



**AIBT**

# Summer School 2015

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

**Evoluzione della tecnologia Luminex**  
Serena Mistretta

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

# The New England Journal of Medicine

Copyright, 1969, by the Massachusetts Medical Society

Volume 280

APRIL 3, 1969

Number 14

## SIGNIFICANCE OF THE POSITIVE CROSSMATCH TEST IN KIDNEY TRANSPLANTATION\*

RAMON PATEL, M.R.C.P., AND PAUL I. TERASAKI, PH.D.



	<u>REJECTION</u>	<u>NO REJECTION</u>
POSITIVE CROSSMATCH	24	6
NEGATIVE CROSSMATCH	8	187

# 1971: dimostrazione dell'effetto della pre-sensibilizzazione

← 1° trapianto

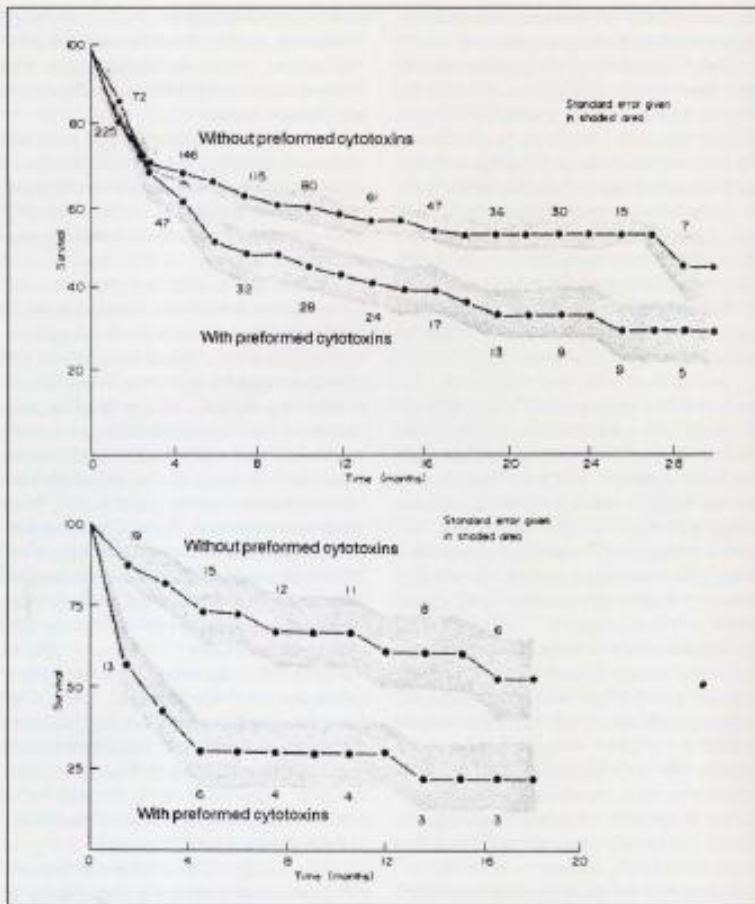


Figure 7. The effect of presensitization was first shown in this study for first and second cadaver donor transplants. 1971 (42)

Terasaki PI, Mickey MR, Kreisler M, Post Grad Med J 47:89-100, 1971

# 1971: dimostrazione dell'effetto della pre-sensibilizzazione

← 1° trapianto

← 2° trapianto

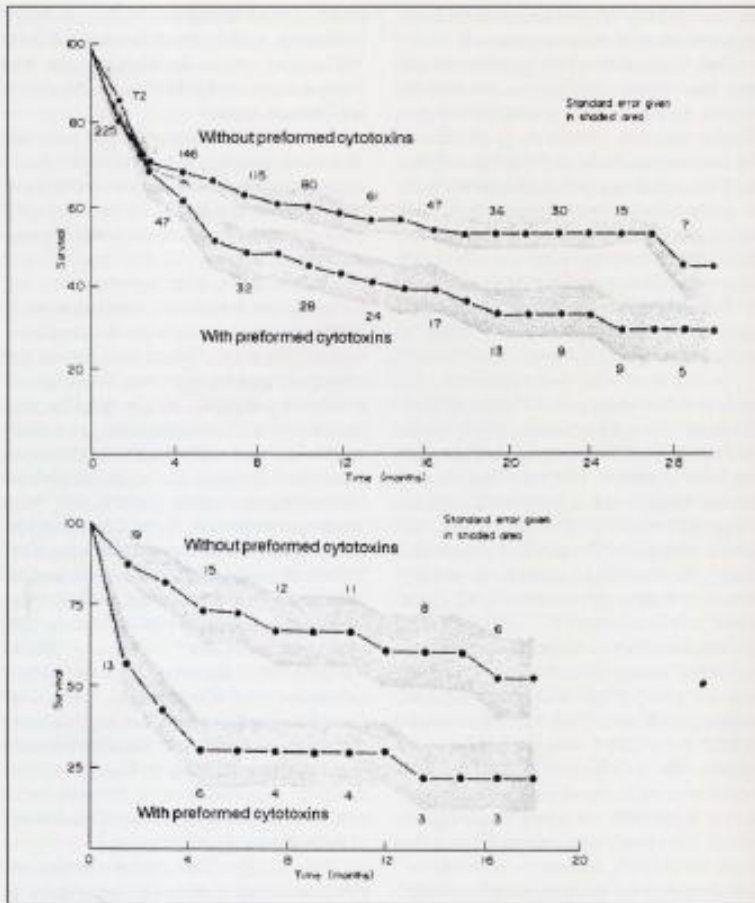


Figure 7. The effect of presensitization was first shown in this study for first and second cadaver donor transplants. 1971 (42)

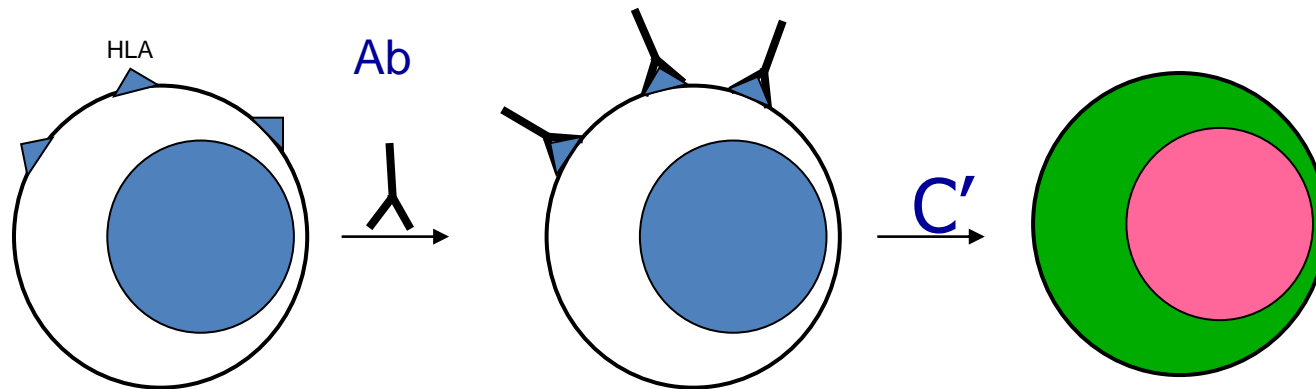
Terasaki PI, Mickey MR, Kreisler M, Post Grad Med J 47:89-100, 1971

# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

Il PRA (Panel Reactive Antibody) e l'identificazione delle specificità anticorpali sono stati valutati per decenni con metodiche di microlinfocitotossicità complemento dipendente (CDC)

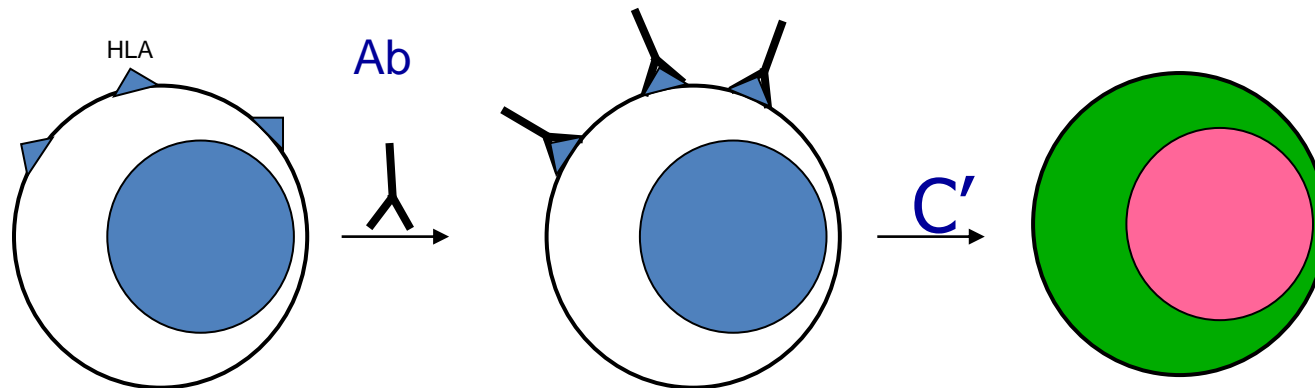
# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

Il PRA (Panel Reactive Antibody) e l'identificazione delle specificità anticorpali sono stati valutati per decenni con metodiche di microinfocitotossicità complemento dipendente (CDC)



# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

Il PRA (Panel Reactive Antibody) e l'identificazione delle specificità anticorpali sono stati valutati per decenni con metodiche di microinfocitotossicità complemento dipendente (CDC)



Nel tempo la CDC si è evoluta per aumentarne la sensibilità: AHG, long incubation, ecc.

# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

Negli anni '90, alla CDC sono state affiancate le METODICHE IN FASE SOLIDA, più specifiche e sensibili

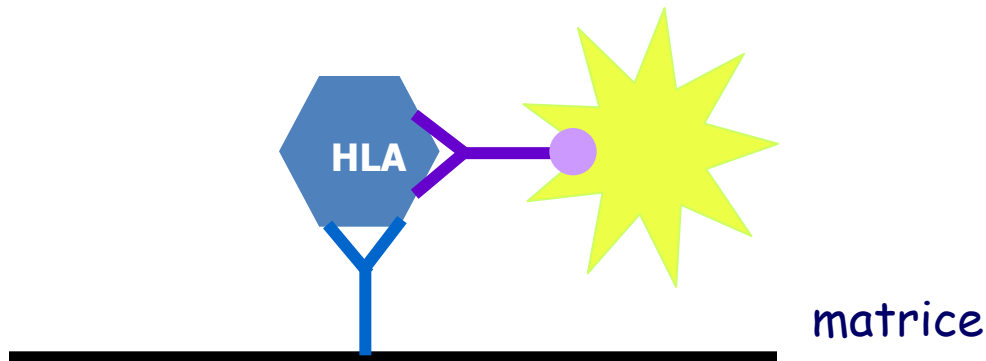


# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

Negli anni '90, alla CDC sono state affiancate le METODICHE IN FASE SOLIDA, più specifiche e sensibili

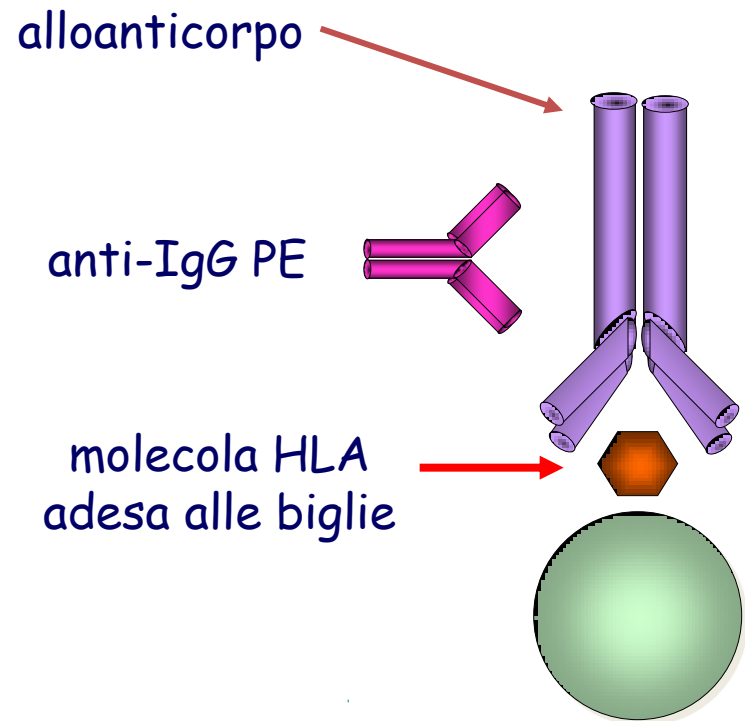
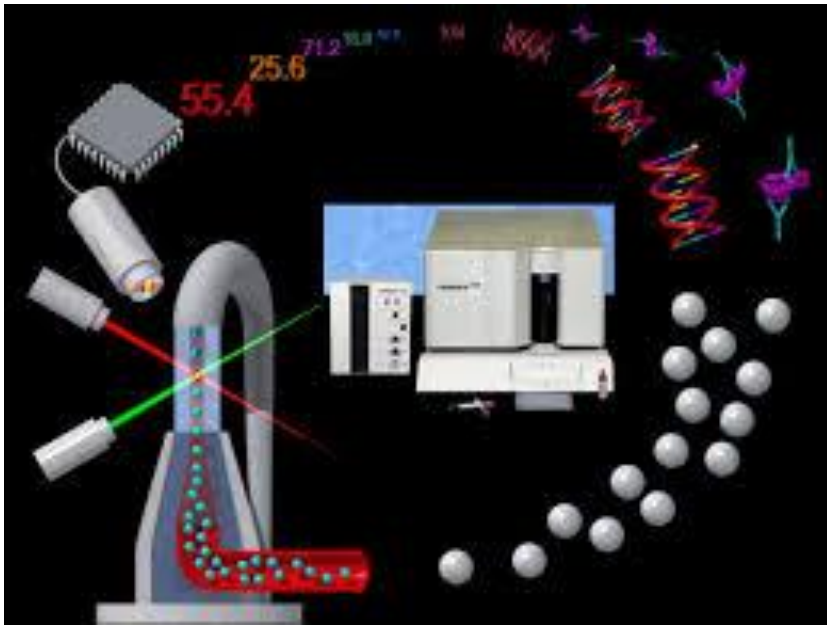
ELISA

Reazione Colorimetrica



# Caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preformati

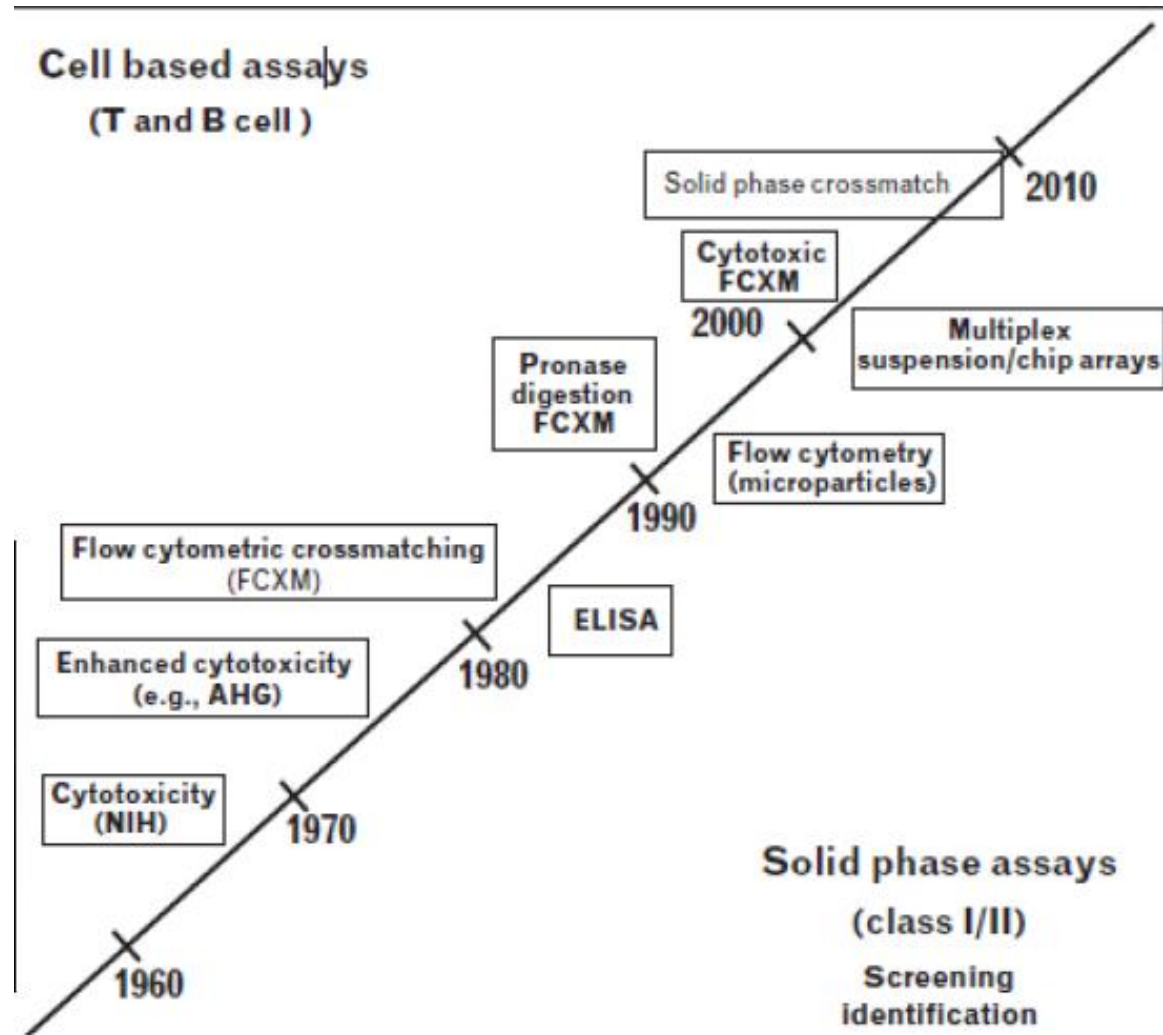
## Tecnologia Luminex

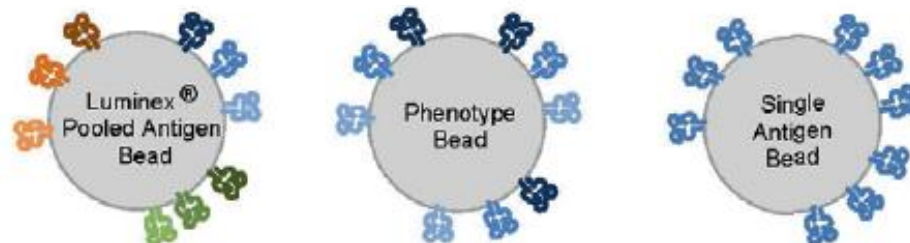
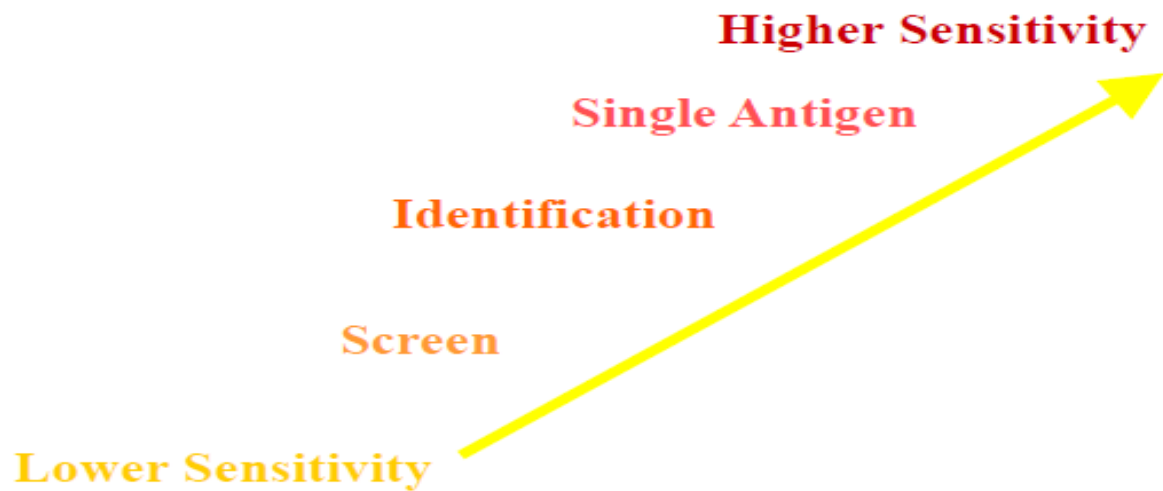


# The evolution and clinical impact of Human Leucocyte Antigen technology

Haward M. Gebel and Robert A Bray

Current opinion in Nephrology and Hypertension 2010, 19:598-602





<i>Application</i>	screening	specification	specification
<i>Relative antigen density</i>	low	intermediate	high
<i>Resolution</i>	–	★	★★★
<i>Antigen source</i>	Platelets, EBV-transformed cell line	EBV-transformed cell line	Recombinant cell line
<i>Antigen composition per bead</i>	Complete class I or II phenotype of 3–5 individuals	Complete class I or II phenotype of 1 individual	Single allelic antigen

# CDC: pro...

- Test semplice
- Test relativamente poco costoso (tempo-uomo)
- IgG/IgM



# CDC: ...e contro

- Valore predittivo limitato:
  - pazienti con specificità multiple
  - anticorpi a basso titolo (falsi negativi)
  - anticorpi non fissanti il complemento
  - Anticorpi non anti-HLA (falsi positivi)
- Riproducibilità ed estensione del pannello linfocitario

# Luminex: nuove prospettive...

- Sensibilità, specificità e riproducibilità  
anche in pazienti iperimmunizzati consente la precisa identificazione delle singole specificità
- Fornisce un'analisi semiquantitativa  
MFI: mean fluorescence intensity



# Luminex: nuove prospettive...

- Le *single antigen beads* (SAB) forniscono l'intero repertorio degli antigeni HLA di classe I e II (VIRTUAL-CROSSMATCH)
- Consente l'identificazione di anticorpi non-HLA (Es: MICA)
- Consente l'identificazione e la differenziazione delle Immunoglobuline fissanti/non fissanti il complemento (C1q/C3d)
- Nel follow-up permette interventi terapeutici mirati (diagnosi di AMR/monitoraggio dei DSA)



# Luminex: nuove problematiche!!

- Validazione della metodica
- Validazione dei reagenti (variazioni da lotto a lotto)
- Qualificazione dell'operatore

# Luminex: nuove problematiche!!

## Effetto prozona

Il siero sembra negativo o debolmente positivo quando testato intero, ma diventa positivo quando viene diluito, pretrattato (DTT-EDTA) o inattivato al calore.

- Eccesso di anticorpi
- Presenza di IgM
- Presenza di complemento

# Luminex: nuove problematiche!!

## Anticorpi naturali

Lachmann et al., Transfus Med Hemother 2013; 40:182-189

**Table 1.** List of the most frequent 'natural' HLA class I antibody specificities detected among 424 healthy blood donors without classical HLA alloimmunizing events [18] opposed to the antigen frequency among the US population with European descent [67] revealed the paradoxon between low frequent antigens but fairly high prevalence of antibodies

Specific A locus	Antibody frequency among blood donors, %	Caucasian antigen frequency, %	Specific B locus	Antibody frequency among blood donors, %	Caucasian antigen frequency, %
A*30:02	18.9	0.9	B*15:12	11.1	0
A*31:01	11.3	2.3	B*82:01	10.4	0
A*80:01	8.5	0	B*15:16	9.9	0
A*34:01	6.8	0	B*37:01	7.8	1.3
A*66:02	6.6	0	B*44:02	6.1	9.0
A*43:01	5.9	0	B*45:01	5.9	0.4
A*66:01	5.9	0.2	B*81:01	4.7	0

# Luminex: nuove problematiche!!

## Anticorpi naturali

Lachmann et al., Transfus Med Hemother 2013; 40:182-189

**Table 1.** List of the most frequent 'natural' HLA class I antibody specificities detected among 424 healthy blood donors without classical HLA alloimmunizing events [18] opposed to the antigen frequency among the US population with European descent [67] revealed the paradoxon between low frequent antigens but fairly high prevalence of antibodies

Specific A locus	Antibody frequency among blood donors, %	Caucasian antigen frequency, %	Specific B locus	Antibody frequency among blood donors, %	Caucasian antigen frequency, %
A*30:02	18.9	0.9	B*15:12	11.1	0
A*31:01	11.3	2.3	B*82:01	10.4	0
A*80:01	8.5	0	B*15:16	9.9	0
A*34:01	6.8	0	B*37:01	7.8	1.3
A*66:02	6.6	0	B*44:02	6.1	9.0
A*43:01	5.9	0	B*45:01	5.9	0.4
A*66:01	5.9	0.2	B*81:01	4.7	0

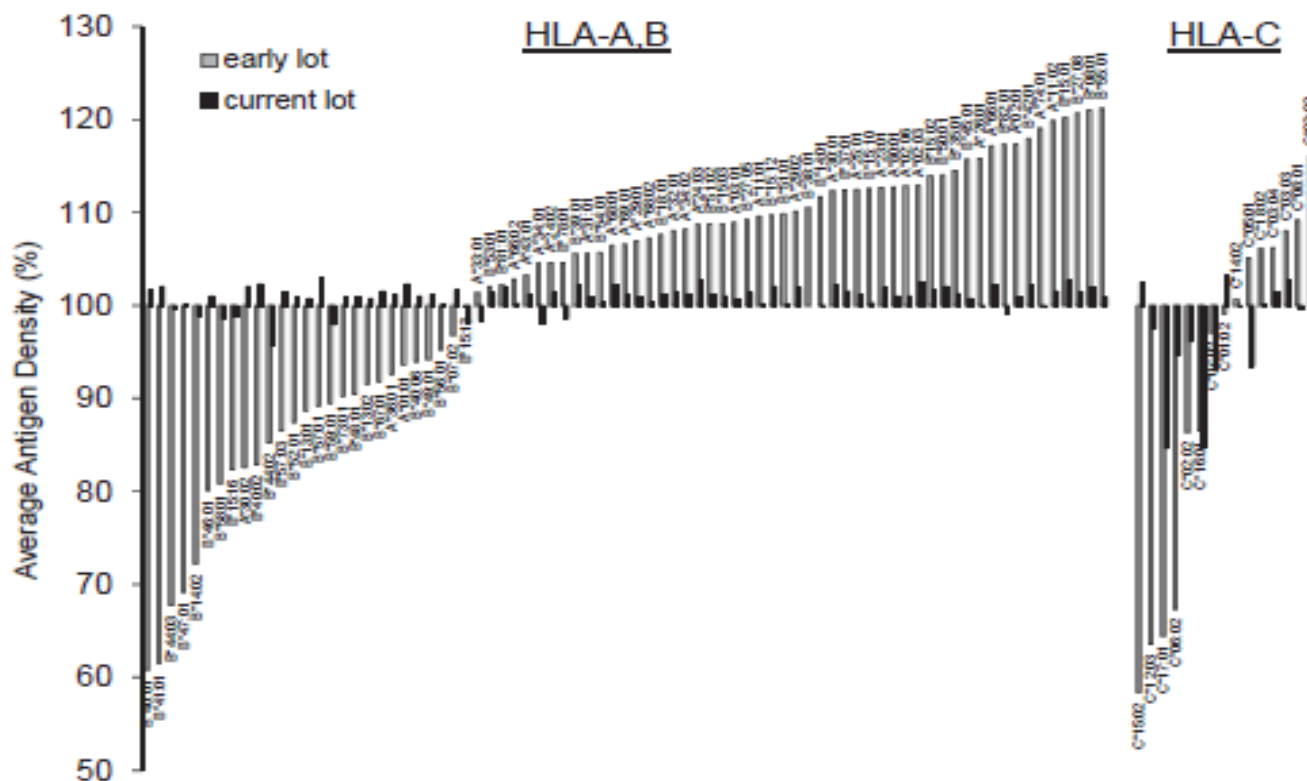
Dall'analisi degli epitopi, questi anticorpi sembrano reagire con residui aminoacidici non convenzionalmente esposti.

# Luminex: nuove problematiche!!

## Densità antigenica

Lachmann et al., Transfus Med Hemother 2013; 40:182-189

**Fig. 2.** Decreasing variability of the relative antigen density on HLA class I SAB of one vendor comparing an early and the most current lot. Relative antigen density was assessed by the monoclonal antibody clone W6/32 which binds a conformational epitope carried by all HLA-A, -B and -C native antigens. Variability of antigen density could be significantly reduced from an early (LAB-Screen lot#003) to a current lot (lot#007). HLA-C antigen density still reveals the highest variability.



# Conclusioni

- La tecnologia Luminex è una tecnica sofisticata e richiede competenza ed esperienza.
- Identifica tutte le allo-immunizzazioni con grande sensibilità e fornisce i mezzi per riconoscere quali anticorpi siano di reale rilevanza clinica.
- È diventata un valido supporto anche nei trapianti alternativi di cellule staminali emopoietiche e nella medicina trasfusionale.

# Conclusioni

- L'uso della tecnologia luminex ha rivoluzionato i protocolli trapiantologici e terapeutici, ha permesso la ridefinizione delle liste d'attesa e la fattibilità di trapianti un tempo impensabili.
- L'impiego combinato delle diverse metodiche di analisi dei sieri (cellulari e su fase solida) consente di determinare un preciso **profilo immunologico** per ogni candidato al trapianto e una ottimizzazione della scelta donatore-ricevente

Gestione qualità



Paola Affaticati



Segreteria  
Tiziana Cavallaro

Direttore



Dr. Raimondo Marcenò

Medico associato  
Renato Messina



Resp.

Magazzino

Giovanna Regina



HLA  
sierologia



Rosalba Bavetta



Emanuela Collura



Tiziana Traina



Serena Mistretta



Citometria

HLA  
molecolare



Valentina Cappuzzo



Francesco Ingrassia



Igea Vega



Maria Blando