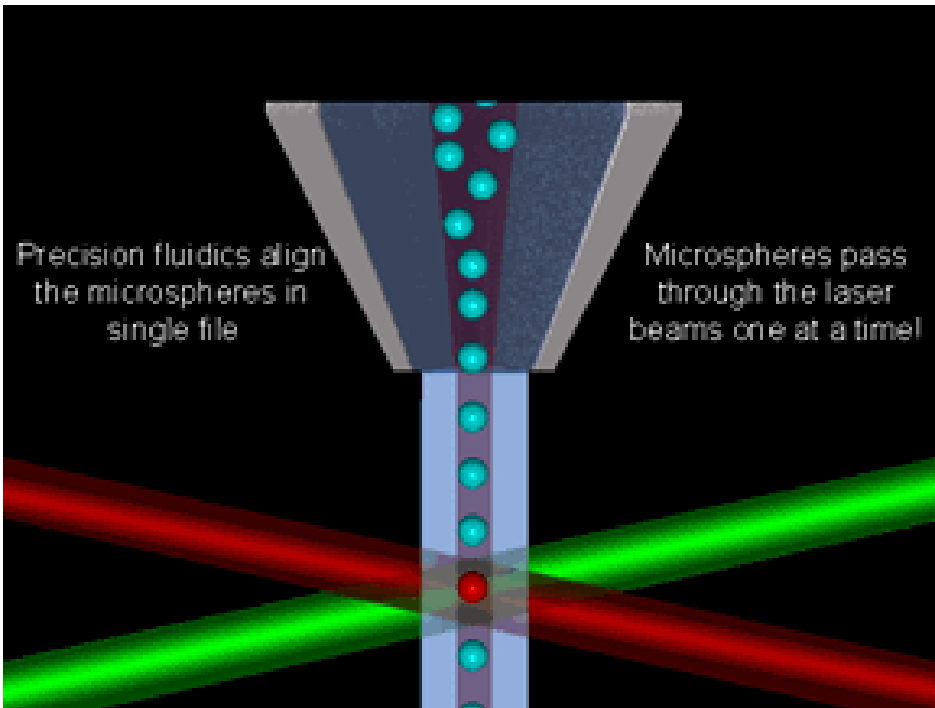
La reazione, rispettivamente con un DNA amplificato e denaturato o con un anticorpo, avviene alla superficie delle sfere.



**Laser verde a 525 nm**  
per eccitare la ficoeritrina  
eventualmente presente  
sulla superficie della biglia;

# Principi di base della tecnologia Luminex®

I campioni vengono analizzati dall'analizzatore in ciascun pozzetto



Un ago aspira la miscela di biglie e un preciso sistema di fluidica basato sulla citometria a flusso le allinea in fila indiana e fa scorrere le biglie una dopo l'altra all'interno di un capillare detto cuvetta

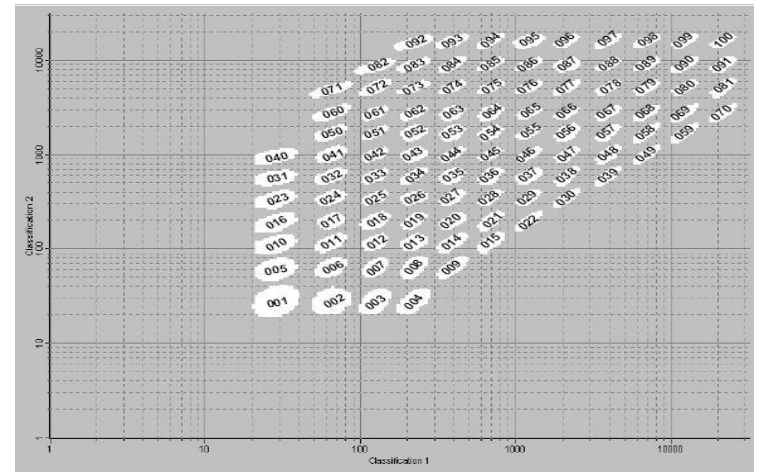
*La biglie passeranno una ogni 3 millisecondi all'interno della cuvetta che è composta di quarzo (vetro). I laser potranno così colpire le biglie per identificarle e determinare l'intensità di fluorescenza*

# Principi di base della tecnologia Luminex®

## Cosa legge il Luminex

Il Luminex per ogni biglia che passa attraverso la cuvetta legge i valori seguenti:

- La dimensione della biglia (DD)
- L'intensità di colore rosso (CL1)
- L'intensità di colore infrarosso (CL2)
- L'intensità di fluorescenza (RP1)

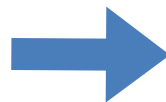


I valori di fluorescenza delle singole biglie vengono trasformati quindi in valori di segnale elettrico e, tramite un DSP, in numeri da poter utilizzare per generare le statistiche di lettura per ogni singolo set di biglie.

Sample	001 (1)	002 (2)	003 (3)	004 (4)	005 (5)	007 (7)	008 (8)	009 (9)	010 (10)	011 (11)	012 (12)
Acquire Pa1	108,00	115,00	108,00	124,00	107,00	98,00	100,00	104,00	106,00	118,00	118,00
Acquire Pa2	66,00	57,00	55,00	43,00	63,00	70,00	55,00	54,00	71,00	53,00	76,00
Acquire Pa3	125,00	93,00	93,00	108,00	117,00	113,00	115,00	99,00	139,00	121,00	116,00
Acquire Pa4	74,00	65,00	62,00	64,00	56,00	67,00	71,00	64,00	67,00	74,00	77,00
Acquire Pa5	133,00	106,00	115,00	139,00	133,00	137,00	126,00	125,00	139,00	149,00	140,00



File Output CSV



Software  
d'interpretazione



# Strumentazione Luminex®



Piastra da 96 pozzetti



Strumento Luminex composto da:

- ✓ Sheat Delivery System
- ✓ Piattaforma per leggere piastre da 96
- ✓ Strumento citofluorimetrico
- ✓ PC : Software di acquisizione + Software di analisi risultati HLA

# Evoluzione della strumentazione Luminex®

**2001**  
**LX100 LDC**  
**SW**  
**100-Plex**



**2001-2005**

**LX 100 IS**  
**SW**  
**100 - Plex**  
**45 Minutes**



**2006**  
**LX 200 IS SW**  
**100 - Plex**  
**45 Minutes**



**2012**  
**LX 200 xPONENT**  
**100 - Plex**  
**45 Minutes**

**Automazione**



**2014**  
**FLEXMAP 3D®**  
**500 - Plex**  
**20 Minutes**



# Evoluzione della strumentazione Luminex®

Negli scorsi anni l'azienda Luminex ha introdotto strumentazioni con capacità risolutive sempre maggiori in combinazione a nuove microsfere per legare sempre più analiti

**180 Biglie**  
(Plastiche + magnetiche)



**100 Biglie**



**Luminex 100/200**

**Luminex 200**  
**xPONENT**

**500 biglie**



**FLEXMAP® 3D**

Da un iniziale numero di 100 sfere la Luminex è passata alle 180 sfere (plastiche + magnetiche) e renderà disponibile un pannello di 500 sfere da utilizzare in combinazione con lo strumento più evoluto FLEXMAP® 3D

# Evoluzione della strumentazione Luminex®

## FLEXMAP 3D®

L'espansione del numero di sfere è stata possibile grazie all'aggiunta di un terzo colorante.

**Mappa estesa – 500plex (3)**

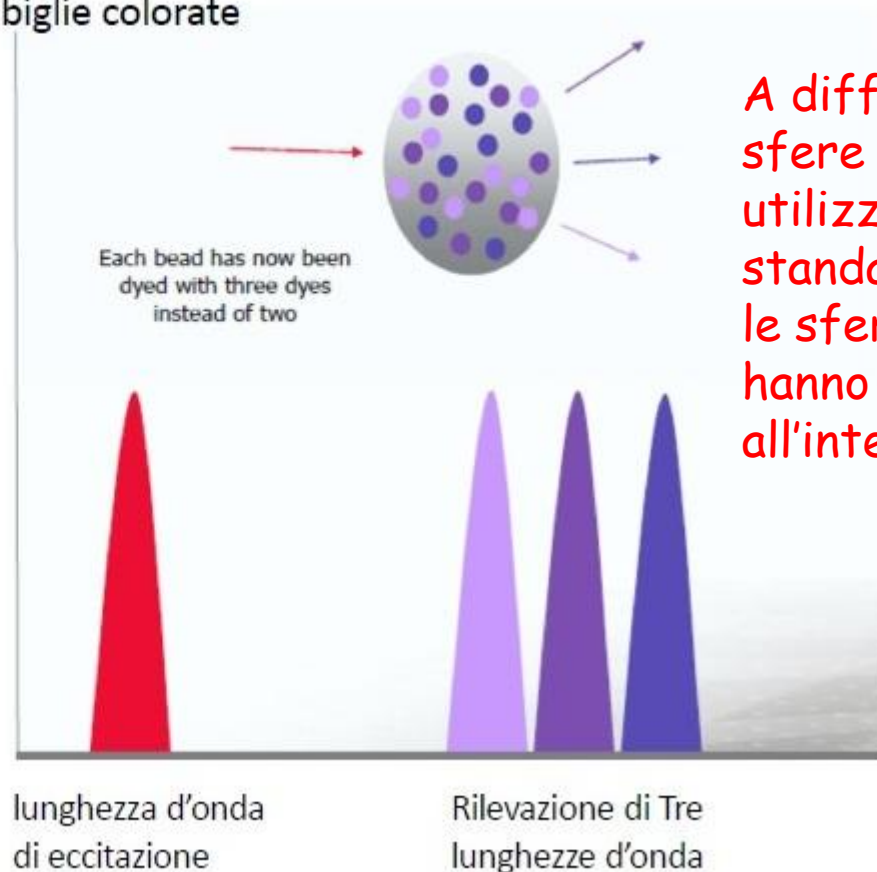
**Bead Map** Fino a 500 diversi set di biglie colorate

**LX100/200:**

- Laser Rosso 638 nm laser eccita i due colori interni alla biglia
- Due detector rilevano le due lunghezze d'onda emesse dai due colori

**FLEXMAP 3D:**

- Laser Rosso 638 nm laser eccita i tre colori interni alla biglia
- Tre detector rilevano le tre lunghezze d'onda emesse dai tre colori



A differenza delle sfere a due colori utilizzate nei Luminex standard LX 100-200 le sfere per FM3D hanno tre colori all'interno.



# Evoluzione della strumentazione Luminex®

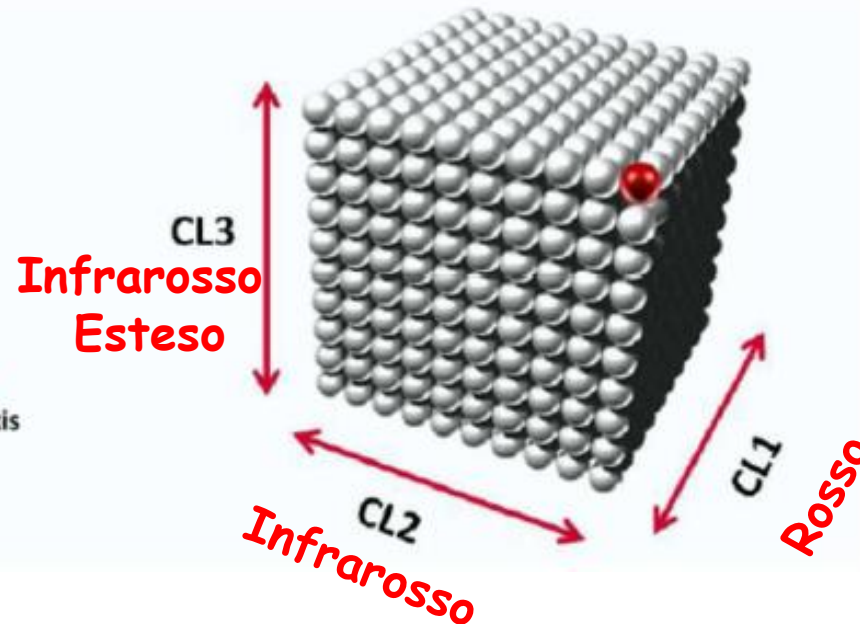
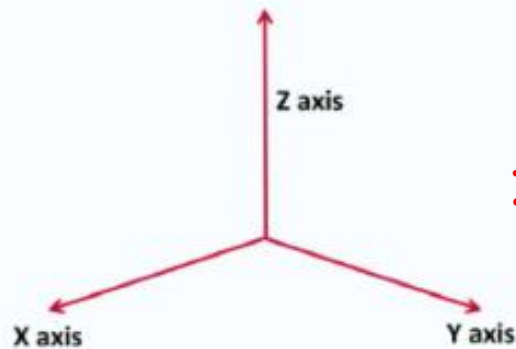
## FLEXMAP 3D®

Mappa estesa – 500plex (2)

Questa ulteriore colorazione ha così consentito di costruire un maggiore numero di sfere rispetto alle precedenti... da 100 a 500 microsferi.

**Bead Map** Fino a 500 diversi set di biglie colorate

- Le biglie vengono rappresentate in uno schermo tridimensionale i cui assi corrispondono a CL1 (Classification Dye 1), CL2 (Classification Dye 2), and CL3 (Classification Dye 3)
- Basato su proporzioni di colore, a ogni set di biglie corrisponde un'unica fluorescenza di rosso, infrarosso e infrarosso esteso
- Tutte le biglie hanno una loro particolare miscela di colori che determina il set di appartenenza e quindi un unico numero di identificazione ( Id Number)



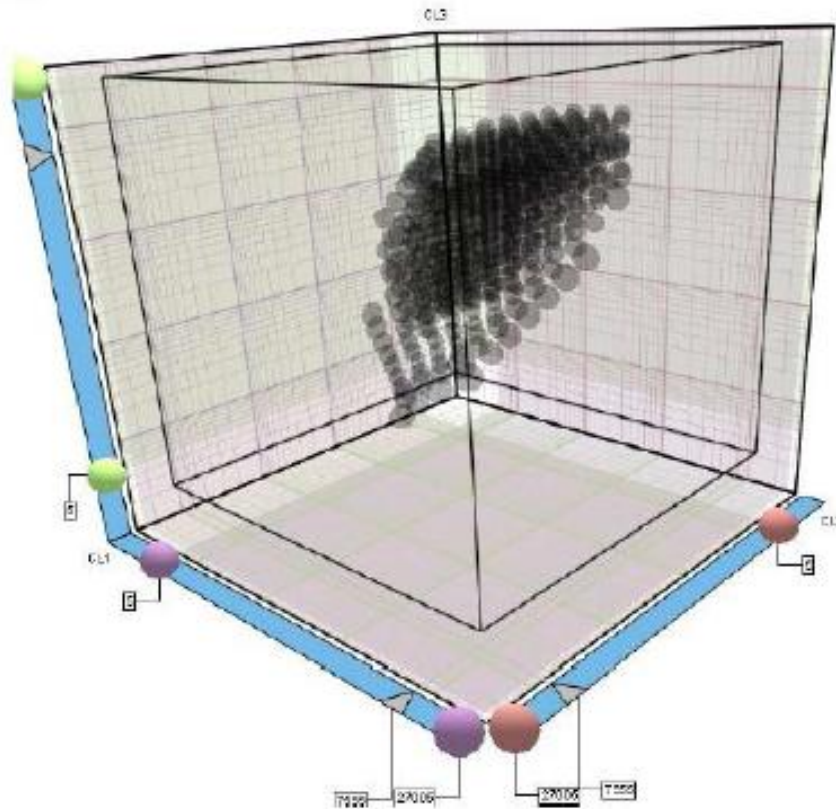


# Evoluzione della strumentazione Luminex®

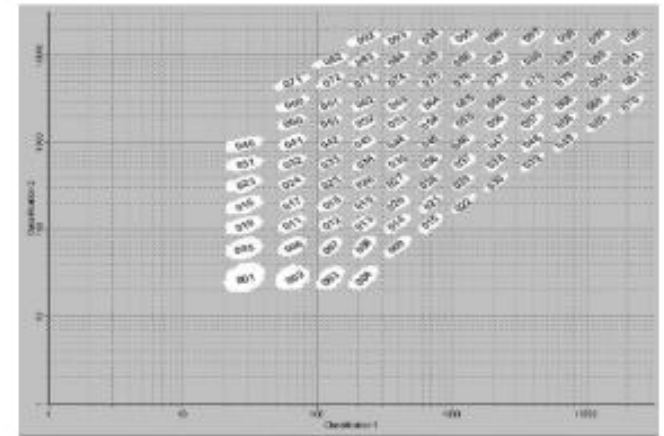
## FLEXMAP 3D®

### Bead Map

- All 500 Regions



Il nuovo software di acquisizione Xponent 4.2 consente di visualizzare le sfere disposte in modo tridimensionale rispetto alla precedente visualizzazione su un piano



# Evoluzione della strumentazione Luminex®

## FLEXMAP 3D®

Il sistema è dotato di doppia siringa di aspirazione che consente l'analisi contemporanea di due campioni, mentre una siringa aspira il campione, l'altra siringa elimina il campione precedente.

### Tempi di lettura ridotti

- Doppia siringa
- Ottimizzazione di valvole, valori e controllo della pressione  
- controllo elettronico
- Aggiornamenti Firmware



**Lettura 2x più veloce**

Test	Specification	Representative Data	Tests/hour based on data	LX200
96 well (100 plex, 2500 beads per well)	<30 min	18 min	32,000	45 min
384 well (100 plex, 2500 beads per well)	<2 hrs	1 hr 15 min	30,700	N/A
96 well (500 plex, 2500 beads per well)	N/A	45 min	64,000	N/A
384 well (500 plex, 2500 beads per well)	N/A	2 hr and 15 min	85,000	N/A

# Evoluzione della strumentazione Luminex®

Luminex® 200™

FLEXMAP 3D®

Confronto e  
principali  
differenze



<b>Multiplexing capability</b>	<b>100</b>	<b>500</b>
<b>Read Time</b>	<b>40 mins / 96 well plate</b>	<b>20 mins / 96 well plate</b>
<b>Software</b>	<b>xPonent 3.1</b>	<b>xPonent 4.2</b>
<b>Footprint Including PC</b>	<b>80,0 cm</b>	<b>64,8 cm</b>

Nel nuovo FlexMap 3D tutte le componenti del sistema, analizzatore-piattaforma-sheat delivery sistem sono state integrate in un unico corpo macchina oltre al PC.

# Tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

Transfusion Medicine  
and Hemotherapy

Review Article · Übersichtsarbeit

---

Transfus Med Hemother 2009;36:273–278  
DOI: 10.1159/000228834

Received: April 14, 2009  
Accepted: July 9, 2009  
Published online: July 21, 2009

---

## HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology

Falko Markus Heinemann

Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, Germany

**Immunogenetics**

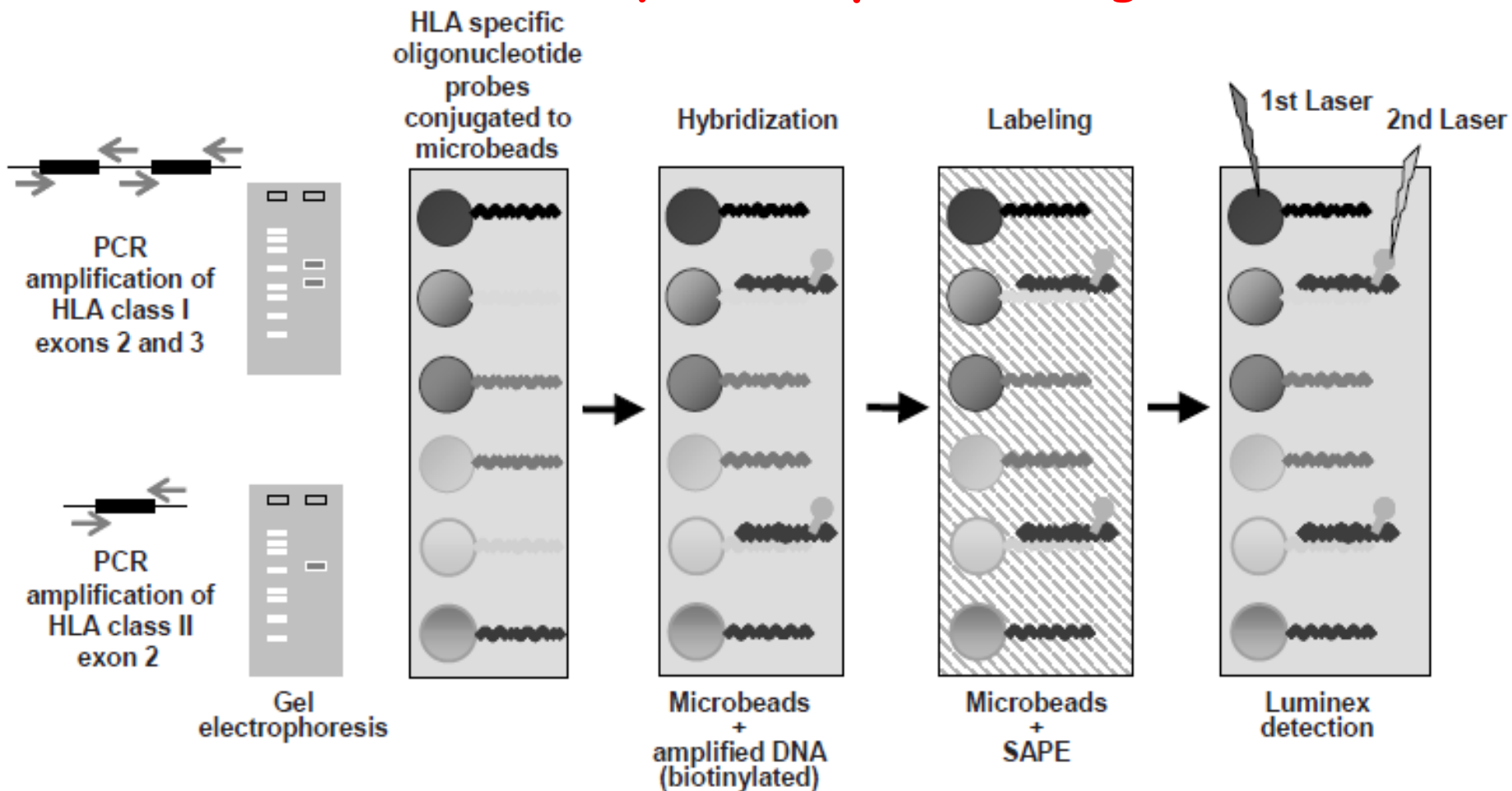
**Methods in Molecular Biology** Volume 882, 2012, pp 47-6

## HLA Typing Using Bead-Based Methods

**Daniel Trajanoski and Samantha J. Fidler**

# Tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

## Reverse SSO (Sequence Specific Oligonucleotide)



4 ore

Trajanoski D, Fidler SJ. HLA typing using bead-based methods. Immunogenetics: Methods in Molecular Biology. Vol.882 2012



# Tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

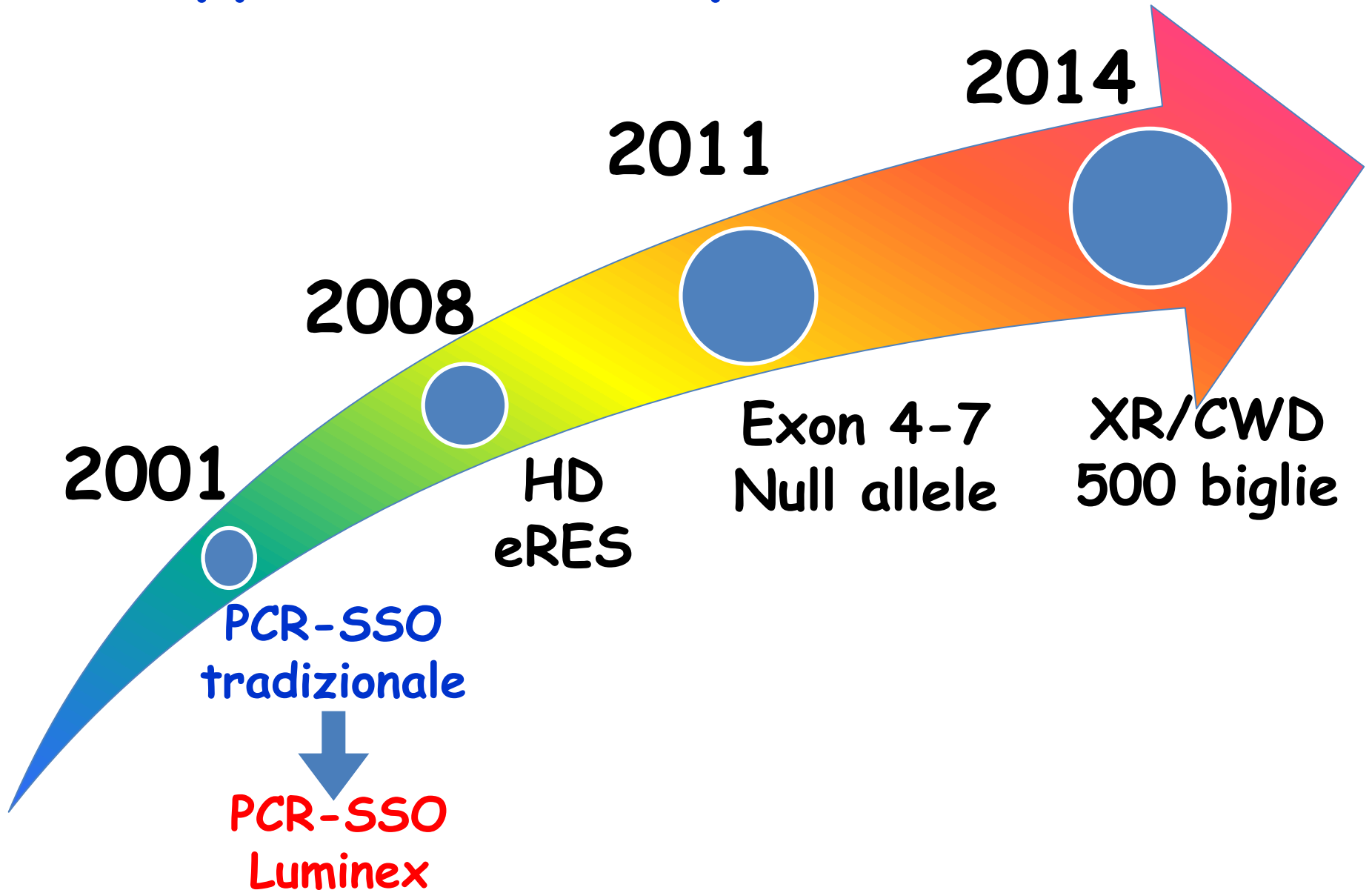
## Geni tipizzabili con tecnologia PCR-SSO Luminex

I kit commerciali disponibili, di entrambe le ditte, permettono la tipizzazione di tutti i loci HLA in bassa, intermedia e in parte in alta risoluzione.

Sono disponibili anche Kit per tipizzare i geni MICA e KIR

Classe I	Classe II
HLA-A	HLA-DRB1
HLA-B	HLA-DRB3-4-5
HLA-C	HLA-DQA1
	HLA-DQB1
	HLA-DPB1
Altri geni non HLA	
MICA	
KIR	

# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA



# Evoluzione della tecnologia PCR-SSO Luminex®

**PCR-SSO  
tradizionale**

**VS**

**PCR-SSO  
Luminex**



**Numero max di  
campioni per seduta**

**48**

**96**

**% fallimenti**

**8%**

**1%**

**% ambiguità low  
res.**

**13%**

**3,8%**

**Protocollo**

**Laborioso**

**Semplice**

**Tempi di esecuzione**

**Lunghi**

**Brevi**

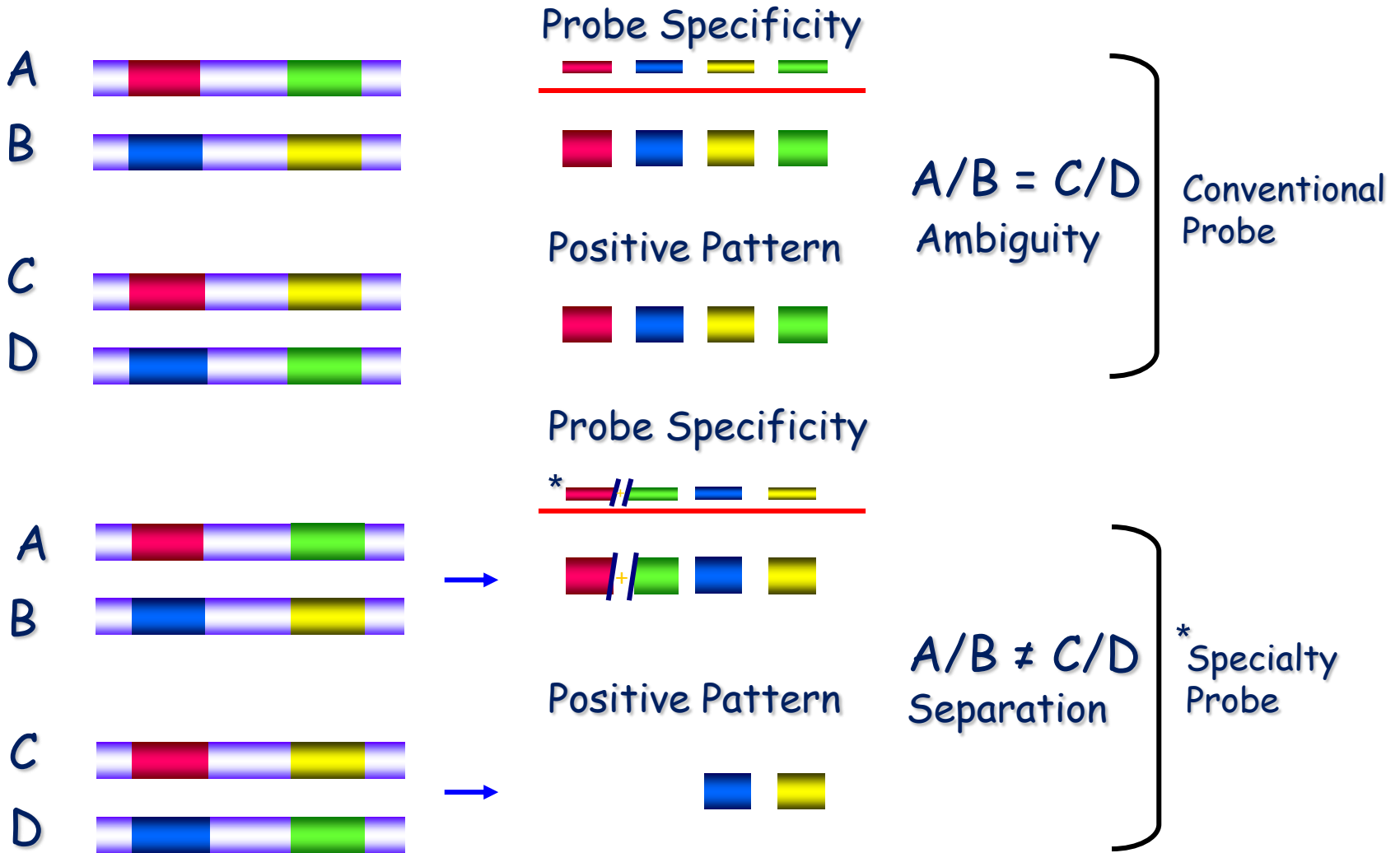
# Evoluzione della tecnologia PCR-SSO Luminex®

## Specialty Probe Technology

- Sonde progettate per risolvere le ambiguità dovute alle sonde convenzionali con simili reattività.

	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D	Probe E
DRB1*03:01/*11:01	+	+	+	+	—
DRB1*03:08/*13:07	+	+	+	+	+

# Specialty Probe





# Example

## Allele Pair #1

<< <C> >>	Exon2																
Codon Nr.	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
DRB1*01:01:01	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	CTC	CTG	GAG	CA...G	AGG	C...GG	GCC	GCG
DRB1*03:08	-AG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	-G- CG-
DRB1*13:07:01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T--	---	--A G...	C	---	---	---	---

Legend: "-": identical to reference ".": deletion "\*": not sequenced

Allele DB version: **3.19** last updated: **2015-01-27 19:33**

## Allele Pair #2

<< <C> >>	Exon2																
Codon Nr.	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
DRB1*01:01:01	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	CTC	CTG	GAG	CA...G	AGG	C...GG	GCC	GCG
DRB1*03:01:01:01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	-G- CG-
DRB1*11:01:01	-AG	---	---	---	---	---	---	---	---	T--	---	--A G...	C	---	---	---	---

Legend: "-": identical to reference ".": deletion "\*": not sequenced

Allele DB version: **3.19** last updated: **2015-01-27 19:33**

**PCR-SSO  
tradizionale**

**vs**

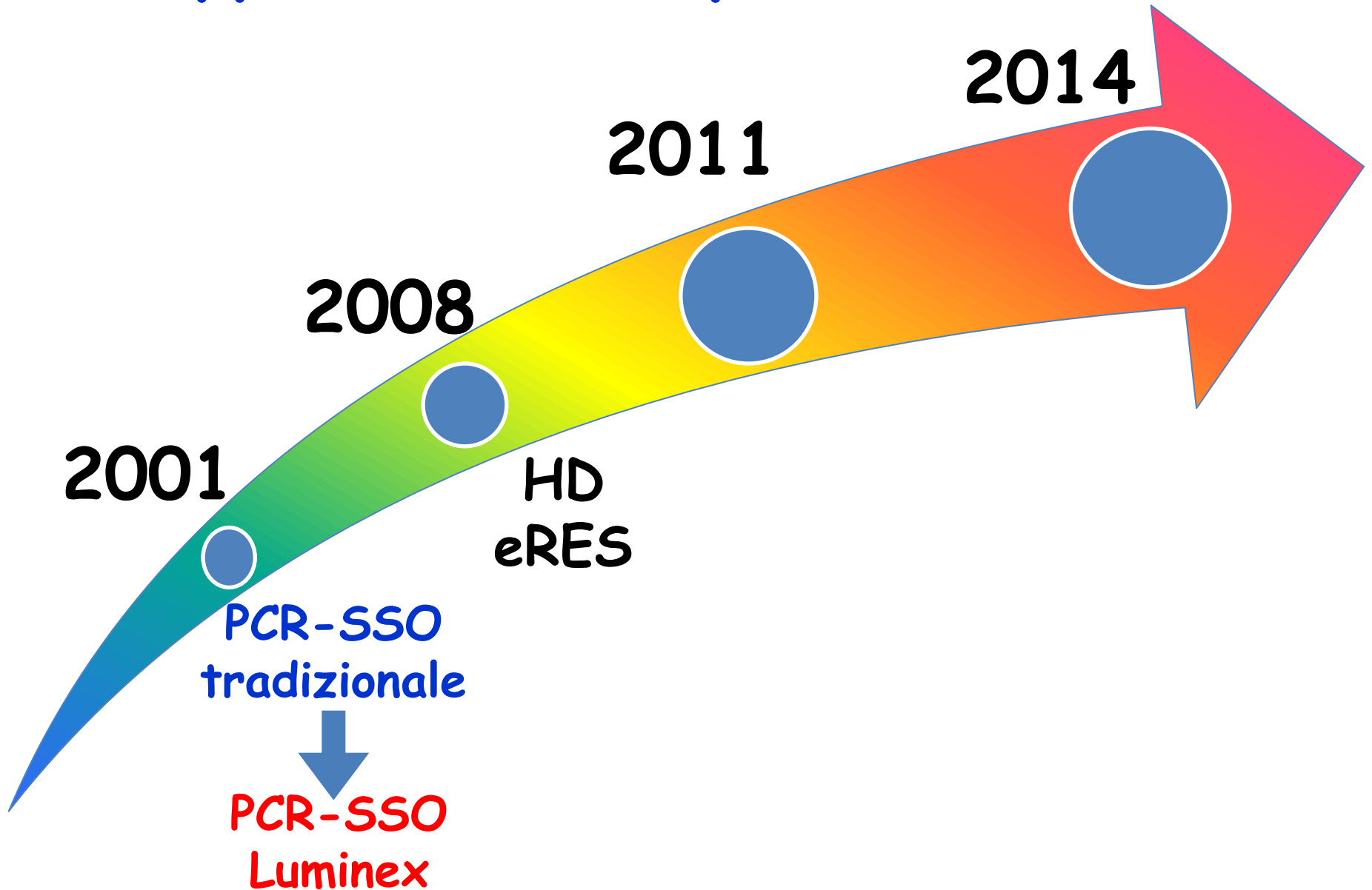
**PCR-SSO  
Luminex**

Loci HLA	% di Ambiguità SSO tradizionale	% di Ambiguità SSO Luminex
HLA-A	5%	1%
HLA-B	18%	5%
HLA-DRB1	16%	2%



Consistente riduzione delle ripetizioni con altre metodiche per la risoluzione delle ambiguità

# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

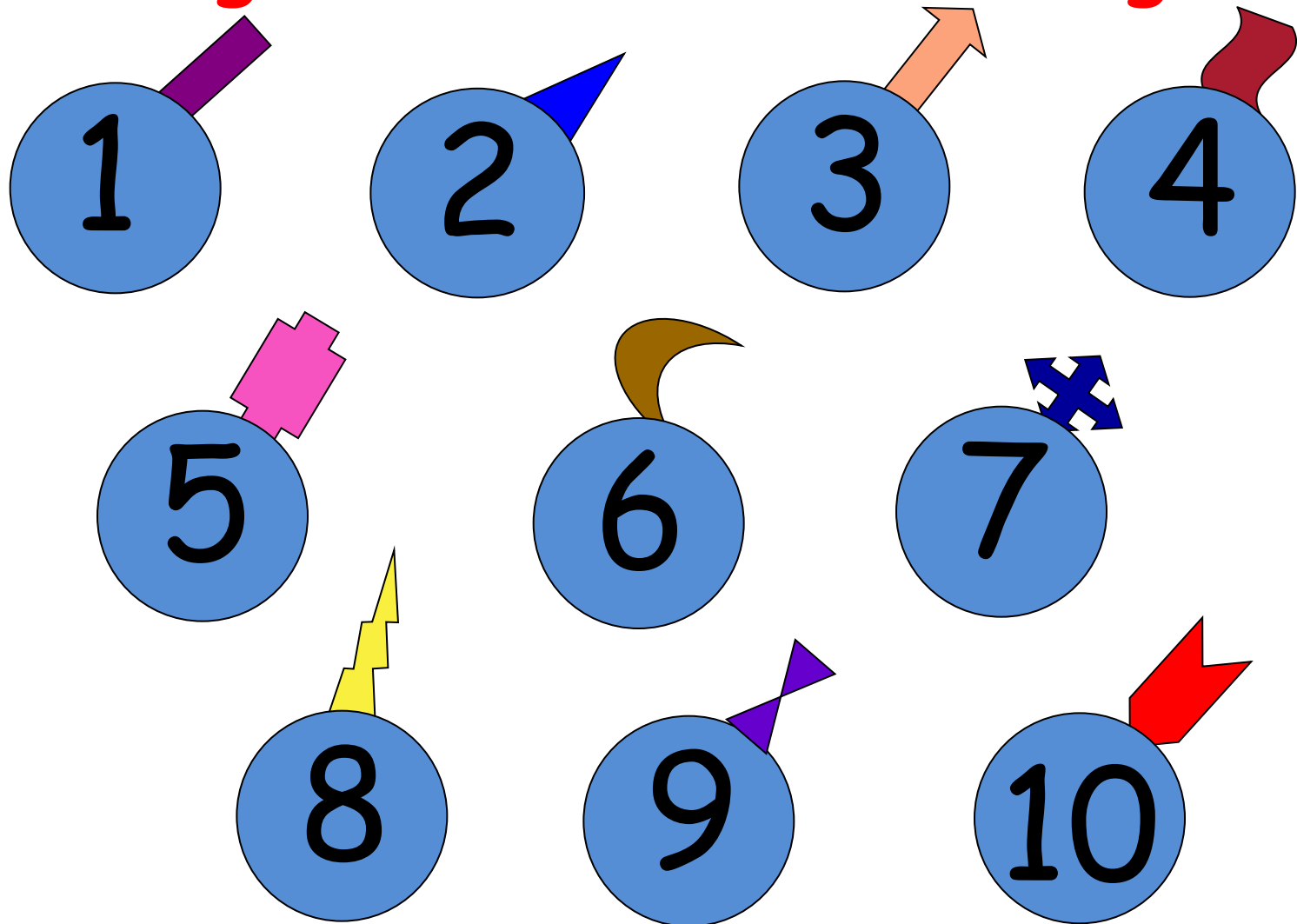


# High Definition (HD) kit

## Enhanced resolution (Eres) kit

- Uso di microsfere addizionali per aumentare il numero di sonde (Biglie normali + Biglie magnetiche = 180 biglie)
- >200 sonde
- Molteplici sonde legate ad una singola biglia Luminex
- Maggior numero di sonde specifiche per alleli rari per incrementare la risoluzione e risolvere più ambiguità generiche
- Algoritmo per differenziare le differenti sonde su una singola biglia
- Protocollo e reagenti equivalenti ai Kit generici

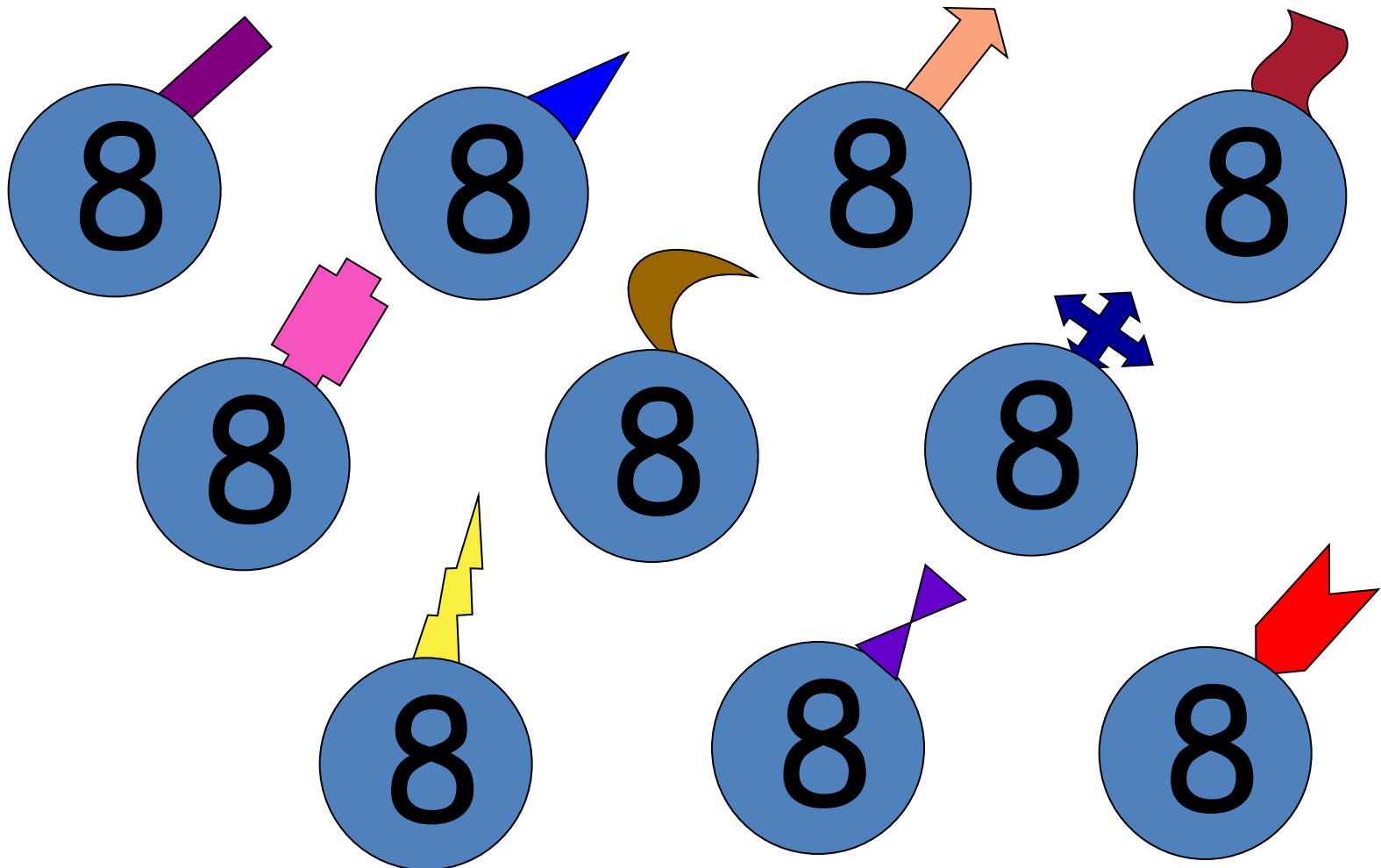
# Evoluzione della tecnologia Luminex<sup>®</sup> applicata alla Tipizzazione HLA Regular Bead-Probe Design





# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

## HD Bead-Probe Design



# Limiti dei Kit HD o eRES

- ✓ Regioni amplificate:  
Esoni 2-3 Classe I → Polimorfismi al di fuori delle regioni amplificate non possono essere risolti  
Esone 2 Classe II
- ✓ Polimorfismi ai siti di legame dei primer non possono essere risolti
- ✓ Nuovi alleli richiedono nuove sonde
- ✓ Ambiguità anche nelle regioni amplificate

# A locus polymorphisms unresolved in Exons 2-3

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10
A*01:01:01:01	A*01:01:01:02N	A*01:01:38L	A*01:01:51	A*01:04N	A*01:22N	A*01:32	A*01:37	A*01:45	A*01:56N
A*02:01:01:01	A*02:01:01:02L	A*02:01:01:03	A*02:01:08	A*02:01:11	A*02:01:14Q	A*02:01:15	A*02:01:21	A*02:01:48	A*02:01:50
A*02:03:01	A*02:253	A*02:264	A*02:370						
A*02:05:01	A*02:179	A*02:324							
A*02:06:01	A*02:06:13	A*02:126							
A*02:07:01	A*02:07:02	A*02:15N	A*02:265						
A*02:11:01	A*02:69								
A*02:16	A*02:131								
A*02:17:01	A*02:17:02								
A*02:22:01	A*02:104								
A*02:81	A*02:124								
A*03:01:01:01	A*03:01:01:02N	A*03:01:01:03	A*03:01:07	A*03:01:27	A*03:20	A*03:21N	A*03:26	A*03:37	A*03:45
A*11:01:01	A*11:21N	A*11:69N	A*11:86	A*11:100	A*11:102	A*11:108	A*11:120	A*11:124	A*11:126
A*11:02:01	A*11:02:03	A*11:77	A*11:110						
A*23:01:01	A*23:01:05	A*23:07N	A*23:17	A*23:18	A*23:20				
A*24:02:01:01	A*24:02:01:02L	A*24:02:01:03	A*24:02:03Q	A*24:02:10	A*24:02:13	A*24:02:31	A*24:02:40	A*24:02:43	A*24:02:44
A*24:02:34									
A*24:03:01	A*24:33								
A*24:05	A*24:199								

HLA-A Ambiguities, Release 3.11.0

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7

Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287

# A locus polymorphisms unresolved in Exons 2-3

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10
A*25:01:01	A*25:07								
A*26:01:01	A*26:01:07	A*26:01:25	A*26:24	A*26:26	A*26:56	A*26:82			
A*29:01:01:01	A*29:01:01:02N								
A*29:02:01:01	A*29:02:01:02	A*29:02:07	A*29:26	A*29:46					
A*30:01:01	A*30:01:02	A*30:24							
A*30:02:01	A*30:02:02	A*30:33							
A*31:01:02	A*31:01:13	A*31:14N	A*31:23	A*31:46	A*31:48	A*31:55	A*31:56	A*31:59	A*31:71
A*32:01:01	A*32:01:02	A*32:53	A*32:54						
A*33:01:01									
A*33:03:01	A*33:03:03Q	A*33:03:13	A*33:15	A*33:25	A*33:31	A*33:39	A*33:44		
A*66:01	A*66:08	A*66:17							
A*68:01:01:01	A*68:01:01:02	A*68:01:07							
A*68:01:02	A*68:11N	A*68:33	A*68:96						
A*68:02:01:01	A*68:02:01:02	A*68:02:01:03							
A*74:01	A*74:02:01:01	A*74:02:01:02							
A*80:01:01:01	A*80:01:01:02								

HLA-A Ambiguities, Release 3.11.0

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7

Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287

# B locus polymorphisms unresolved in Exons 2-3

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10
B*07:02:01	B*07:02:06	B*07:02:09	B*07:44	B*07:49N	B*07:58	B*07:59	B*07:61	B*07:120	B*07:128
B*07:05:01	B*07:06								
B*08:01:01	B*08:01:14	B*08:01:20	B*08:19N						
B*13:01:01	B*13:01:05	B*13:52	B*13:61						
B*13:02:01	B*13:02:05	B*13:02:09	B*13:38						
B*15:01:01:01	B*15:01:01:02N	B*15:01:06	B*15:01:07	B*15:01:20	B*15:01:22	B*15:102	B*15:104	B*15:140	B*15:146
B*15:02:01	B*15:02:06	B*15:214							
B*15:03:01	B*15:103	B*15:220							
B*15:07:01	B*15:07:02								
B*15:11:01	B*15:11:05								
B*15:12	B*15:19								
B*15:123	B*15:151								
B*15:17:01:01	B*15:17:01:02								
B*15:18:01	B*15:198	B*15:263							
B*15:25:01	B*15:25:03								
B*18:01:01:01	B*18:01:01:02	B*18:01:03	B*18:17N	B*18:53	B*18:81				
B*27:04:01	B*27:68	B*27:69							
B*27:05:02	B*27:05:04	B*27:13							
B*27:07:01	B*27:07:02								
B*35:01:01:01	B*35:01:01:02	B*35:01:03	B*35:01:23	B*35:01:25	B*35:01:28	B*35:40N	B*35:42:01	B*35:57	B*35:94
B*35:02:01	B*35:02:05	B*35:220							
B*35:03:01	B*35:70								
B*35:137	B*35:147								
B*35:43:01	B*35:67	B*35:79							
B*37:01:01	B*37:23								
B*38:02:01	B*38:18								
B*39:01:01:01	B*39:01:01:02L	B*39:01:01:03	B*39:01:03	B*39:46	B*39:59	B*39:77			

HLA-B Ambiguities, Release 3.11.0

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7

Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287



# B locus polymorphisms unresolved in Exons 2-3

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10	Allele 11
B*40:01:01	B*40:01:02	B*40:01:25	B*40:55	B*40:141	B*40:150	B*40:151	B*40:179	B*40:221		
B*40:02:01	B*40:56	B*40:97	B*40:144N	B*40:176						
B*40:06:01:01	B*40:06:01:02	B*40:06:03	B*40:06:04							
B*40:40	B*40:229									
B*44:02:01:01	B*44:02:01:02 S	B*44:02:01:03	B*44:02:25	B*44:02:27	B*44:19N	B*44:27:01	B*44:66	B*44:118		
B*44:03:01	B*44:03:03	B*44:03:04								
B*45:01	B*45:07	B*45:13								
B*46:01:01	B*46:15N	B*46:24	B*46:34	B*46:38						
B*47:01:01:01	B*47:01:01:02	B*47:01:02								
B*48:01:01	B*48:01:03	B*48:09								
B*49:01:01	B*49:01:04									
B*51:01:01	B*51:01:05	B*51:01:07	B*51:01:23	B*51:01:35	B*51:11N	B*51:30	B*51:32	B*51:48	B*51:51	B*51:142
B*52:01:01:01	B*52:01:01:02	B*52:01:08	B*52:07							
B*54:01:01	B*54:17									
B*55:01:01	B*55:01:03									
B*55:02:01	B*55:02:05									
B*56:01:01	B*56:24									
B*57:01:01	B*57:01:11	B*57:29	B*57:37	B*57:55						
B*58:01:01	B*58:01:04	B*58:01:06	B*58:01:07	B*58:11	B*58:31N					
B*59:01:01:01	B*59:01:01:02									
B*81:01	B*81:02	B*81:03								

HLA-B Ambiguities, Release 3.11.0

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7

Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287

Mismatches with primer sequence:  
 B\*07:02:37, B\*08:104, B\*27:73, B\*27:80, B\*27:81, B\*35:119, B\*35:127,  
 B\*37:01:08, B\*38:15, B\*39:51, B\*40:01:29, B\*40:88, B\*40:139, B\*40:206,  
 B\*44:99, and B\*57:21

# C locus polymorphisms unresolved in Exons 2-3

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10
C*01:02:01	C*01:02:02	C*01:02:11	C*01:02:12	C*01:02:14	C*01:02:15	C*01:25	C*01:44		
C*01:03	C*01:24								
C*02:02:02	C*02:02:17	C*02:29							
C*03:02:01	C*03:02:02:01	C*03:02:02:02	C*03:02:03	C*03:02:07	C*03:146				
C*03:03:01	C*03:03:17	C*03:20N	C*03:62	C*03:171					
C*03:04:01:01	C*03:04:01:02	C*03:04:03	C*03:04:20	C*03:100	C*03:101	C*03:105	C*03:106		
C*04:01:01:01	C*04:01:01:02	C*04:01:01:03	C*04:01:01:04	C*04:01:01:05	C*04:09N	C*04:28	C*04:30	C*04:41	C*04:79
C*05:01:01:01	C*05:01:01:02	C*05:01:04	C*05:01:05	C*05:01:15	C*05:03	C*05:37	C*05:53		
C*06:02:01:01	C*06:02:01:02	C*06:02:03	C*06:46N	C*06:55	C*06:73	C*06:83			
C*07:01:01:01	C*07:01:01:02	C*07:01:02	C*07:01:09	C*07:01:19	C*07:06	C*07:18	C*07:52	C*07:153	C*07:166
C*07:01:20	C*07:01:27								
C*07:02:01:01	C*07:02:01:02	C*07:02:01:03	C*07:02:01:04	C*07:02:01:05	C*07:02:21	C*07:02:23	C*07:50	C*07:66	C*07:74
C*07:04:01	C*07:11								
C*08:01:01	C*08:01:03	C*08:01:04	C*08:01:09	C*08:20	C*08:22	C*08:24			
C*08:02:01	C*08:52N								
C*08:03:01	C*08:40								
C*12:02:01	C*12:02:02								
C*12:03:01:01	C*12:03:01:02	C*12:03:06	C*12:23						
C*14:02:01	C*14:02:07	C*14:23	C*14:31						
C*15:02:01	C*15:02:07	C*15:13	C*15:47						
C*15:05:01	C*15:05:02	C*15:05:03	C*15:29						
C*16:02:01	C*16:02:06								
C*17:01:01:01	C*17:01:01:02	C*17:02	C*17:03						
C*18:01	C*18:02								

HLA-C Ambiguities, Release 3.11.0

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7

Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287

Mismatches with primer sequence:

C\*03:135, C\*03:154, C\*04:20, C\*04:117, C\*04:136, C\*05:07N, C\*07:04:07, C\*07:103, C\*07:195, C\*07:230, C\*08:34, C\*12:34, C\*14:02:06, C\*16:02:04, C\*17:16

C\*05:07N is not amplified by primers for Exon 3

# DRB1 locus polymorphisms unresolved in Exon 2

Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5
DRB1*01:01:01	DRB1*01:50			
DRB1*03:01:01:01	DRB1*03:01:01:02	DRB1*03:01:08	HLA-DRB1 Ambiguities, Release 3.11.0  Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA Database Nucleic Acids Research (2013) 41:D1222-7  Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE: IMGT/HLA - a sequence database for the human major histocompatibility complex Tissue Antigens (2000), 55:280-287	
DRB1*04:06:01	DRB1*04:06:02			
DRB1*04:07:01	DRB1*04:92			
DRB1*07:01:01:01	DRB1*07:01:01:02			
DRB1*08:01:01	DRB1*08:01:03			
DRB1*11:01:01	DRB1*11:01:08	DRB1*11:97		
DRB1*11:06:01	DRB1*11:129			
DRB1*11:11:01	DRB1*11:11:02			
DRB1*11:13:01	DRB1*11:13:02			
DRB1*12:01:01	DRB1*12:06	DRB1*12:10		
DRB1*13:01:01	DRB1*13:117			
DRB1*14:01:01	DRB1*14:54:01			
DRB1*15:01:01:01	DRB1*15:01:01:02	DRB1*15:01:01:03	DRB1*15:01:01:04	DRB1*15:01:17
DRB1*15:03:01:01	DRB1*15:03:01:02			

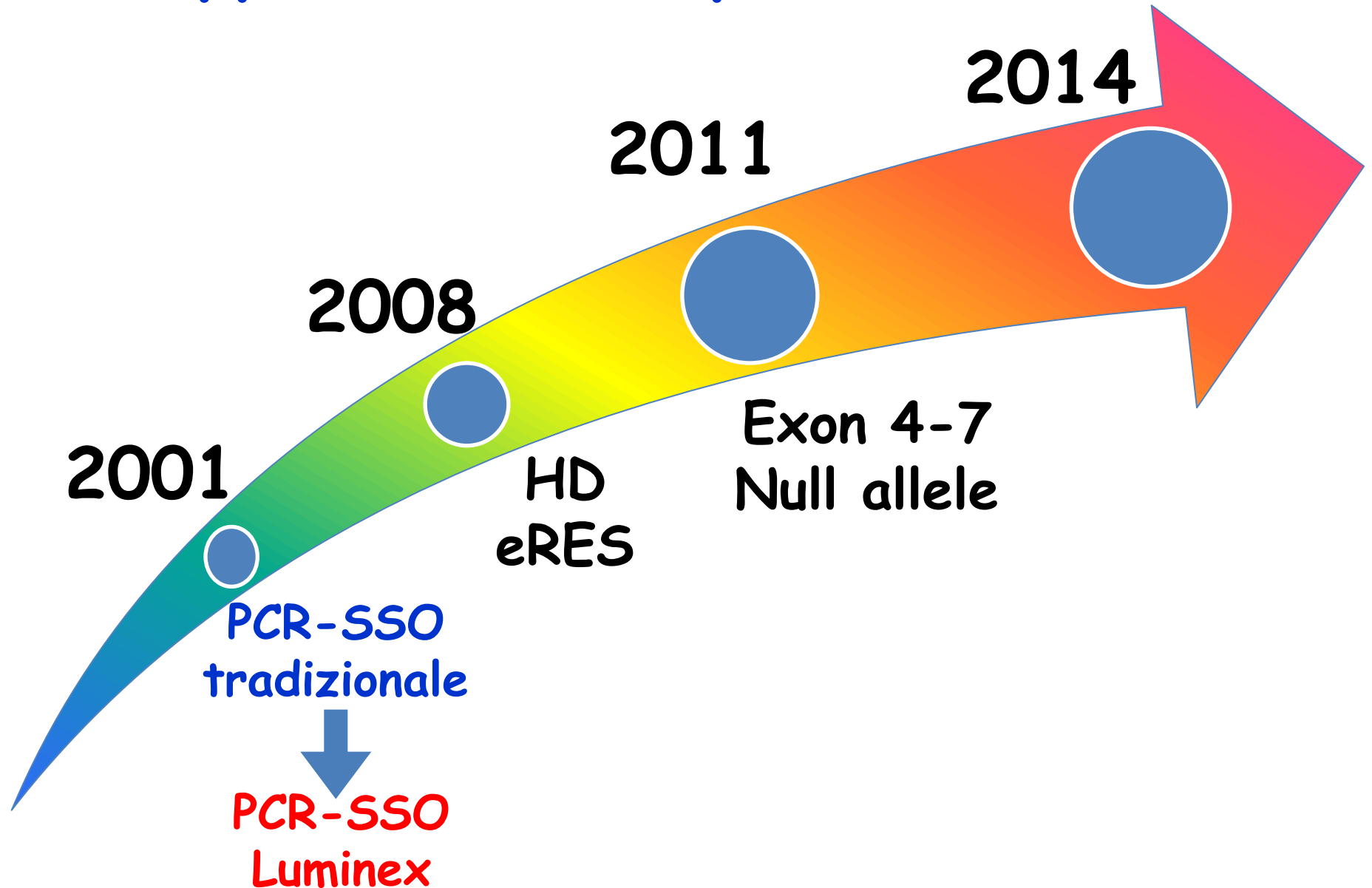
## Mismatches with primer sequence:

DRB1\*01:39N, DRB1\*01:40N, DRB1\*03:01:14, DRB1\*03:50, DRB1\*04:03:03, DRB1\*04:05:03, DRB1\*04:23, DRB1\*04:52, DRB1\*04:66, DRB1\*04:151, DRB1\*08:39, DRB1\*09:09, DRB1\*11:01:06, DRB1\*11:04:06, DRB1\*11:04:09, DRB1\*11:65:02, DRB1\*11:95, DRB1\*11:100, DRB1\*11:117, DRB1\*13:02:04, DRB1\*13:105, DRB1\*13:109, DRB1\*13:121, DRB1\*13:128, DRB1\*14:12:02, DRB1\*14:31, DRB1\*14:113, DRB1\*14:114, DRB1\*14:125, DRB1\*15:06:02, DRB1\*15:74, DRB1\*15:85, and DRB1\*15:86

## Not amplified by primers:

DRB1\*03:42, DRB1\*03:87, DRB1\*09:07, DRB1\*09:20, DRB1\*11:30, DRB1\*13:67, DRB1\*14:46, and DRB1\*15:19

# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA





# European Federation for Immunogenetics

---

## **STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING**

### **Version 6.2**

<b>D1.4</b>	High resolution typing is defined as the identification of HLA alleles that encode the same protein sequence within the antigen binding site.
<b>D1.4.1</b>	HLA alleles must be identified at the level of resolution which defines the first and second fields according to WHO nomenclature by at least resolving all ambiguities:
<b>D1.4.1.1</b>	resulting from polymorphisms located within exons 2 and 3 for HLA class I loci, and exon 2 for HLA class II loci.
<b>D1.4.1.2</b>	that encompass a null allele, wherever the polymorphism is located, unless it can be demonstrated that an expressed antigen is present on the cells.



# Kit Esoni 4-7 per Classe I

- ✓ 1 kit unico per ABC
- ✓ Primer e sonde per i loci A,B e C Esoni 4-7
- ✓ Supplemental ai kit A,B,C HD o regular (Analisi combinata)
- ✓ Risolve le ambiguità di alleli identici negli esoni 2 e 3
- ✓ Tipizza gli alleli Null senza l'utilizzo di SSP o SBT
- ✓ Stesso protocollo degli altri kit

# Example: null allele typing result

B\*51:11N case

B HD Result

B\*51:01:01/51:01:03/51:01:05/51:01:05/51:01:07/51:01:07/51:11N/51:30/51:32/51:48/51:51



BHD + Exon 4-7 Result

B\*51:11N

# Null Allele SSO Typing Kit

Esclude gli alleli Null CWD

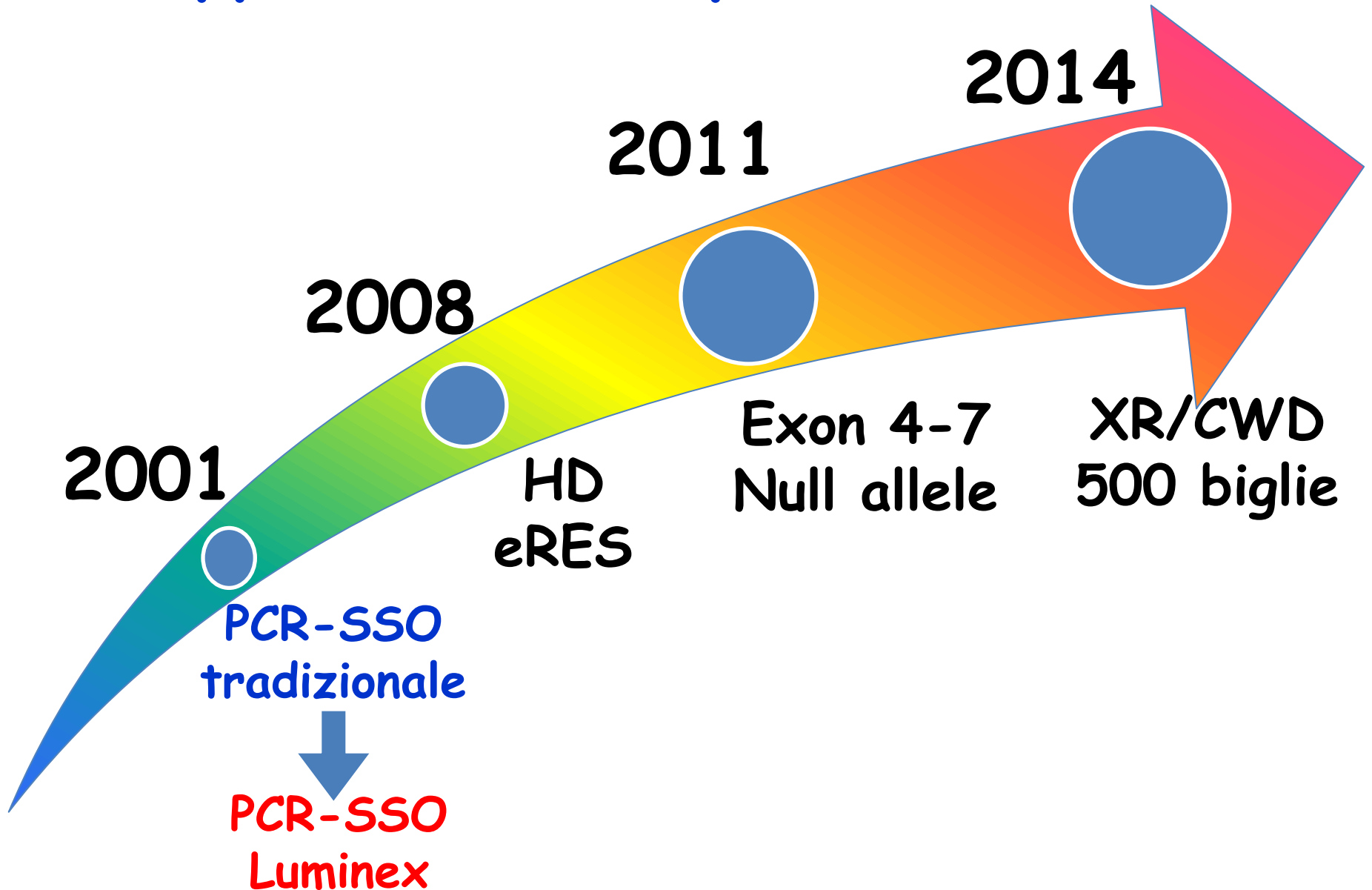
Class I

Allele* \ Probe	100	101	102	200	201	202	300	301	302	Probe \ Allele
HLA-A*24:09N	■		■							HLA-A*24:09N
HLA-A*XX	■	■								HLA-A*XX
HLA-B*51:11N				■		■				HLA-B*51:11N
HLA-B*XX				■	■					HLA-B*XX
HLA-C*04:09N							■		■	HLA-C*04:09N
HLA-C*XX							■	■		HLA-C*XX

Class II

Allele* \ Probe	400	401	402	500	501	502	Probe \ Allele
DRB4*01:03:01:02N	■		■				DRB4*01:03:01:02N
DRB4*XX	■	■					DRB4*XX
DRB5*01:08N				■		■	DRB5*01:08N
DRB5*01:XX				■	■		DRB5*01:XX

# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA



# High Definition vs Extended Resolution KIT DESIGN

	Amplified Regions				Bead / Probe Count		
	A	B	DRB1		A	B	DRB1
HD	2 / 3	2 / 3	2		594	765	260

	Amplified Regions				Bead / Probe Count		
	A	B	DRB1		A	B	DRB1
XR	2 / 3 / 4 / 5	2 / 3 / 4 / 5	2		784	831	261

- ✓ Maggior numero di sonde rispetto ai kit HD
- ✓ Amplificazione Esoni 2-3-4 e 5 per classe I ed Esone 2 per Classe II
- ✓ Stesso protocollo dei kit generici o HD



# High Definition vs Extended Resolution

## DRB1 Locus: HD vs XR

Local Demographic Data [CwD\_Jan 201

Group 1: frequent on both alleles

DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:01(G1)

Group 2: frequent on one allele

DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:06(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:08(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:09(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:11(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:111(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:112(G2)

Possible Allele Code

DRB1\*03:01P/03:50/03:68N/03:83  
DRB1\*04:01P/04:111/04:112/04:119N/04:127/04:135  
DRB1\*03:01P:=:03:01:01:01/03:01:01:02/03:01:03/03:01:05/03:01:07/03:01:08/03:01:09/03:01:10/03:01:11  
DRB1\*04:01P:=:04:01:01/04:01:06/04:01:08/04:01:09/04:01:11

Close Bead Rxn

**DR HD**

Local Demographic Data [CwD\_Jan 201

Group 1: frequent on both alleles

DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:01(G1)

Group 2: frequent on one allele

DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:06(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:08(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:09(G2)  
DRB1\*03:01:01:01 DRB1\*04:01:11(G2)

Possible Allele Code

DRB1\*03:01P/03:50/03:68N/03:83  
DRB1\*04:01P/04:111/04:112/04:119N/04:127/04:135  
DRB1\*03:01P:=:03:01:01:01/03:01:01:02/03:01:03/03:01:05/03:01:07/03:01:08/03:01:09/03:01:10/03:01:11  
DRB1\*04:01P:=:04:01:01/04:01:06/04:01:08/04:01:09/04:01:11

Close Bead Rxn #042

**DR XR**

Two P group allele pairs with allele strings....Results are identical...

# High Definition vs Extended Resolution

## Summary of Results – DRHD vs DRXR

---

- Overall results comparable to DRHD
- Same limitations found in CWD kit – Exon 2
- 24 - P group allele pair
- 73 - P group allele / P group and allele string
- 93 - Two P group allele pairs with allele strings

### Probe development needed –

- Alleles not amplified
- Alleles found in primer binding

Note: testing samples were done using beta pool, future lots will resolve limitations.



# High Definition vs Extended Resolution

A locus: HD vs XR

Local Demographic Data [CwD\_Jan 201 ^

Group 1: frequent on both alleles

A\*02:01:01:01 A\*24:02:01:01 (G1)  
A\*02:01:01:01 A\*24:02:01:02L (G1)  
A\*02:01:01:01 A\*24:09N (G1)  
A\*02:01:01:01 A\*24:11N (G1)  
A\*02:01:04 A\*24:02:01:01 (G1)  
A\*02:01:04 A\*24:02:01:02L (G1)  
A\*02:01:04 A\*24:09N (G1)  
A\*02:01:04 A\*24:11N (G1)  
A\*02:09 A\*24:02:01:01 (G1)  
A\*02:09 A\*24:02:01:02L (G1)

Possible Allele Code

A\*02:01P/02:43N/02:83N/02:305N/02:340/02:343/02:348/02:350N/02:351/02:354/02:356N/02:360/02:34  
A\*24:02P/A\*24:135P/24:09N/24:11N/24:40N/24:83N/24:155N/24:163N/24:183N/24:192/24:193/24:195/24  
A\*02:01P:=:02:01:01:01/02:01:01:02L/02:01:01:03/02:01:02/02:01:04/02:01:05/02:01:06/02:01:07/0  
A\*24:02P:=:24:02:01:01/24:02:01:02L/24:02:01:03/24:02:03Q/24:02:04/24:02:05/24:02:06/24:02:08,  
A\*24:135P:=:24:135:02

**A HD**

Local Demographic Data [CwD\_Jan 201 ^

Group 1: frequent on both alleles

A\*02:01:01:01 A\*24:02:01:01 (G1)  
A\*02:01:04 A\*24:02:01:01 (G1)

Group 2: frequent on one allele

A\*02:01:01:01 A\*24:02:01:03 (G2)  
A\*02:01:01:01 A\*24:02:04 (G2)

Possible Allele Code

A\*02:01P  
A\*24:02P

**A XR**

*Superior resolution of XR over HD.....*

# High Definition vs Extended Resolution

## A XR LIMITATIONS

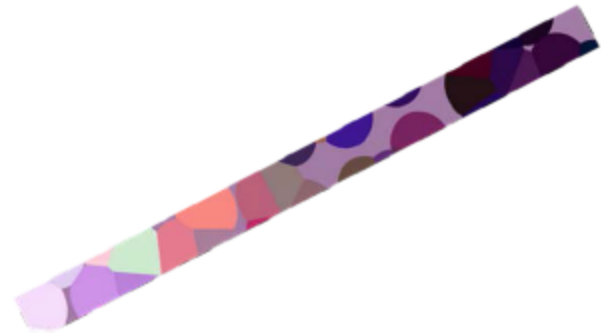
---

Of the 190 samples:

- 130 - P group allele pair
- 42 - A\*01:01N
- 19 - P allele group with addition rare allele(s)

Probe development needed

- Alleles not amplified
- Alleles found in primer binding



Note: testing samples were done using beta pool, future lots may resolve limitations.





# High Definition vs Extended Resolution

## B XR LIMITATIONS

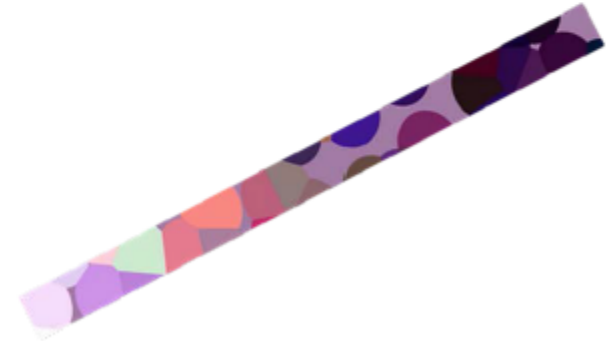
---

Of the 190 samples tested.....

- 54 - P group allele pair
- 70 – P group allele / P group allele and rare allele
- 66 – two p group allele pair, both with rare allele(s)

### Probe development needed

- Alleles not amplified
- Alleles found in primer binding



Note: testing samples were done using beta pool, future lots may resolve limitations.

---



# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

## Extended Resolution

Loci HLA	% Risultati a 4 digit P group <b>Senza ambiguitá</b>	% Risultati P group allele / P group and allele string
HLA-A	68%	10%
HLA-B	28%	36%
HLA-DRB1	13%	38%

# Evoluzione della tecnologia Luminex®

2001

Luminex  
100/200  
(100 biglie)

2012

Luminex xPonent  
Biglie magnetiche  
180 biglie

2014

FLEXMAP 3D  
500 Biglie

2001

PCR-SSO  
Luminex

2008

Kit HD o  
eRES

2011

Exon 4-7 o  
Null Allele  
Kit

2014

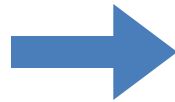
CWD/XR  
Kit  
500 Biglie

# Evoluzione della tecnologia Luminex® applicata alla Tipizzazione HLA

## Conclusioni

### Vantaggi

- ✓ Ideale per la tipizzazione di un elevato numero di campioni in tempi relativamente brevi in bassa, media e alta definizione.
- ✓ Costi contenuti.



- 1° Inserimento Donatori di CSE e Cord
- Studi familiari per Tx CSE
- Tx organi solidi
- HLA e malattie autoimmuni

### Limiti

- ✓ Risultati non sempre assegnabili a quattro digit



- Test H.R. Tx CSE MUD  
Necessaria l'integrazione con altre metodiche (PCR-SSP PCR-SBT)