

# XXIX

## Congresso Nazionale

# AIBT

Associazione Italiana  
di Immunogenetica  
e Biologia dei Trapianti

# abstract book 2023



"The programme of this event  
has been approved by the EFI  
Education Committee"

Roma, 5•7 ottobre 2023  
Sheraton Parco de' Medici Rome Hotel



Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18411-59</b>	Influenza degli antigeni MIC-A e dei loro recettori NKG2D sul rigetto cronico e sulla sopravvivenza del "graft" nei pazienti sottoposti a trapianto di rene.	<b>Mocci Stefano</b>	<S. Mocci> {1}, C. Sanna {1}, L. Littarru {2}, D. Argiolas {2}, S. Lai {3}, E. Giurelli {3}, M. Lorrain {1}, C. Mereu {1}, A. Mascia {1}, F. Lai {1}, F. Cannas {1}, M. Miglianti {4}, S. Rassu {3}, M. Plousiou {1}, C. Cocco {1}, L. Serventi {1}, R. Murru {3}, A. Pani {2}, R. Littera {5}, S. Giglio {1}	1. Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy 2. Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, 'Giuseppe Brotzu' Hospital, Cagliari, Italy 3. Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Italy 4. Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy 5. AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Italy	13
<b>AIB18435-65</b>	Tipizzazione dei geni KIR dei donatori aploidentici di cellule staminali emopoietiche: esperienza di un unico centro	<b>Pecoraro Alice</b>	<A. Pecoraro> {1}, F. Ingrassia {1}, M. Blando {1}, A. Corica {1}, F. Di Paola {1}, F. Bruno {1}, G. Davi {1}, A. Lo Brutto {1}, S. Mistretta {1}, R. Bavetta {1}, V. Cappuzzo {1}, R. Fedele {1}	1. Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.S. HLA -- U.O.C. Medicina TrASFusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello -- Palermo	14
<b>AIB18437-67</b>	Tipizzazione dei geni KIR dei donatori di cellule staminali emopoietiche non familiari compatibili: esperienza di un unico centro	<b>Ingrassia Francesco</b>	<F. Ingrassia> {1}, A. Pecoraro {1}, M. Blando {1}, A. Corica {1}, F. Di Paola {1}, F. Bruno {1}, A. Lo Brutto {1}, G. Davi {1}, S. Mistretta {1}, R. Bavetta {1}, V. Cappuzzo {1}, R. Fedele {1}	1. Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.S. HLA - U.O.C. Medicina TrASFusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello -- Palermo	15
<b>AIB18672-68</b>	Il ruolo della metodica Next Generation Sequencing (NGS) nella valutazione del chimerismo di una paziente sottoposta a tre trapianti di cellule staminali emopoietiche: case report	<b>Borotti Elena</b>	<E. Borotti> {1}, A. Schiro {1}, S. Guidotti {1}, A. Scarpa {1}, D. Ferrarese {1}, E. Maffini {2}, M. Ursi {2}, F. Bonifazi {2}, A. Rossi {1}	1. UO Biologia dei trapianti diagnostica molecolare e manipolazione cellule staminali emopoietiche, AUSL Piacenza 2. Programma Dipartimentale di Terapie Cellulari Avanzate, IRCCS AOU di Bologna	16
<b>AIB18673-69</b>	Ricostituzione autologa dopo trapianto di midollo osseo: case report	<b>Perotti Laura</b>	<L. Perotti> {1}, L. Longa {1}, N. Mordini {2}, R. Sorasio {2}, M. Prucca {1}, B. Bruno {1}, L. Calcagno {1}, M. Leone {3}, I. Ferrero {3}, F. Piovano {1}, I. Avonto {1}, L. Maddalena {1}, R. Balbo {1}, M. Ginestri {1}, P. Manzini {1}	1. SCI Immunoematologia e Medicina TrASFusionale - AO S. Croce e Carle - Cuneo 2. SC Ematologia - AO S. Croce e Carle - Cuneo 3. SC Oncoematologia Pediatrica -- AOU Città della Salute e della Scienza di Torino	17

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18677-73</b>	Implicazioni prognostiche e opportunità terapeutiche delle varianti genetiche di HLA-G nell'epatocarcinoma	<b>Lorrai Michela</b>	<M. Lorrai> {1}, S. Mocci {1}, C. Sanna {1}, C. Mereu {1}, F. Pes {2}, G. Tosone {1}, F. Cannas {1}, A. Mascia {3}, S. Lai {4}, E. Giuressi {4}, L. Chessa {2}, R. Littera {5}, S. Giglio {1}	1. Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari 2. Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari 3. Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari 4. Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Cagliari 5. AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Cagliari	18
<b>AIB18678-74</b>	Impatto dei polimorfismi di HLA-G e dei fattori genetici dell'ospite sul COVID-19: Ruolo nella gravità della malattia e nella prognosi	<b>Mereu Caterina</b>	<C. Mereu> {1}, S. Mocci {1}, C. Sanna {1}, M. Lorrai {1}, S. Tranquilli {1}, F. Cannas {1}, M. Plousiou {1}, C. Cocco {1}, L. Serventi {1}, A. Mascia {2}, M. Miglianti {3}, S. Lai {4}, E. Giuressi {4}, R. Littera {5}, S. Giglio {1}	1. Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari 2. Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari 3. Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari 4. Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Cagliari 5. AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Cagliari	19
<b>AIB18700-60</b>	Aplotipi HLA associati a mutazioni dell'emocromatosi nella popolazione sarda-studio preliminare	<b>Stradoni Roberta Daniela</b>	<R. Stradoni> {1}, A. Ibba {2}, G. Cualbu {2}, R. Meleddu {2}, A. Cossu {2}, B. Boi {2}, D. Chironi {2}, S. Giglio {1}, P. Carta {3}, P. Bitti {2}	1. Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari (CA), Italy 2. Tissue Typing Centre, Microcitemia Centre, Immunohaematology and Transfusional Medicine Service, "San Francesco" Hospital of Nuoro, Nuoro (NU), Italy 3. Medical Genetics Center and Prevention of Thalassemia, ASL 1, Ozieri Hospital, Ozieri (SS), Italy	20

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18701-61</b>	Associazione tra Pemfigoide Bolloso e allele HLA-DQB1*03:01	<b>Andreani Marco</b>	<M. Andreani> {1}, F. Locatelli {2}, G. Testa {1}, M. Battarra {1}, A. Pira {3}, F. Mariotti {3}, P. Caputi {3}, G. Di Zenzo {3}	1.Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia 2.Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia 3.Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare, Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS, Roma, Italia	21
<b>AIB18702-62</b>	Anticorpi anti recettore di tipo a dell'Endotelina 1 (ANTI-ETAR) e Trapianto Di Rene	<b>Bianculi Antonio Giuseppe</b>	<A. Bianculi> {1}, P. Giustiniani {1}, A. Guagnano {1}, A. Di Luzio {1}, F. Besi {1}, R. Labbadia {2}, L. Antonucci {2}, A. Cappoli {2}, I. Guzzo {2}, M. Andreani {1}	1.Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia 2.Nefrologia, Dialisi e Clinica del Trapianto di Rene, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia	22
<b>AIB18703-63</b>	Case Report - Utilità dei kit supplementari per l'identificazione degli anticorpi anti-HLA ed analisi per epitopi	<b>Bianculi Antonio Giuseppe</b>	<A. Bianculi> {1}, P. Giustiniani {1}, M. Troiano {1}, A. Di Luzio {1}, M. Andreani {1}	1.Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia	23
<b>AIB18704-64</b>	Registro Regionale dei donatori di midollo osseo delle Marche: un nuovo progetto per migliorare l'arruolamento dei donatori sul territorio marchigiano	<b>Agolini Stefano</b>	<S. Agolini> {1}, E. Carciaro {1}, P. Ferrucci {1}, A. Zoli {1}	1.Laboratorio HLA e Registro Regionale dei Donatori di Midollo Osseo delle Marche(RRAN01) – Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche - Ancona	24
<b>AIB18705-65</b>	Decision trees to evaluate the risk of developing Multiple Sclerosis	<b>Pasella Manuela</b>	<M. Pasella> {1}, F. Pisano {1}, B. Cannas {1}, A. Fanni {1}, E. Cocco {2}, J. Frau {2}, F. Lai {3}, S. Mocci {4}, R. Littera {4}, S. Giglio {4}	1.Dipartimento di Ingegneria Elettrica ed Elettronica, Università di Cagliari, Cagliari 2.Centro Sclerosi Multipla, ASL Cagliari, Università di Cagliari, Cagliari 3.Unità di Oncologia e patologia molecolare, Università di Cagliari, Cagliari 4.Genetica medica, Università di Cagliari, Cagliari	25

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18710-61</b>	Possibile ruolo dell'interazione KIR3DL2/HLA-A*11:01 nella gravità dell'infezione di SARS-CoV-2	<b>Tupone Maria Grazia</b>	<M. Tupone> {1}, V. Cofini {2}, C. Cervelli {3}, R. Azzarone {3}, O. Valdez {3}, C. Battistoni {3}, S. Necozione {2}, M. Scimitarra {3}, A. Petrucci {4}, S. Melena {5}, M. Falco {6}, F. Papola {3}	1.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale, ASL1 Abruzzo, L'Aquila 2.Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della vita e dell'ambiente, Università degli Studi - L'Aquila 3.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale, ASL1 Abruzzo - L'Aquila 4.Centro Elaborazione Dati ASL2 Lanciano, Vasto, Chieti 5.Dipartimento Sanità- Servizio Assistenza Farmaceutica. Regione Abruzzo 6.Laboratorio di Immunologia clinica e Sperimentale- IRCCS G.Gaslini. Genova	26
<b>AIB18711-62</b>	Diluizioni del siero come biomarcatore predittivo per la desensibilizzazione attraverso TPE: un valido approccio esplorativo al trapianto di rene per pazienti sensibili.	<b>Tupone Maria Grazia</b>	M. Tupone {1}, <C. Cervelli> {1}, O. Valdez {1}, R. Azzarone {1}, M. Scimitarra {1}, A. Panarese {2}, A. Ruggetti {3}, C. Battistoni {1}, D. Fracassi {1}, D. Pulcinelli {1}, S. Scacchi {1}, S. Scipione {1}, B. Spaziani {1}, F. Pisani {2}, F. Papola {1}	1.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale - ASL1 Abruzzo-L'Aquila 2.Centro Trapianti di organo - Dipartimento scienze chirurgiche e dei trapianti di organi - Università degli Studi di L'Aquila 3.(3) Servizio di Immunematologia e Medicina Trasfusionale - ASL1 Abruzzo-L'Aquila	27
<b>AIB18716-67</b>	Role of HLA matching and donor-specific antibody development in long-term survival, acute rejection, and allograft cardiac vasculopathy	<b>Costa Dario</b>	<D. Costa> {1}, A. Picascia {1}, V. Grimaldi {1}, C. Amarelli {2}, A. Petraio {2}, A. Levi {1}, M. Di Donato {1}, A. Pirozzi {1}, C. Fiorito {1}, G. Moccia {1}, A. Gallo {1}, C. Marra {2}, M. De Feo {2}, F. Cacciatore {3}, C. Maiello {2}, I. Napol {4}	1.Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli - Napoli 2.Dipartimento di Cardiocirurgia e Trapianti, Ospedali dei Colli - Napoli 3.Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II - Napoli 4.Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli - Napoli	28

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18717-68</b>	Correlazione tra presenza di anticorpi DSA e rigetto in pazienti affetti da Emoglobinopatie e trattati con Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche da donatore Aploidentico	<b>Giustiniani Paola</b>	<P. Giustiniani> {1}, F. Galaverna {2}, P. Merli {2}, A. Bianculli {1}, M. Becilli {2}, R. Carta {2}, E. Boccieri {2}, R. Pinto {2}, M. Troiano {1}, T. Galluccio {1}, F. Locatelli {3}, M. Andreani {1}	1.Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy 2.Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy 3.Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy	29
<b>AIB18718-69</b>	Potenzialità dell'immunosequencing applicato all'analisi del repertorio immunitario di un paziente affetto da leucemia linfoblastica acuta di tipo T sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche	<b>Scarpa Alice</b>	<A. Scarpa> {1}, E. Borotti {1}, D. Ferrarese {1}, S. Guidotti {1}, V. Scaglia {1}, A. Schiro {1}, A. Rossi {1}, D. Vallisa {2}	1.UOC Biologia dei trapianti, Ospedale "G. da Saliceto", AUSL, Piacenza 2.UOC Ematologia e CTMO, Ospedale "G. da Saliceto", AUSL, Piacenza	30
<b>AIB18721-63</b>	Identificazione di un nuovo gene KIR ibrido generato da crossing-over ineguale tra KIR2DP1 e KIR2DL1	<b>Scarpa Alice</b>	<A. Scarpa> {1}, M. Troiano {2}, R. Meazza {3}, G. Rombolà {4}, M. Andreani {2}, M. Azzaro {5}, A. Pecoraro {6}, M. Curcio {7}, F. Ingrassia {6}, S. Lai {8}, G. Mongelli {9}, A. Pasi {10}, A. Rossi {1}, R. Saladino {11}, R. Littera {8}, M. De Stefano {12}, R. Crocchiolo {13}, M. Perrone {14}, F. Papola {15}, M. Falco {16}	1.Ospedale Guglielmo da Saliceto, Piacenza 2.IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma 3.IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova 4.AOU Careggi, Firenze 5.AOU Policlinico San Marco, Catania 6.P.O. Cervello - A.O.R. Villa Sofia-Cervello, Palermo 7.Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa 8.SC. Genetica Medica, ASL, Cagliari 9.AOUC Policlinico, Bari 10.Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 11.G.O.M. Bianchi Melacrino Morelli, Reggio Calabria 12.Centro Nazionale Trapianti, Istituto Superiore di Sanità, Roma 13.ASST Grande Ospedale Metropolitano, Niguarda, Milano 14.AOU Policlinico Umberto I, Roma 15.Ospedale S. Salvatore ASL1 Abruzzo, L'Aquila 16.IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova	31

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18723-65</b>	Identificazione di una duplicazione funzionale di HLA-B, HLA-C e MICA in una famiglia cariotipicamente normale	<b>Gualandris Federica</b>	<F. Gualandris> {1}, L. Castellani {1}, A. Pansa {2}, D. Roelen {3}, J. Drabbels {3}, S. Van Wageningen {4}, E. Rozemuller {4}, D. Hart {4}, F. Ingrassia {5}, E. Longhi {6}, L. Barcella {1}	1.Laboratorio di Immunogenetica (SIMT), ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo 2.Laboratorio di Citogenetica e Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo 3.Department of Immunohematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands 4.GenDx, Utrecht, The Netherlands 5.Laboratorio di Immunogenetica Ospedale Cervello Palermo 6.Transfusion and Immunohaematology Centre Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano	32
<b>AIB18724-66</b>	Attività degli auto-anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR su cellule del sistema immunitario dopo trapianto renale pediatrico	<b>Vadori Marta</b>	<M. Vadori> {1}, E. Cuciz {1}, S. Negrisolò {2}, E. Vianello {3}, J. Igeno San Miguel {3}, B. Antonello {2}, A. Carraro {2}, E. Poggi {4}, A. Manfreda {4}, R. Labbadia {5}, V. Sioli {6}, E. Longhi {6}, T. De Feo {6}, M. Spada {7}, M. Andreani {8}, E. Benetti {3}, E. Cozzi {1}	1.UOSD Immunologia dei Trapianti, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova 2.Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale Università di Padova 3.UOC Nefrologia Pediatrica, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale Università di Padova 4.CNR-IFT Roma San Camillo-Centro Regionale Trapianti Lazio-Laboratorio di Tipizzazione Tissutale e Immunologia dei Trapianti, Ospedale San Camillo, Roma 5.UOC Follow up trapianto Renale. Ospedale pediatrico Bambino Gesù. Roma 6.UOC Trapianti Lombardia/NITp, Fondazione IRCCS CA' Granda Ospedale Policlinico di Milano 7.Chirurgia Epatobiliopancreatica e del Trapianto di Fegato e di Rene, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS 8.UOS Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma	33

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18725-67</b>	Associazione fra la divergenza evolutiva del sistema HLA e l'esito clinico del trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico: uno studio del registro europeo EBMT	<b>Crivello Pietro</b>	P. Crivello {1}, J. Mooyaart {2}, N. Kröger {3}, R. Peffault de Latour {4}, H. Sengeloiev {5}, I. Yakoub-Agha {6}, J. Finke {7}, W. Bethge {8}, P. Merli {9}, M. Andreani {9}, S. Pagliuca {10}, C. Gurnari {11}, J. Hoogenboom {12}, L. de Wreede {2}, B. Meyer {13}, T. Lenz {13}, C. Chabannon {14}, F. Malard {15}, A. Ruggeri {16}, <K. Fleischhauer> {1}	1.University Hospital Essen, Germany 2.EBMT Statistical Unit, Leiden, The Netherlands 3.University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany 4.Saint-Louis Hospital, BMT Unit, Paris, France 5.Bone Marrow Transplant Unit L 4043, Copenhagen, Denmark 6.CHU de Lille, Lille, France 7.University of Freiburg, Freiburg, Germany 8.University of Tübingen, Tübingen, Germany 9.IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy 10.CHRU Nancy and CNRS UMR 7365 IMoPa, Nancy, France 11.University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy 12.EBMT Leiden Study Unit, Leiden, The Netherlands 13.University of Hamburg, Germany 14.Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France 15.Hopital Saint Antoine, Paris, France 16.IRCCS San Raffaele, Milan, Italy	34
<b>AIB18726-68</b>	HLA class I expression on human platelets is highly variable and correlates with distinct allele frequencies	<b>Cantisani Rocco</b>	<R. Cantisani> {1}, V. Del Re {1}, F. Toraldo {1}, S. Cantara {2}, S. Pozzessere {1}, G. Marotta {1}, A. Spreafico {1}	1.Department of Innovation, Experimentation and Clinical and Translational Research, University Hospital of Siena, Siena, Italy 2.Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences, University of Siena, Siena, Italy	35
<b>AIB18727-69</b>	Mismatch antigenico ed epitope mismatch nel trapianto cardiaco	<b>Manfroi Silvia</b>	<S. Manfroi> {1}, M. Masetti {2}, L. Borgese {3}, A. Aloisio {2}, L. Giovannini {2}, A. Zanetti {1}, L. Potena {2}	1.Programma Dipartimentale Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna 2.SSD Insufficienza Cardiaca e Trapianti, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna 3.Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC) Università di Bologna	36
<b>AIB18728-70</b>	Caratteristiche demografiche ed immunologiche dei pazienti in lista per trapianto di rene da donatore cadavere	<b>Biagini Chiara</b>	C. Biagini {1}, F. Vistoli {2}, V. De Gregorio {1}, E. Kauffmann {2}, S. Fornaciari {1}, R. Lamanna {1}, F. Galati {1}, S. Di Beo {1}, L. Felet {1}, U. Boggi {2}, <M. Curcio> {1}	1.Sezione Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy 2.UO Chirurgia Generale e dei Trapianti-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa	37



Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18729-71</b>	Introduzione della tecnologia NGS nella pratica clinica: standard EFI e punti critici	<b>Lamanna Roberta</b>	R. Lamanna {1}, C. Biagini {1}, S. Fornaciari {1}, V. De Gregorio {1}, D. Mandarino {1}, D. Gonnella {1}, F. Salvadori {1}, B. Luchetti {1}, <M. Curcio> {1}	1. Sezione Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy	38
<b>AIB18730-63</b>	Selezione e purificazione delle cellule Natural Killer in pazienti oncoematologici pediatrici sottoposti a trapianto di cellule staminali	<b>Madalese Donato</b>	<D. Madalese> {1}, R. Colucci {1}, L. Auriemma {1}, G. Maisto {1}, S. Nappo {1}, M. Toriello {1}, R. Casalino {1}, F. Tambaro {2}, R. Penta de Vera d'Aragona {1}	1. UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia 2. UOC Trapianto di cellule emopoietiche e Terapia cellulari – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia	39
<b>AIB18731-64</b>	Metodiche di estrazione: standardizzazione ed analisi statistica	<b>Auriemma Laura</b>	L. Auriemma {1}, <D. Madalese> {1}, R. Colucci {1}, S. Nappo {1}, M. Toriello {1}, R. Casalino {1}, R. Penta de Vera d'Aragona {1}	1. UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia	40
<b>AIB18732-65</b>	Convalida della metodica di rilevazione del dd-cfDNA per la sorveglianza del trapianto di rene mediante estrazione automatizzata	<b>Londero Donatella</b>	<D. Londero> {1}, C. Sindici {1}, C. Cervellin {1}, E. Cecchini {1}, I. Sandron {1}, G. Barillari {1}	1. Dip. Med. Trasfusionale, ASUFC Udine	41
<b>AIB18737-70</b>	Incompatibilità a livello di eplets ed esito clinico del trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore aploidentico in pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne	<b>Andreani Marco</b>	<M. Andreani> {1}, P. Merli {2}, P. Crivello {3}, R. Pinto {2}, M. Troiano {1}, K. Fleishhauer {3}, F. Locatelli {4}	1. Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy 2. Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia 3. Institute for Experimental Cellular Therapy, University Hospital Essen, Germany 4. Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia	42
<b>AIB18738-71</b>	Monitoraggio precoce del chimerismo in pazienti pediatrici oncoematologici	<b>Colucci Rosa</b>	R. Colucci {1}, <D. Madalese> {1}, R. Casalino {1}, L. Auriemma {1}, S. Nappo {1}, M. Toriello {1}, F. Tambaro {2}, R. Penta de Vera d'Aragona {1}	1. UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia 2. UOC Trapianto di cellule emopoietiche e Terapia cellulari – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia	43

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18739-72</b>	Imlifidase: nuove prospettive per i pazienti iperimmuni. L'esperienza del centro Trapianti di Parma.	<b>Labate Claudia</b>	C. Labate {1}, <S. Giuliodori> {1}, S. Bardini {1}, M. Benecchi {1}, P. Berni {1}, C. Foroni {1}, M. Iaria {2}, F. Lobascio {1}, E. Magni {1}, J. Manduca {1}, R. Merli {1}, A. Palmisano {3}, J. Parrotta {1}, I. Pezzani {1}, C. Puliatti {2}, E. Rus-sello {1}, V. Sgobba {1}, R. Troiano {1}, U. Maggiore {3}, P. Zanelli {1}	1.SDD Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma 2.UO Chirurgia trapianti, Clinica Chirurgica Generale, AOU di Parma 3.SS Trapianti, UO Nefrologia, AOU di Parma e Dipartimento di Medicina e Chirurgia Università di Parma	44
<b>AIB18740-64</b>	Identificazione di 2 nuovi alleli HLA di classe II mediante Next Generation Sequencing.	<b>Giuliodori Silvia</b>	<S. Giuliodori> {1}, P. Berni {1}, C. Labate {1}, J. Manduca {1}, J. Parrotta {1}, R. Troiano {1}, P. Zanelli {1}	1.SDD Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma	45
<b>AIB18741-65</b>	Impiego della trasfusione piastrinica come parte della desensibilizzazione nei pazienti con DSA di classe I pre-trapianto allogenico HLA-mismatch: esperienza monocentrica nel decennio 2013-2023	<b>Lando Giuliana</b>	<G. Lando> {1}, R. Crocchiolo {1}, G. Di Maggio {1}, G. Cornacchini {1}, G. Grillo {2}, B. Mazzi {3}, S. Rossini {1}, M. Tassara {4}	1.SIMT, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano 2.Centro Trapianti Midollo, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano 3.Laboratorio HLA, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano 4.SIMT. IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano	46
<b>AIB18742-66</b>	Probabile disomia uniparentale materna del cromosoma 6 (upd(6)mat) in un paziente affetto da Leucemia Mieloide Acuta in attesa di trapianto di CSE	<b>Papola Franco</b>	<F. Papola> {1}, A. Zoli {2}, A. Olivieri {3}, R. Azzarone {1}, O. Valdez {1}, M. Tuppone {1}, S. Agolini {2}, I. Scortechini {3}, E. Trinchini {1}, C. Battistoni {1}, S. Scipione {1}, S. Scacchi {1}, G. Rombolà {4}, C. Cervelli {1}	1.Centro Regionale di Immunematologia e tipizzazione tissutale - ASL1 Avezzano Sulmona L'Aquila 2.Laboratorio HLA - Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche - Ancona 3.Clinica Ematologica - Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche - Ancona 4.Immunogenetica, SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze	47
<b>AIB18746-70</b>	Gruppo di Lavoro Operativo AIBT-CNT per la standardizzazione della analisi bead-array Luminex per la ricerca anticorpi HLA: risultati preliminari	<b>Ciappi Dario</b>	<D. Ciappi> {1}, A. Piazza {2}, G. Rombolà {1}, M. de Stefano {2}, F. Papola {3}	1.AOU Careggi Firenze 2.Commissione Controlli Qualità HLA e Chimerismo Centro Nazionale Trapianti Roma 3.Centro Regionale Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale, PO L'Aquila	48
<b>AIB18747-71</b>	Rilevanza della tipizzazione HLA mediante NGS in un caso di HLA loss in LNH-B	<b>Sbarsi Ilaria</b>	<I. Sbarsi> {1}, P. Bergamaschi {1}, L. Chiesa {1}, E. Roncoroni {2}, R. Sciarra {2}, C. Cavalloni {2}, R. Cacciatore {1}, C. Bottazzi {1}, C. Prezioso {1}, A. Pasi {1}, C. Perotti {1}	1.Laboratorio di Immunogenetica, SIMT, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, IT 2.SC Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, IT	49

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18748-72</b>	Significato di varianti SNPs-HLA in pazienti anziani affetti da leucemia mieloide acuta: risultati di uno studio randomizzato multicentrico	<b>Cuzzola Maria</b>	M. Cuzzola {1}, M. Franco- ne {1}, <R. Saladino> {1}, E. Spiniello {1}, A. Candoni {2}, P. Salutari {3}, G. Pa- lumbo {4}, G. Reda {5}, G. Ianni' {6}, G. Tripepi {7}, D. Capelli {8}, C. Alati {9}, M. Cannata' {10}, S. Barilla' {10}, P. Musto {11}, I. Del- fino {9}, N. Yasuhito {12}, S. Ogawa {13}, C. Mammi' {10}, E. Oliva {9}	1.UOSD Tipizzazione Tissuta- le, Grande Ospedale Metro- politano Bianchi Melacrino Morelli, Reggio Calabria, Italia 2.Divisione di Ematologia, P.O. Santa Maria della Misericor- dia, A.S.U.F.C. di Udine, Italia 3.Dipartimento di Ematologia, Ospedale Civile Spirito Santo, Pescara, Italia 4.UOC Emato- logia, Grande Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate "G.F. In- grassia", Università di Catania, Italia 5.Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Italia 6.Dielnet SRL, CRO ,Reggio Calabria, Italia 7.IFC-CNR Istituto di Fisiolo- gia Clinica, Reggio Calabria, Italia 8.Clinica di Ematologia, Azienda Ospedaliera Univer- sitaria delle Marche, Ospedali Riuniti di Ancona, Italia 9.UOC Ematologia, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi Mela- crino Morelli Reggio Calabria, Italia 10.UOSD Genetica Me- dica, Grande Ospedale Me- tropolitano Bianchi Melacrino Morelli Reggio, Calabria, Italia 11.Dipartimento di Medicina di Precisione e Rigenerativa e Area Ionica, "A. Moro" Univer- sità Scuola di Medicina di Bari, Italia 12.Department of Patho- logy and Tumor Biology, Kyoto University. Institute for Advan- ced Study of Human Biology (WPI-ASHBi), Kyoto University, Kyoto, Japan 13.Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan	50
<b>AIB18749-73</b>	DSA ad alto valore MFI verso epitopi pubblici anti DP in un trapianto CSE MUD 10/10	<b>Mattei Mauro Leucio</b>	<M. Mattei> {1}, S. Pal- chetti {1}, G. Rombolà {1}, S. Iozzi {1}, M. Betti {1}, E. Pelo {1}	1.SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze	51

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB18750-65</b>	Effetto prozona in citometria? Una possibile strategia per evitare risultati falsi negativi.	<b>Trovato Salinaro Elisa</b>	E. Trovato Salinaro {1}, L. del Giudice {1}, <S. Andreis> {1}, R. Favero {1}, F. Agusson {2}, P. Da Rugna {1}, S. Fabris {1}, R. Longhin {1}, P. Donato {3}, G. Ugolini {3}, M. Albergoni {1}	1.UOC Immunotrasfusionale, Azienda Ospedale Università Padova, DIMT Padova 2.UOC Medicina Trasfusionale, AULSS6 Euganea, DIMT Padova 3.USD Chirurgia dei Trapianti di Rene, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona	52
<b>AIB18751-66</b>	Introduzione e validazione del sequenziamento di nuova generazione dei geni del sistema HLA mediante piattaforma automatizzata.	<b>Zompa Marco</b>	M. Zompa {1}, L. Rocchi {1}, T. Melchiorre {1}, A. Giordano {1}, <R. Fiore> {1}, D. Bongioanni {1}, E. Navaretti {1}, R. Chidichimo {1}, G. Mazzola {1}, F. Bertinetto {1}, E. Garino {1}, O. Amoros {2}	1.S.C. Immunogenetica e Biologia dei Trapianti Torino 2.S.C. Immunogenetica e Biologia dei Trapianti Torin	53
<b>AIB18752-67</b>	Monitoraggio del chimerismo post-HSCT attraverso un sistema NGS: validazione ed applicazione alla routine di laboratorio	<b>Iozzi Sara</b>	<S. Iozzi> {1}, D. Ciappi {1}, S. Palchetti {1}, M. Mattei {1}, M. Betti {1}, L. Trentin {2}, E. Durante {2}, G. Rombolà {1}, E. Pelo {1}	1.SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze 2.UOC Medicina Trasfusionale, AULSS2 Marca Trevigiana, Treviso	54
<b>AIB18754-69</b>	Trasmissione intrauterina dell'infezione da Citomegalovirus (CMV): coinvolgimento dell'interazione tra recettori KIR e molecole HLA	<b>Pasi Annamaria</b>	<A. Pasi> {1}, C. Fornara {2}, R. Cacciatore {1}, I. Sbarsi {1}, L. Chiesa {1}, C. Prezioso {1}, C. Radaelli {1}, P. Bergamaschi {1}, M. Furione {3}, A. Arossa {4}, P. D'Angelo {3}, F. Baldanti {5}, A. Spinillo {6}, C. Perrotti {1}, D. Lillieri {2}	1.Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 2.Servizio di Medicina di Laboratorio, Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Pavia 3.Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 4.Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 5.Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia & Dipartimento di Scienze clinico-chirurgiche, diagnostiche e pediatriche, Università degli Studi di Pavia 6.Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia & Dipartimento di Scienze clinico-chirurgiche, diagnostiche e pediatriche, Università degli Studi di Pavia	55
	Reclutamento dei potenziali donatori di CSE e tipizzazione HLA: quali strategie?	<b>Ceschini Nadia</b>	Nadia Ceschini, Anna Stanizzi, Angelica Moro, Paola Boccagni	U.O. Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale dell'Ospedale Santa Chiara di Trento	56



Abstract Code: AIB18411-59

## Influenza degli antigeni MIC-A e dei loro recettori NKG2D sul rigetto cronico e sulla sopravvivenza del “graft” nei pazienti sottoposti a trapianto di rene.

S. Mocci<sup>1</sup>, C. Sanna<sup>1</sup>, L. Littarru<sup>2</sup>, D. Argiolas<sup>2</sup>, S. Lai<sup>3</sup>, E. Giuressi<sup>3</sup>, M. Lorrai<sup>1</sup>, C. Mereu<sup>1</sup>, A. Mascia<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, F. Cannas<sup>1</sup>, M. Miglianti<sup>4</sup>, S. Rassu<sup>3</sup>, M. Plousiou<sup>1</sup>, C. Cocco<sup>1</sup>, L. Serventi<sup>1</sup>, R. Murru<sup>3</sup>, A. Pani<sup>2</sup>, R. Littera<sup>5</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

(1) Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy, (2) Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, ‘Giuseppe Brotzu’ Hospital, Cagliari, Italy, (3) Medical Genetics Unit, R. Bina-ghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Italy, (4) Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy, (5) AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Italy

### Introduzione

Un numero crescente di lavori scientifici evidenzia come anche le molecole HLA non classiche (HLA-G, HLA-E, HLA-F, MICA e MICB) e i loro recettori possano svolgere un ruolo rilevante nel regolare la risposta del sistema immunitario contro le infezioni e le cellule tumorali e l’allo-reattività nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche e di organi.

### Scopo del lavoro

In questo lavoro abbiamo valutato il ruolo dei geni *MICA* e *MICB* (*MHC class I chain-related gene A and B*) e del loro specifico recettore NKG2D nell’outcome del trapianto di rene.

### Materiali & Metodi

Sono stati inclusi nello studio 100 pazienti sardi trapiantati di rene dal 2012 al 2018. Tutti i Pazienti e i rispettivi donatori (trapianto da cadavere) sono stati tipizzati in alta risoluzione per gli alleli *MICA* e *MICB* con metodica NGS. Le coppie donatore/ricevente (D/R) sono state stratificate in base al numero di mismatch degli alleli (0, 1, 2 mismatch). Inoltre sono stati analizzati con metodica NGS, i polimorfismi del gene *NKG2D* capaci di influenzare l’affinità del recettore nei confronti degli antigeni MICA e MICB.

### Risultati

I dati mostrano come il numero dei mismatch MICA si associ ad una maggiore incidenza di episodi di rigetto cronico (hazard ratio (HR), 1.77; 95% confidence interval (CI): 1.16 – 2.43; Log Rank = 0.004) e a una minore sopravvivenza dell’organo trapiantato (HR, 2.25; 95% CI: 1.35-3.12; Log Rank = 0.002).

### Conclusioni

Questi risultati seppur preliminari, evidenziano l’importanza dell’analisi del “matching” MICA tra donatore e ricevente per l’identificazione dei pazienti ad alto rischio di rigetto e perdita dell’organo trapiantato.

Lo studio necessita di essere confermato su una popolazione differente da quella sarda e studiando una coorte più ampia di pazienti.

Abstract Code: AIB18435-65

## Tipizzazione dei geni KIR dei donatori aploidentici di cellule staminali emopoietiche: esperienza di un unico centro

A. Pecoraro<sup>1</sup>, F. Ingrassia<sup>1</sup>, M. Blando<sup>1</sup>, A.A. Corica<sup>1</sup>, F. Di Paola<sup>1</sup>, F. Bruno<sup>1</sup>, G. Davì<sup>1</sup>, A. Lo Brutto<sup>1</sup>, S. Mistretta<sup>1</sup>, R. Bavetta<sup>1</sup>, V. Cappuzzo<sup>1</sup>, R. Fedele<sup>1</sup>

(1) Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.S. HLA ↔ U.O.C. Medicina Trasfusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello – Palermo

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE) è una terapia salvavita per i pazienti con neoplasie ematologiche. Un donatore HLA completamente compatibile è l'opzione migliore, ma la probabilità di trovare un donatore identico è di circa il 30% e i donatori non correlati compatibili (MUD) sono disponibili in media entro 2-3 mesi dall'inizio della ricerca del donatore. Per questo motivo, l'uso di trapianti alternativi da donatori aploidentici è aumentato notevolmente nell'ultimo decennio ed è tuttora in aumento. Non esistono al momento dei criteri rigidi per la selezione di un donatore; la presenza di anticorpi anti-HLA diretti contro antigeni donatore-specifici verso l'aplotipo HLA non condiviso (DSA) può essere un criterio di esclusione, così come potrebbe esserlo la presenza di anticorpi paziente-specifici presenti nel siero del potenziale donatore (RSA). È stato ipotizzato che le cellule natural killer (NK) possano contribuire all'effetto di eliminazione delle cellule leucemiche residue (GvL) e tale processo sia regolato dal riconoscimento tra i recettori polimorfici delle cellule killer (KIR) e ligandi HLA di classe I espressi sulle cellule bersaglio. Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di particolari genotipi KIR (B/x), alcuni geni attivatori di KIR (Cen B) e una popolazione NK alloreattiva nel donatore siano associati a un migliore esito clinico dei trapianti. Da aprile 2022, in accordo con i nostri centri trapianti, abbiamo iniziato ad eseguire la tipizzazione dei geni KIR su tutti i potenziali donatori aploidentici. Abbiamo tipizzato i geni KIR su 131 donatori aploidentici idonei per 79 pazienti con varie neoplasie ematologiche, dei quali 33 avevano un solo donatore disponibile, mentre 46 ne avevano almeno due. La tipizzazione dei geni KIR è stata eseguita mediante il metodo PCR-SSO Luminex utilizzando il kit KIR SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). Nell'analisi abbiamo valutato sia il genotipo (A/A o B/x), sia il B Content score (0-4), definendo anche se un donatore è Neutral, Better o Best utilizzando il sito "Donor KIR B-content group calculator" ([https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/b\\_content/](https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/b_content/)). Inoltre, secondo il modello di mismatch KIR/KIR-L, analizzando la tipizzazione HLA di classe I sia del donatore sia del ricevente e il genotipo KIR del donatore è stato possibile predire la presenza o l'assenza di alloreattività nella direzione GvH utilizzando il KIR Ligand Calculator (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/ligand/>). I risultati mostrano 26 donatori con genotipo A/A e 105 con genotipo B/x (68 neutral, 42 better e 21 best); 46 con alloreattività in direzione GvH e 85 senza alloreattività. Considerando che la maggior parte dei pazienti ha almeno due donatori aploidentici disponibili, i nostri risultati preliminari suggeriscono che l'esecuzione della genotipizzazione KIR nella pratica clinica di routine potrebbe essere un ulteriore criterio per l'eventuale scelta del migliore donatore.

Abstract Code: AIB18437-67

## Tipizzazione dei geni KIR dei donatori di cellule staminali emopoietiche non familiari compatibili: esperienza di un unico centro

F. Ingrassia<sup>1</sup>, A. Pecoraro<sup>1</sup>, M. Blando<sup>1</sup>, A.A. Corica<sup>1</sup>, F. Di Paola<sup>1</sup>, F. Bruno<sup>1</sup>, A. Lo Brutto<sup>1</sup>, G. Davì<sup>1</sup>, S. Mistretta<sup>1</sup>, R. Bavetta<sup>1</sup>, V. Cappuzzo<sup>1</sup>, R. Fedele<sup>1</sup>

(1) Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.S. HLA - U.O.C. Medicina Trasfusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello – Palermo

L'istocompatibilità tra donatore e ricevente è un fattore fondamentale per ottenere un buon esito clinico nel trapianto di cellule staminali emopoietiche. Questa procedura è una terapia consolidata ormai da molti anni per la cura di numerosi pazienti con emopatie maligne ed ereditarie. Il donatore familiare HLA identico è l'opzione migliore, purtroppo però meno di un terzo dei pazienti che necessitano di un trapianto ne hanno uno disponibile. La prima alternativa possibile è il donatore non familiare compatibile (MUD) 10/10 per i geni HLA-A, B, C, DRB1, DQB1. La probabilità di trovare un MUD 10/10 varia in media tra il 16% e il 75% con una probabilità più bassa per i pazienti di origine africana e più alta per quelli di origine europea. Nel caso in cui non sia possibile trovare un donatore MUD 10/10, si possono considerare altre opzioni come il MUD 9/10, il donatore familiare aploidentico o il sangue cordonale. Altri due importanti fattori da tenere in considerazione sono la presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici rivolti verso eventuali mismatch e la permissività al Locus HLA-DPB1 che nei trapianti MUD è quasi sempre mismatched. Sono stati condotti numerosi studi per valutare l'impatto di fattori non-HLA sull'esito clinico del trapianto: tra questi la giovane età del donatore e la compatibilità per lo stato sierologico del CMV sono considerati i più rilevanti. Altri fattori studiati includono il ruolo dell'effetto antileucemico delle cellule natural killer (NK) che possono contribuire all'eliminazione delle cellule leucemiche residue (GvL). Diversi lavori hanno dimostrato che specifici genotipi KIR (B/x) e alcuni geni attivatori KIR (Cen B) sono associati a un migliore esito clinico dei trapianti. Da aprile 2022, in accordo con i nostri centri trapianti, abbiamo iniziato ad eseguire la tipizzazione dei geni KIR su tutti i potenziali MUD selezionati per il test di conferma. Abbiamo tipizzato i geni KIR su 102 donatori per 72 pazienti affetti da varie neoplasie ematologiche. Di questi, 45 avevano un solo donatore disponibile, mentre 27 ne avevano almeno due. La tipizzazione dei geni KIR è stata eseguita mediante il metodo PCR-SSO Luminex utilizzando il kit KIR SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). Nell'analisi, abbiamo valutato il genotipo (A/A o B/x) e il B Content score (0-4) definendo anche se un donatore era Neutral, Better o Best utilizzando il "Donor KIR B-content group calculator" ([https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/b\\_content/](https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/matching/b_content/)). I risultati ottenuti sono i seguenti: 35 donatori con genotipo A/A e 67 con genotipo B/x; 76 neutral, 17 better e 9 best. Considerando la possibilità di trovare due o più donatori non familiari compatibili per ogni paziente, questi risultati preliminari, indicano che l'inclusione della tipizzazione dei geni KIR nella pratica clinica di routine potrebbe rappresentare un criterio aggiuntivo per la scelta del migliore donatore.

Abstract Code: AIB18672-68

## **Il ruolo della metodica Next Generation Sequencing (NGS) nella valutazione del chimerismo di una paziente sottoposta a tre trapianti di cellule staminali emopoietiche: case report**

E. Borotti <sup>1</sup>, A. Schiro <sup>1</sup>, S. Guidotti <sup>1</sup>, A. Scarpa <sup>1</sup>, D. Ferrarese <sup>1</sup>, E. Maffini <sup>2</sup>, M. Ursi <sup>2</sup>, F. Bonifazi <sup>2</sup>, A. Rossi <sup>1</sup>

(1) UO Biologia dei trapianti diagnostica molecolare e manipolazione cellule staminali emopoietiche, AUSL Piacenza,  
(2) Programma Dipartimentale di Terapie Cellulari Avanzate, IRCCS AOU di Bologna

Si presenta il caso di una giovane adulta con precedente diagnosi di leucemia linfoblastica acuta B, avvenuta presso un Centro Esterno nel 1999, con esordio all'età di 7 anni e ricaduta 5 anni dopo. L'anno successivo la paziente è sottoposta ad un primo trapianto di midollo osseo (TMO) allogenico con donatore mismatched unrelated (MMUD) ed è monitorata post trapianto mediante l'analisi di short tandem repeat (STR) rilevando un chimerismo misto mantenuto negli anni successivi. Nel 2022, presso un secondo Centro, alla paziente è diagnosticata una mielodisplasia secondaria therapy-related ad alto rischio con cariotipo complesso e chimerismo misto con 20% donatore. La paziente è pertanto candidata a secondo TMO aploidentico con la madre, eseguito a dicembre dello stesso anno. 30 giorni post II trapianto inizia il monitoraggio del chimerismo presso il nostro Laboratorio. Data l'impossibilità di determinare il chimerismo con metodica STR per la mancanza del I donatore, le valutazioni sono effettuate analizzando 202 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) mediante metodica NGS. L'analisi è eseguita su DNA estratto da swab buccale per il genotipo pre trapianto della paziente, da linfociti congelati del donatore aploidentico per il genotipo del II donatore e da sangue periferico (SP) e linee cellulari CD3+, CD19+ e CD33+ separate da SP per la valutazione post II trapianto. Si evidenzia un chimerismo misto su tutti i prelievi analizzati, mentre alla valutazione successiva tale dato evolve in un mancato attecchimento del II donatore con 70% del paziente pre trapianto e 30% del I donatore. A febbraio 2023, data l'evidenza anche clinica di graft failure, la paziente è sottoposta ad un terzo trapianto con donatore MMUD. A 18 giorni dal III trapianto è richiesto il monitoraggio del chimerismo su SP e linee cellulari CD3+, CD19+ e CD33+ da SP. Si esegue il test su un prelievo di linfociti congelati del III donatore. Dovendo confrontare i profili di 4 diversi genotipi di cui uno non noto, l'analisi NGS non consente di discriminare un numero sufficiente di SNPs significativi, pertanto si rende necessario il recupero del campione del I donatore. Si esegue il test del I donatore e si ripete l'analisi bioinformatica dei campioni inserendo il nuovo genotipo: si osserva la presenza di 100% III donatore, dato confermato sui prelievi di SP e linee CD19+ e CD33+, mentre il campione di CD3+ mostra 97.4% III donatore con 0.4% paziente, 0.7% I donatore e 1.5% II donatore. All'ultima valutazione (60gg post III trapianto) il chimerismo è completo su tutti i prelievi. L'analisi del chimerismo mediante NGS presenta un' aumentata sensibilità del test (LoD 0.3%) se paragonato alla metodica gold standard STR (LoD 2%). Si dimostra un valido metodo nel monitoraggio di pazienti sottoposti a trapianti multipli e consente di valutare il chimerismo in caso di singolo o doppio trapianto in cui non sia possibile reperire il DNA del paziente o di un donatore.



Abstract Code: AIB18673-69

## Ricostituzione autologa dopo trapianto di midollo osseo: case report

L. Perotti<sup>1</sup>, L.A. Longa<sup>1</sup>, N. Mordini<sup>2</sup>, R. Sorasio<sup>2</sup>, M. Prucca<sup>1</sup>, B. Bruno<sup>1</sup>, L. Calcagno<sup>1</sup>, M. Leone<sup>3</sup>, I. Ferrero<sup>3</sup>, F. Piovano<sup>1</sup>, I. Avonto<sup>1</sup>, L. Maddalena<sup>1</sup>, R. Balbo<sup>1</sup>, M. Ginestri<sup>1</sup>, P.M. Manzini<sup>1</sup>

(1) SCI Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - AO S. Croce e Carle - Cuneo, (2) SC Ematologia - AO S. Croce e Carle - Cuneo, (3) SC Oncoematologia Pediatrica – AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

**Introduzione:** l'analisi del chimerismo post-trapianto è fondamentale per il monitoraggio dell'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche (CSE) trapiantate, del rigetto o di una recidiva di malattia, permettendo interventi terapeutici prima della comparsa di manifestazioni cliniche. Riportiamo il caso di un paziente (pz) affetto da leucemia mieloide acuta con mutazione del gene NPM1, trapiantato con CSE midollari di un donatore (don) non familiare, condizionato con un regime mieloablattivo a ridotta tossicità (Bu4Flu), con mismatch (MM) ai loci HLA-A e DPB1 e monitorato fino a 18 mesi (m) dal trapianto (tx), per il quale si è assistito ad una perdita graduale di chimerismo senza manifestazioni cliniche evidenti.

**Materiali e metodi:** il chimerismo è stato studiato mediante analisi di STR (Short Tandem Repeat) con kit PowerPlex Fusion System, 23 frammenti + amelogenina (Promega), su campioni di sangue periferico (P) e midollare (M). Sul campione +8m dal tx, il chimerismo è stato valutato anche su popolazioni di linfociti CD3+ e granulociti CD13+, separate con gradiente-ficoll, aggiunta di CD3 MicroBeads e purificazione con AutoMacs Pro Separator (Miltenyi). La tipizzazione HLA su prelievo di sangue M o P è stata eseguita in SSO (OneLambda), SBT (GenDx) e NGS (GenDx).

**Risultati:** dopo un iniziale attecchimento completo a 30g, 60g e 100g, è seguita una perdita scalare di chimerismo su P (95.8% +7m, 87% +8m, 44% +10m, 28% +11m, 29% +13m, 26% +15m), perdita molto più accentuata su M (70% +8m, 9% +15m). Al contrario, a 18m dal tx si è osservato su P un lieve aumento di cellule del don (35%). L'analisi sulle sottopopolazioni a +8m è risultata 91% per CD3+ e 92% per CD13+. La tipizzazione HLA dei loci con MM del pz (A\*01:01P,\*31:01P DPB1\*04:01P,\*14:01P) e del don (A\*01:01P,\*02:01P; DPB1\*02:01P,\*03:01P) è stata analizzata con NGS su alcuni campioni post-tx correlati ai tempi con perdita del chimerismo: +7m P, +8m M, +15m M/P. Anche per l'HLA si osserva una situazione di chimerismo misto, più accentuata sui campioni +8m e +15m.

**Discussione:** la ricostituzione autologa dopo tx di midollo osseo si associa solitamente ad una recidiva di malattia; talvolta può esser secondaria ad un regime non sufficientemente mieloablattivo o immunosoppressivo in pazienti non abbastanza immunodepressi. Non è il caso del nostro paziente, trapiantato dopo pesanti chemioterapie di prima e seconda linea. Da notare la comparsa di un eritema cutaneo non riconducibile ad una GvHD (istologia negativa) che dopo trattamento steroideo è scomparso ed è stato accompagnato da un incremento della % di cellule del donatore. La strada dell'infusione di linfociti del donatore non è stata percorsa per indisponibilità dello stesso.

**Conclusioni:** nonostante l'evidenza di una graduale perdita del chimerismo, il paziente è attualmente in remissione clinica ed in sola osservazione a 18 mesi dal tx. La ricostituzione autologa in questo paziente non è stata per ora associata a recidiva di malattia.

Abstract Code: AIB18677-73

## Implicazioni prognostiche e opportunità terapeutiche delle varianti genetiche di HLA-G nell'epatocarcinoma

M. Lorrai<sup>1</sup>, S. Mocci<sup>1</sup>, C. Sanna<sup>1</sup>, C. Mereu<sup>1</sup>, F. Pes<sup>2</sup>, G. Tosone<sup>1</sup>, F. Cannas<sup>1</sup>, A. Mascia<sup>3</sup>, S. Lai<sup>4</sup>, E. Giuressi<sup>4</sup>, L. Chessa<sup>2</sup>, R. Littera<sup>5</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

(1) Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari, (2) Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari, (3) Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, (4) Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Cagliari, (5) AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Cagliari

**Introduzione.** L'epatocarcinoma (HCC) è il settimo tumore più comune al mondo e rappresenta la terza causa di mortalità correlata al cancro. Nonostante i progressi nella terapia, la diagnosi precoce e la previsione accurata della prognosi rappresentano ostacoli difficili da affrontare. Alterazioni non fisiologiche delle molecole HLA-G (antigene leucocitario umano G) sono state osservate in varie condizioni patologiche, tra cui il cancro, le infezioni virali, le malattie infiammatorie, le malattie autoimmuni e nei trapianti. Nell'HCC, la capacità tolerogenica dell'HLA-G è stata associata a una prognosi sfavorevole a causa dell'inibizione delle cellule del sistema immunitario che favorirebbe la progressione del tumore.

**Obiettivo.** Questo studio si propone di analizzare le basi genetiche di *HLA-G* e il suo ruolo nello sviluppo dell'HCC nella popolazione sarda.

**Materiali e Metodi.** Una coorte di 116 pazienti affetti da HCC e 140 controlli sani è stata analizzata per valutare le varianti genetiche di *HLA-G*.

**Risultati.** L'analisi del locus di *HLA-G* non ha rivelato differenze significative nelle frequenze tra pazienti e controlli sani: l'aplotipo esteso più prevalente in entrambi i gruppi era l'*UTR-1* (34,3% nei controlli vs. 32,76% nell'HCC). Tuttavia, il risultato più interessante è emerso dall'analisi della sopravvivenza complessiva (OS) nei pazienti affetti da HCC, per il polimorfismo *HLA-G 3'UTR (rs371194629)*. Infatti, è emerso che la frequenza del genotipo *HLA-G 3'UTR Ins/Ins* sia notevolmente più alta nei pazienti con una sopravvivenza di almeno 60 mesi rispetto al gruppo di pazienti al momento del reclutamento e al gruppo di controllo [44,4% vs 22,4% vs. 22,8%;  $\chi^2 = 30,528$ ,  $p = 0,00001$ ]. Inoltre, a differenza degli altri gruppi, la frequenza del genotipo *HLA-G 3'UTR Ins/Ins* è risultata più elevata all'interno di questo gruppo di pazienti rispetto al genotipo eterozigote *Ins/Del* (44,4% vs. 37,8%).

**Conclusioni.** I risultati ottenuti indicano che la presenza del genotipo *HLA-G 3'UTR 14bp Ins/Ins*, associato a una diminuzione dell'espressione della molecola HLA-G, sembra correlarsi con una prognosi più favorevole. Questi risultati indicano che la variabilità genetica nel locus di *HLA-G* potrebbe influenzare l'espressione della molecola stessa e contribuire allo sviluppo differenziale dell'HCC. Di conseguenza, l'*HLA-G* rappresenta un potenziale marcatore prognostico e terapeutico per l'HCC.

Abstract Code: AIB18678-74

## Impatto dei polimorfismi di HLA-G e dei fattori genetici dell'ospite sul COVID-19: Ruolo nella gravità della malattia e nella prognosi

C. Mereu<sup>1</sup>, S. Mocci<sup>1</sup>, C. Sanna<sup>1</sup>, M. Lorrà<sup>1</sup>, S. Tranquilli<sup>1</sup>, F. Cannas<sup>1</sup>, M. Plousiou<sup>1</sup>, C. Cocco<sup>1</sup>, L. Serventi<sup>1</sup>, A. Mascia<sup>2</sup>, M. Miglianti<sup>3</sup>, S. Lai<sup>4</sup>, E. Giuressi<sup>4</sup>, R. Littera<sup>5</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

(1) Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari, (2) Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, (3) Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari, (4) Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Cagliari, (5) AART-ODV (Association for the Advancement of Research on Transplantation), Cagliari

**Introduzione.** Durante la pandemia da SARS-CoV-2 sono stati identificati numerosi fattori di rischio e protettivi che possono influenzare l'evoluzione del COVID-19. Tra questi, recenti studi hanno esplorato il ruolo delle molecole di HLA-G e i loro effetti immunomodulatori nel COVID-19.

**Obiettivo.** Questo studio si propone di analizzare l'impatto dei fattori genetici dell'ospite, inclusi i polimorfismi del gene *HLA-G* e la sua molecola solubile (sHLA-G) nell'infezione da SARS-CoV-2.

**Materiali e Metodi.** Sono state confrontate le caratteristiche immuno-genetiche e fenotipiche tra pazienti affetti da COVID-19 (n = 381) con diversi gradi di gravità della malattia e 420 controlli sani provenienti dalla Sardegna (Italia).

**Risultati.** Dai risultati dell'analisi del locus *HLA-G* è emerso che l'aplotipo esteso *HLA-G01:01:01:01/UTR-1* fosse più comune sia nei pazienti affetti da COVID-19 che nei controlli. Questo aplotipo esteso era più frequente nei pazienti con sintomi lievi rispetto a quelli con sintomi gravi [22.7% vs 15.7%, OR = 0.634 (95% CI 0.440 – 0.913); P = 0.016]. Inoltre, il risultato più significativo è stato osservato per il polimorfismo *HLA-G 3'UTR (rs371194629)*. Nello specifico, la frequenza del genotipo *HLA-G 3'UTR Del/Del* è risultata diminuire gradualmente dal 27,6% nei pazienti paucisintomatici al 15,9% nei pazienti con sintomi gravi (X<sup>2</sup> = 7,095, P = 0,029), raggiungendo la frequenza più bassa del 7,0% nei pazienti in terapia intensiva (X<sup>2</sup> = 11,257, P = 0,004). Tuttavia, non sono state osservate differenze significative nei livelli di *HLA-G* solubile tra pazienti e controlli. Infine, utilizzando un modello di regressione logistica, abbiamo dimostrato che il genotipo *HLA-G 3'UTR Del/Del* era indipendente da altre variabili significative [ORM = 0,4 (95% CI 0,2 - 0,7), PM = 6,5 x 10<sup>-4</sup>], che sono anche note per influenzare l'infezione da SARS-CoV-2 nella popolazione sarda (beta-talassemia trait, la combinazione KIR2DS2/HLA-C C1+, l'aplotipo esteso *HLA-B58:01, C07:01, DRB103:01* e la variante Neanderthal del gene *LZTFL1 (rs35044562A>G)*).

**Conclusioni.** I nostri risultati rivelano nuove varianti genetiche che potenzialmente potrebbero servire come biomarcatori per la prognosi e il trattamento della malattia, sottolineando l'importanza di considerare i fattori genetici nella gestione dei pazienti affetti da COVID-19.

Abstract Code: AIB18700-60

## Aplotipi HLA associati a mutazioni dell'emocromatosi nella popolazione sarda- studio preliminare

R.D. Stradoni<sup>1</sup>, A. Ibba<sup>2</sup>, G. Cualbu<sup>2</sup>, R. Meleddu<sup>2</sup>, A. Cossu<sup>2</sup>, B. Boi<sup>2</sup>, D. Chironi<sup>2</sup>, S.R. Giglio<sup>1</sup>, P. Carta<sup>3</sup>, P.P. Bitti<sup>2</sup>

(1) Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari (CA), Italy, (2) Tissue Typing Centre, Microcitemia Centre, Immunohaematology and Transfusional Medicine Service, "San Francesco" Hospital of Nuoro, Nuoro (NU), Italy, (3) Medical Genetics Center and Prevention of Thalassemia, ASL 1, Ozieri Hospital, Ozieri (SS), Italy

L'emocromatosi ereditaria (HH) è una patologia autosomica recessiva caratterizzata da un maggiore assorbimento e deposito multiorgano di ferro. Senza trattamento, la morte può verificarsi per cirrosi, carcinoma epatico primario, diabete o cardiomiopatia. Il gene-malattia, HFE, è sito sul braccio corto del cromosoma 6, in prossimità del locus del gene HLA-A. Esso è stato identificato dall'osservazione di 3 varianti denominate C282Y, S65C e H63D di cui la prima, in particolare, è stata trovata in più del 90% dei pazienti nella popolazione caucasica [1]. Sulla popolazione caucasica di origine spagnola è stata trovata un'associazione significativa tra C282Y e l'aplotipo HLA-A3/B7 e la variante H63D è risultata associata all'aplotipo HLA-A29/B44 [2-3]. Nella popolazione sarda, il substrato paleo-mediterraneo pre-caucasico risulta essere associato con maggiore frequenza all'aplotipo HLA-A30 B18 Cw5 DR3 DQ2 (14.62%) e all'aplotipo HLA-A2 B58 Cw7 DR2 DQ1 (5.99%) [4]. Il nostro studio vuole fornire un dato sulla frequenza degli aplotipi ancestrali HLA della popolazione sarda associati alle mutazioni HFE risultate essere più frequenti in Sardegna.

### MATERIALI E METODI

Il DNA è stato estratto dai leucociti del sangue periferico. IL gene HFE è stato amplificato tramite metodica di PCR Multiplex e rivelato tramite revers dotblot. Gli aplotipi HLA sono stati analizzati con metodica SSO e con SSP e analizzati con una risoluzione a due campi. Sono stati finora analizzati 30 pazienti afferenti ai C.T. di Nuoro e Ozieri.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

Le varianti S65C e C282Y non sembrano avere correlazione con i fenotipi più comuni in Sardegna. I pazienti con la variante H63D in eterozigosi con delezione HFE mostrano una forte correlazione con l'aplotipo HLA-A2B58Cw7DR2DQ1 mentre i pazienti in omozigosi per H63D risultano correlare in maniera significativa al fenotipo HLA-A30B18Cw5DR3DQ2 di origine caucasica [5]. I pazienti con doppia eterozigosi H63D/other o w.t. risultano avere un aplotipo sardo A2 - A30 in eterozigosi presumibilmente correlabile alla presenza della variante patogenetica. L'aplotipo esteso A2B58Cw7DR2DQ1 ha una forte evidenza di associazione con la variante H63D e con la delezione del gene HFE. A2 è l'aplotipo a locus singolo più predittivo. Inoltre, A30B18 di origine caucasica si è rivelato associato dalla variante di H63D, mentre A2B58 sembra maggiormente associata alla presenza della delezione HFE che risulta essere molto presente nella popolazione sarda rispetto alle varianti caucasiche. Aumentando la casistica confidiamo di poter dare un dato di correlazione che potrebbe essere utilizzato nei casi di HH non associati alle varianti canoniche e di rivelare se la delezione del gene HFE in associazione ai loci singoli risulta essere un marker di rivelazione della malattia come da questi studi preliminari sembrerebbe essere.

mutazione	%	aplotipo
H63D	40	A30/B18
del HFE	10	A02/B58
C282Y	15	NESSUNA CORRISPONDENZA
S65D	10	NESSUNA CORRISPONDENZA



Abstract Code: AIB18701-61

**Associazione tra Pemfigoide Bolloso e allele HLA-DQB1\*03:01**M. Andreani<sup>1</sup>, F. Locatelli<sup>2</sup>, G. Testa<sup>1</sup>, M. Battarra<sup>1</sup>, A. Pira<sup>3</sup>, F. Mariotti<sup>3</sup>, P. Caputi<sup>3</sup>, G. Di Zenzo<sup>3</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia, (2) Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia, (3) Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare, Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS, Roma, Italia

Il pemfigoide bolloso (PB) è una **malattia autoimmune** caratterizzata dalla presenza di bolle subepiteliali **determinate dal distacco dell'epidermide dal derma**, causata da autoanticorpi diretti contro componenti dell'emidesmosoma: BP180 e BP230. La patogenesi dipende dall'interazione di diversi fattori di rischio, tra cui età, comorbidità e da molecole HLA. Nei pazienti affetti da BP, queste sembrano in grado di presentare nel loro sito di legame peptidi derivanti dal BP180 e dal BP230, successivamente al loro riconoscimento e processazione dovuta all'azione delle cellule presentanti l'antigene. Il riconoscimento da parte dei linfociti T del peptidoma che ne deriva induce la produzione di citochine, ma soprattutto la produzione di autoanticorpi da parte dei linfociti B, generalmente IgG, contro BP180 e BP230. In questo studio abbiamo caratterizzato gli alleli HLA di classe I e II in 116 pazienti con BP, suddivisi in 2 gruppi: G1, di 86 pazienti trattati per la concomitante patologia diabetica con gliptine, inibitori della dipeptidil-peptidasi 4 (DPP-4); G2 di 30 pazienti con o senza diabete, non trattati con gliptine. I risultati sono stati confrontati con un gruppo di 1017 individui sani (G3). Per ciascun paziente arruolato è stata eseguita la tipizzazione dei loci HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1 ad alta risoluzione, con metodica di NGS su piattaforma Ion Torrent con il Kit FastPlex (Thermo Fisher, Canoga, USA). Lo studio ha mostrato una differenza statisticamente significativa (SS) anche dopo correzione di Bonferroni (pc) della frequenza (f%) dell'allele DQB1\*03:01 confrontando i controlli sani G3 (32.01%) con G1 e G2: 69.19% - pc=0.00012; 51.67% - pc=0.016, rispettivamente. I risultati hanno inoltre mostrato la presenza dell'allele DQB1\*03:01 in quasi tutti i pazienti di G1 rispetto a G3 (95.35% vs 54.47% - pc=0.00012) (in G2 80%; non SS vs G3). In G1 abbiamo osservato una maggior f% dell'allele DRB1\*11:01 (24.42%) sia verso G2 che G3; (11.67% e 10.82%). Al contrario la f% dell'allele DRB1\*11:04 è risultata simile tra G1 (29.07% - pc=0.0046) e G2 (31.67% - pc=0.01334) nei confronti di G3 (14.06%). Differenze SS per DQA1\*05:01P (comprendente 05:01/05/09) tra G1 e G3 (70.93% vs 39.48% - pc=0.00016) sono emerse, ma non per G2 (50.00% - Non SS). Infine, lo studio ha rivelato una associazione tra i pazienti affetti da BP trattati con gliptine e l'allele HLA-B\*18:01, presente in G1 con f% di 21.51% vs 10.00% di G2 e 10.28% di G3. In conclusione, questi dati mostrano una associazione tra i pazienti italiani affetti da PB e l'allele HLA-DQB1\*03:01, confermando quanto osservato in altre popolazioni studiate. Inoltre, i pazienti di PB che assumevano gliptine hanno mostrato un'associazione con gli alleli DRB1\*11:01 e HLA-B\*18:01 significativamente diversa rispetto al gruppo G2 dei PB idiopatici non trattati con gliptine, suggerendo un possibile ruolo di questi alleli nella eziopatogenesi dei PB se associato all'uso di questo farmaco.

Abstract Code: AIB18702-62

## Anticorpi anti recettore di tipo a dell'Endotelina 1 (ANTI-ETAR) e Trapianto Di Rene

A.G. Bianculli<sup>1</sup>, P. Giustiniani<sup>1</sup>, A. Guagnano<sup>1</sup>, A. Di Luzio<sup>1</sup>, F. Besi<sup>1</sup>, R. Labbadia<sup>2</sup>, L. Antonucci<sup>2</sup>, A. Cappoli<sup>2</sup>, I. Guzzo<sup>2</sup>, M. Andreani<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia, (2) Nefrologia, Dialisi e Clinica del Trapianto di Rene, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

Il maggiore fattore di rischio immunologico di *graft failure* nel trapianto di rene è correlato alla presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA). Tuttavia, negli ultimi anni, molti studi hanno evidenziato l'importanza degli anticorpi non-HLA nel trapianto di rene, in particolare degli anticorpi anti recettore 1 dell'angiotensina II (anti-AT1R) e più di recente, degli anticorpi anti recettore di tipo A dell'endotelina 1 (anti-ETAR). Nonostante, la loro presenza non rappresenti un marker specifico di graft failure entrambi questi anticorpi legano recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) presenti sulle cellule endoteliali dei pazienti trapiantati e possono essere responsabili del rigetto anticorpo mediato (AMR) (Giral et al, 2013). L'Endotelina 1 è un peptide sintetizzato da diversi tipi di cellule tra cui le cellule endoteliali della muscolatura liscia o le cellule epiteliali renali. La sua attivazione nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi, induce vasocostrizione e proliferazione cellulare oltre a promuovere processi infiammatori. L'iperattività di ETAR, dovuta dalla sua interazione con il suo ligando ET-1, può produrre ipertensione arteriosa, graft failure (nel rene e nel cuore) e diabete mellito di tipo 2. Presso il Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti dell'Ospedale Bambino Gesù di Roma, utilizzando il kit ELISA One Lambda (REF.EIA-ETARX), sono stati studiati 40 pazienti pediatrici sottoposti a trapianto di rene con lo scopo di determinare la presenza degli anticorpi anti-ETAR oltre ad anticorpi anti-HLA e anti-AT1R. I risultati hanno mostrato che 19 dei 40 sieri (48%) analizzati sono risultati negativi per la ricerca di anti-ETAR, mentre 21 erano positivi (52%). La correlazione di questi dati con quelli relativi alla ricerca degli anti-AT1R, ha mostrato che 37 pazienti (92,5%) mostravano concordanza di positività o negatività tra loro ai due tipi di autoanticorpi (ETAR-AT1R), mentre solo 3 pazienti (7,5%) mostravano negatività per anti-AT1R e positività per anti-ETAR. La correlazione tra anti-ETAR e anti-HLA DSA, ha mostrato che 5 pazienti (13%) con DSA di classe I risultavano positivi agli anti-ETAR, mentre un solo paziente (3%) con DSA di classe I era anti-ETAR negativo. Tra i pazienti che presentano DSA di classe II, 10 (25%) erano anche anti-ETAR positivi, mentre 4 (10%) sono risultati negativi alla ricerca di anti-ETAR. In conclusione, questi dati, sebbene preliminari, sembrano indicare una di correlazione minima tra anti-ETAR e anti-HLA DSA, mentre, al contrario, mostrano un elevato grado di concordanza tra gli anticorpi anti-ETAR e anti-AT1R che potrebbero rappresentare un elemento importante nel follow up dei pazienti sottoposti a trapianto di rene.

Abstract Code: AIB18703-63

## Case Report - Utilità dei kit supplementari per l'identificazione degli anticorpi anti-HLA ed analisi per epitopi

A.G. Bianculli<sup>1</sup>, P. Giustiniani<sup>1</sup>, M. Troiano<sup>1</sup>, A. Di Luzio<sup>1</sup>, M. Andreani<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

L'introduzione della metodica NGS (Next Generation Sequencing) nell'attività di routine dei laboratori di Istocompatibilità e di Immunogenetica ha permesso di definire le tipizzazioni HLA dei pazienti proposti ad un trapianto di organo solido e dei loro potenziali donatori ad alta risoluzione ed in molti casi a livello allelico, rendendo, in alcune circostanze, davvero complicata l'identificazione di anticorpi anti-HLA specifici per determinati mismatches. E' noto inoltre che i principali kit commerciali attualmente disponibili sul mercato, benché associati a reagenti supplementari, sono in grado di rilevare la presenza soltanto di circa 150 specificità anticorpali anti-HLA di classe I e circa 120 specificità di classe II per gli oltre 25000 alleli identificati di classe I e gli oltre 10000 di classe II. Una diversa opzione per definire il pattern anticorpale nei casi in cui non sia possibile determinare la presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) è costituita dall'analisi della reattività epitopica con "tools" informatici come il MatchMaker o PIRCHE. In questo Case Report descriviamo una paziente, in lista di attesa per un trapianto renale da donatore vivente, che mostrava nel siero una positività al PRA del 10% in classe I ed un PRA 0% in classe II, analizzato in prima istanza per lo screening di anticorpi anti-HLA di isotipo IgG (Tecnica FlowPRA Screening One Lambda, metodo citofluorimetrico). Lo stesso siero, successivamente testato con il kit core Luminex Single Antigen (One Lambda) mostrava una negatività per HLA di classe I e II, nonostante la segnalazione di potenziali eventi immunizzanti presenti nel paziente, come ad esempio alcune trasfusioni ricevute nei mesi precedenti. Nel tentativo di trovare una possibile spiegazione alla positività del test di screening FlowPRA, abbiamo deciso di testare sullo stesso siero il kit supplementare per il Single Antigen ExPlex I (One Lambda). Questo test ha riportato delle positività alle seguenti specificità anticorpali: A\*02:07(11052), A\*02:10(4029), A\*02:18(11166), B\*15:17(2682), C\*07:01(3351) e C\*15:05(1477). È interessante notare come la positività di queste 6 specificità anticorpali identificate con il kit ExPlex I, corrispondano alla positività di 8 epitopi HLA (43Q+62GER, 71SA, 94TV, 9F, 156L, 65QNR, 62RER, 65RNA+80I). Questo studio ribadisce quanto sia importante prestare la massima attenzione nella ricerca degli anticorpi anti-HLA in pazienti in lista per trapianto di organo, in particolare quando siano presenti mismatch che coinvolgono alleli frequenti nella popolazione come C\*07:01, utilizzando, se necessario kit supplementari come ExPlex, attualmente disponibile in commercio. Così come può essere utile eseguire un'analisi di reattività epitopica (es. HLA-Matchmaker) per tutti quei casi in cui si identificano mismatches verso cui non è possibile identificare la presenza di anti-HLA con i kit presenti in commercio.

Abstract Code: AIB18704-64

## Registro Regionale dei donatori di midollo osseo delle Marche: un nuovo progetto per migliorare l'arruolamento dei donatori sul territorio marchigiano

S. Agolini<sup>1</sup>, E. Carciere<sup>1</sup>, P. Ferrucci<sup>1</sup>, A. Zoli<sup>1</sup>

(1) Laboratorio HLA e Registro Regionale dei Donatori di Midollo Osseo delle Marche(RRAN01) – Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche - Ancona

**Introduzione:** durante la pandemia da COVID-19, a seguito della sospensione degli eventi di reclutamento outdoor dei donatori di midollo osseo (MO) e alla sopravvenuta reticenza da parte dei donatori nell'avvicinarsi all'ambiente ospedaliero, come RRAN01 abbiamo ideato e realizzato grazie alla sinergia con le associazioni del terzo settore AVIS e ADMO, un nuovo progetto di reclutamento indirizzato esclusivamente ai donatori di sangue (DS) afferenti la Medicina Trasfusionale (MT) dell'Ospedale di Ancona. Lo scopo principale è stato quello di valutare l'impatto sulle nuove iscrizioni dei donatori di MO rispetto al periodo precovid, non tenendo conto degli iscritti tramite l'attività di reclutamento istituzionale(online e outdoor)che è proseguita con le modalità classiche.

**Materiali e metodi:** veniva somministrato da febbraio a giugno 2021 ai DS durante la donazione periodica, non ancora iscritti al RR, con età tra i 18 e i 35 anni, un questionario di 4 domande a risposta multipla sulla donazione di MO con un riquadro finale dove inserire i propri dati per ricevere ulteriori informazioni e un contatto diretto con il RRAN01. Veniva confrontato il risultato con lo stesso periodo 2018.

**Risultati:** in 4 mesi sono stati somministrati 216 questionari e arruolati 67 nuovi donatori(31%), nello stesso periodo del 2018 i nuovi iscritti sono stati 10, un incremento statisticamente significativo. Dei 216 questionari,72 donatori(33%) sono voluti rimanere anonimi mentre 77(36%) hanno chiesto di essere contattati ricevendo informazioni senza finalizzare subito l'iscrizione. L'impatto del progetto ha richiesto una collaborazione per la distribuzione dei questionari da parte dei volontari AVIS adibiti all'accoglienza presso la MT, addestrati sull'argomento dal RRAN01 e una disponibilità del personale medico del RRAN01 per svolgere colloqui telefonici con una riorganizzazione per accogliere la maggiore richiesta di iscrizioni presso il CDAN01.

**Conclusioni:** il DS è un donatore di MO ideale, per approccio al dono e per la costante valutazione del suo stato di salute e in letteratura è chiaro come essere DS sia un fattore prognostico positivo per la migliore riuscita della donazione di MO. Tra tutti i donatori Avis Marche tra i 18-35 anni (circa 17000) abbiamo notato come solo l'8% sia iscritto al RR, quindi esiste un ampio serbatoio di potenziali donatori da sensibilizzare che sono facilmente "intercettabili" durante le donazioni periodiche di sangue nelle MT. Il significativo incremento di iscrizioni presso il CDAN01 ci ha dimostrato il potenziale di questo progetto pilota. Avendo le risorse di personale per estenderlo a tutte le MT, grazie alla collaborazione di AVIS-ADMO con il RRAN01 si potrebbero avere un maggiore numero d'iscritti. Tale progetto ha dimostrato essere una efficace modalità per mantenere un costante afflusso di iscrizioni al registro IBMDR in assenza di eventi outdoor come nel periodo della pandemia.



**Abstract Code: AIB18705-65**

## **Decision trees to evaluate the risk of developing Multiple Sclerosis**

M. Pasella <sup>1</sup>, F. Pisano <sup>1</sup>, B. Cannas <sup>1</sup>, A. Fanni <sup>1</sup>, E. Cocco <sup>2</sup>, J. Frau <sup>2</sup>, F. Lai <sup>3</sup>, S. Mocci <sup>4</sup>, R. Littera <sup>4</sup>, S.R. Giglio <sup>4</sup>

(1) Dipartimento di Ingegneria Elettrica ed Elettronica, Università di Cagliari, Cagliari, (2) Centro Sclerosi Multipla, ASL Cagliari, Università di Cagliari, Cagliari, (3) Unità di Oncologia e patologia molecolare, Università di Cagliari, Cagliari, (4) Genetica medica, Università di Cagliari, Cagliari

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune-mediated disorder that affects the Central Nervous System (CNS) and is the most common cause of neurological disability in young adults. Globally, MS affects over 2.8 million people with prevalence rates varying based on geographical location. Interestingly, Sardinia deviates from this pattern, with one of the highest MS rates in the world (361/100000 inhabitants), making it an ideal research context for studying the disease[1]. While the exact causes and pathogenic mechanisms remain unclear, genetic and environmental factors, along with other risk factors like family history, HBV infections, etc., contribute to its development. Genetic associations have been found in the Human Leukocyte antigen (HLA) region, while certain Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) haplotypes may offer protection against MS [2].

In this study, a novel Machine Learning (ML) algorithm was implemented to predict the likelihood of developing MS based on the HLA and KIR profiles. The algorithm incorporated individual profiles from 299 MS patients and 619 unrelated healthy controls. Decision Trees (DTs), a supervised ML classification method, were used, because they offer comprehensible rules behind the decisions made, making them useful for medical staff. However, considering that individual DTs suffer from high variance, an Ensemble Learning technique called Multiple Classifier System (MCS) was ultimately adopted. Ensemble Learning is a method that combines multiple models to produce a single model with improved results [3].

The performances achieved with the MCS appear to be very promising with a True Positive Rate greater than 73% and a True Negative Rate of 66%. The main limitation is the False Negative Rate of approximately 26% of MS patients that the algorithm cannot identify.

While the preliminary results appear promising, further investigation is warranted using larger sample sizes especially in different ethnic groups that are less homogeneous than the population of Sardinia. Such research would aid in a more comprehensive understanding of the potential clinical applications of the MCS.

In conclusion, the use of the MCS has demonstrated to be an accurate and reliable diagnostic tool capable of supplying promising results in discriminating subjects at a higher risk of developing the disease based on their immunogenetic characteristics.

[1] J. A. Hollenbach and J. R. Oksenberg, "The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review," *J. Autoimmun.*, vol. 64, pp. 13–25, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.jaut.2015.06.010.

[2] M. Melis *et al.*, "Entropy of human leukocyte antigen and killer-cell immunoglobulin-like receptor systems in immune-mediated disorders: A pilot study on multiple sclerosis," *PLoS One*, vol. 14, no. 12, p. e0226615, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0226615.

[3] T. M. Mitchell, *Machine Learning*. in McGraw-Hill series in computer science. New York: McGraw-Hill, 1997.

Abstract Code: AIB18710-61

## Possibile ruolo dell'interazione KIR3DL2/HLA-A\*11:01 nella gravità dell'infezione di SARS-CoV-2

M.G. Tupone<sup>1</sup>, V. Cofini<sup>2</sup>, C. Cervelli<sup>3</sup>, R. Azzarone<sup>3</sup>, O. Valdez<sup>3</sup>, C. Battistoni<sup>3</sup>, S. Necozone<sup>2</sup>, M. Scimitarra<sup>3</sup>, A. Petrucci<sup>4</sup>, S. Melena<sup>5</sup>, M. Falco<sup>6</sup>, F. Papola<sup>3</sup>

(1) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale, ASL1 Abruzzo, L'Aquila, (2) Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della vita e dell'ambiente, Università degli Studi - L'Aquila, (3) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale, ASL1 Abruzzo - L'Aquila, (4) Centro Elaborazione Dati ASL2 Lanciano, Vasto, Chieti, (5) Dipartimento Sanità- Servizio Assistenza Farmaceutica. Regione Abruzzo, (6) Laboratorio di Immunologia clinica e Sperimentale- IRCCS G.Gaslini. Genova

La diversità nel decorso clinico dell'infezione SARS-CoV-2 è stata correlata alle differenze nei meccanismi di risposta immunitaria innata e adattativa. I linfociti natural killer (NK) sono protagonisti fondamentali della difesa contro le infezioni virali. La loro attività è fortemente regolata dai recettori KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) espressi sulla superficie delle cellule NK. Tra i recettori KIR inibitori KIR2DL1 riconosce gli allotipi HLA-C caratterizzati da Lisina 80, KIR2DL2/L3 legano allotipi HLA-C Asparagina 80, KIR3DL1 riconosce molecole HLA-B e -A con epitopo Bw4 e KIR3DL2 riconosce gli allotipi HLA-A\*03 e -A\*11. L'obiettivo dello studio è stato indagare l'impatto dei KIR e dei loro ligandi (molecole HLA di classe I) sull'infezione da SARS-CoV-2. Nello specifico è stata correlata la tipizzazione HLA ad alta risoluzione di classe I di 419/8608 (4,9%) donatori volontari di CSE del RRAQ01, non vaccinati e risultati positivi al tampone molecolare per il SARS-CoV-2 nel periodo dal 11/03/2020 al 04/01/2022. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla gravità della malattia: il gruppo A era costituito da pazienti asintomatici o paucisintomatici (N. = 139) e gruppo B con malattia sintomatica severa (N. = 280). Dei 419 donatori presi in esame, 55 (13.1%) erano positivi per HLA-A\*11:01. In particolare 8/139 (5.7%) pazienti del gruppo A era HLA-A\*11:01<sup>pos</sup>, mentre 47/280 (16.8%) pazienti del gruppo B era HLA-A\*11:01<sup>pos</sup>. Questi dati indicano che i pazienti KIR3DL2+HLA\*11:01 positivi [ $\chi^2$  (yates)= 8.9669,  $p = 0,0027$ ] mostravano esiti più severi della malattia. *KIR3DL2*, un gene cornice presente nella quasi totalità dei genotipi, codifica per un recettore inibitorio che, in presenza di ligando (HLA-A\*11:01) potrebbe inibire il riconoscimento della cellula infettata determinando una mancata protezione contro l'infezione SARS-CoV-2 rendendo così i soggetti maggiormente predisposti ad avere esiti più severi della malattia. Considerando che l'interazione KIR3DL2/ligando sembra essere fortemente peptide dipendente, un'analisi dell'immunopeptidoma potrebbe chiarire l'interazione tra KIR3DL2 e gli antigeni HLA presentanti i peptidi virali. Inoltre dal momento che 116 differenti allotipi KIR3DL2 sono al momento presenti in banca dati (IPD-KIR website) anche il polimorfismo allelico KIR3DL2 potrebbe fornire indicazioni interessanti. Ulteriori studi su altre popolazioni e studi funzionali in vitro sono comunque necessari per confermare il reale coinvolgimento del KIR3DL2 nella risposta immunologica HLA-A\*11:01 mediata nell'infezione da SARS-Cov-2.

Abstract Code: AIB18711-62

## **Diluizioni del siero come biomarcatore predittivo per la desensibilizzazione attraverso TPE: un valido approccio esplorativo al trapianto di rene per pazienti sensibilizzati.**

M.G. Tupone<sup>1</sup>, C. Cervelli<sup>1</sup>, O. Valdez<sup>1</sup>, R. Azzarone<sup>1</sup>, M. Scimitarra<sup>1</sup>, A. Panarese<sup>2</sup>, A. Ruggetti<sup>3</sup>, C. Battistoni<sup>1</sup>, D. Fracassi<sup>1</sup>, D. Pulcinelli<sup>1</sup>, S. Scacchi<sup>1</sup>, S. Scipione<sup>1</sup>, B. Spaziani<sup>1</sup>, F. Pisani<sup>2</sup>, F. Papola<sup>1</sup>

(1) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - ASL1 Abruzzo-L'Aquila, (2) Centro Trapianti di organo - Dipartimento scienze chirurgiche e dei trapianti di organi - Università degli Studi di L'Aquila, (3) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - ASL1 Abruzzo-L'Aquila

Gli Ab IgG anti-HLA sono una delle principali barriere immunologiche al trapianto di organi solidi per un aumentato rischio di rigetto. Inoltre, la presenza nel post-trapianto di Ab-DSA anti HLA *de-novo* con perdita di attività funzionale e con l'evidenza di C4d nella biopsia depone per una reale possibilità della perdita del rene. La valutazione degli Ab-DSA anti HLA viene effettuata basandosi sul valore della MFI, ma vari studi mostrano che questo valore è inficiato dalla presenza di fattori inibenti la reattività degli anticorpi. In presenza di MFI > 10.000 la diluizione del siero di 1/16 è più corrispondente alla reale forza anticorpale. Per verificare tale ipotesi sono state effettuate analisi con Luminex SA dei sieri pre e post aferesi indiluiti e diluiti 1/16 in 2 pazienti che mostravano segni clinici e laboratoristici di rigetto AMR con presenza di DSA *de-novo* post trapianto e sottoposti a TPE (Plasma exchange 1v) a giorni alterni per 5 trattamenti. Un paziente ha mostrato, nel 1° mese dal trapianto, la presenza di Ab anti HLA DSA B18, DQ6. Dopo la 1° aferesi, vi era una riduzione del 50,7% (3381/1688 MFI) del titolo Ab per il B18 e del 58,7% (5317/2194 MFI) per il DQ6 nel siero 1/16 e per contro, una riduzione del 4,7% (13867/13203 MFI) per il B18 e del 32,1% (14096/9561 MFI) per il DQ6 dell'indiluito. Dopo il 4° TPE si è riscontrata una riduzione del titolo Ab del 59,6% (7189/2901 MFI) per il B18, del 38,3% (2974/1836 MFI) per il DQ6 nel siero indiluito e negatività nel siero 1/16 per entrambi, in completa assenza di segni di disfunzione renale. A 2 mesi dal TPE il paziente non mostrava la presenza di Ab-DSA, confermando ulteriormente l'efficacia del protocollo di desensibilizzazione al quale era stato sottoposto. Il 2° paziente ha mostrato, dopo 1 mese dal trapianto, la presenza di Ab anti-HLA DSA A3, A23, DP6, DP11 con segni clinici e di laboratorio di rigetto Ab-mediato. L'analisi ha mostrato, dopo la 1° aferesi, un aumento del 30,5% (9120/13120 MFI) del titolo anticorpale per A3 e del 33,9% (6279/9501 MFI) per l'A23, un aumento del 29,5% (3385/4803 MFI) per DP6 e del 20,8% (1078/1361 MFI) per DP11, deponendo per una non efficacia del TPE; nel siero 1/16 per contro si è constatata una riduzione del 68,1% (4813/1537 MFI) per A3 e del 62,3% (6065/2287 MFI) per A23, del 52,7% (1027/486 MFI) per DP6 mentre il DP11 era negativo. A 24 mesi dal TPE il paziente, pur mostrando la presenza di Ab-DSA (A3=3768, A23=2751, DP6=2782 MFI), ha una buona funzionalità renale senza segni di rigetto Ab-mediato, confermando l'efficacia del TPE. Pertanto, la diluizione 1/16 del siero in pazienti iperimmuni con presenza di Ab DSA da sottoporre a TPE, è un utile mezzo per valutare l'efficacia del trattamento aferetico in quanto una riduzione nel corso della 1° aferesi è indice predittivo della risposta positiva al TPE. Lo studio del siero indiluito attraverso la MFI non è assolutamente in grado di valutare la reale efficacia di allontanamento degli Ab-DSA.

Abstract Code: AIB18716-67

## Role of HLA matching and donor-specific antibody development in long-term survival, acute rejection, and allograft cardiac vasculopathy

D. Costa<sup>1</sup>, A. Picascia<sup>1</sup>, V. Grimaldi<sup>1</sup>, C. Amarelli<sup>2</sup>, A. Petraio<sup>2</sup>, A. Levi<sup>1</sup>, M. Di Donato<sup>1</sup>, A.V.A. Pirozzi<sup>1</sup>, C. Fiorito<sup>1</sup>, G. Moccia<sup>1</sup>, A. Gallo<sup>1</sup>, C. Marra<sup>2</sup>, M. De Feo<sup>2</sup>, F. Cacciatore<sup>3</sup>, C. Maiello<sup>2</sup>, C. Napoli<sup>1</sup>

(1) Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli - Napoli, (2) Dipartimento di Cardiocirurgia e Trapianti, Ospedali dei Colli - Napoli, (3) Dipartimento di Scienze Mediche Trasazionali, Università di Napoli Federico II - Napoli

**INTRODUCTION:** Although there are different data supporting a benefit of HLA matching in kidney transplantation, evidence in heart transplantation is poor. The presence of HLA mismatch (MM) between donor and recipient may lead to the development of donor-specific antibodies (DSA) which can negatively affect the outcome of heart transplantation. Indeed, they are involved in the development of antibody-mediated rejection (AMR) and associated with an increase in allograft cardiac vasculopathy (CAV). We analyzed retrospectively the influence of HLA matching and anti-HLA antibodies on overall survival, AMR and CAV in heart transplantation.

**PATIENTS AND METHODS:** This retrospective study includes heart transplanted patients at the Cardiac Transplantation Centre of Naples between 2000 and 2019.

**RESULTS:** Among the 155 heart transplant patients, the mean number of MM between donor and recipient was  $4.5 \pm 1.1$ . A negative correlation was found between MM HLA-DR and survival ( $p=0.01$ ). Comparison of patients with 0-1 MM at each locus to all others with 2 MM, for both HLA class I and class II, did not reveal any correlation with CAV development. Development of AMR was significantly correlated with HLA-DQ MM (0vs1 and 0vs2;  $p=0.05$ ). Our analysis detected DSA in 37.1% of patients. The production of DSA had no influence on survival ( $p=0.72$ ) and/or AMR ( $p=0.39$ ). A correlation was found between the production of DSA class II and the probability of developing CAV ( $p=0.03$ ). In CAV positive patients MFI values were significantly higher compared to CAV negative patients ( $p=0.02$ ).

**CONCLUSIONS:** Prospective studies are needed to evaluate HLA class II matching as an additional criterion in heart allocation, especially considering the increase in waiting list time. Heart transplant recipients with better HLA matching may require fewer immunosuppressive therapies and reduced post-transplant monitoring procedures with clear clinical and economic consequences.

Abstract Code: AIB18717-68

## **Correlazione tra presenza di anticorpi anti-DSA e rigetto in pazienti affetti da Emoglobinopatie e trattati con Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche da donatore Aploidentico**

P. Giustiniani<sup>1</sup>, F. Galaverna<sup>2</sup>, P. Merli<sup>2</sup>, A.G. Bianculli<sup>1</sup>, M. Becilli<sup>2</sup>, R. Carta<sup>2</sup>, E. Boccieri<sup>2</sup>, R.M. Pinto<sup>2</sup>, M. Troiano<sup>1</sup>, T. Galluccio<sup>1</sup>, F. Locatelli<sup>3</sup>, M. Andreani<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy, (2) Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy, (3) Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy

Il rigetto primitivo o secondario rappresenta una delle cause di insuccesso di un trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) allogeniche; in letteratura è descritta aumentata incidenza di rigetto in caso di aumentata disparità HLA tra donatore e ricevente, in caso di pazienti affetti da emopatie non maligne ed in presenza di anticorpi anti-HLA diretti contro antigeni donatore-specifici (DSA), in particolare per livelli di MFI nel siero del paziente pre-HSCT superiori a 5000. In questo studio abbiamo analizzato l'attecchimento di 20 pazienti consecutivi pediatrici affetti da emoglobinopatie sottoposti a HSCT da donatore HLA-aploidentico dopo procedura di T-alfabeta/CD19 deplezione (haplo-HSCT) tra giugno 2017 e marzo 2021, valutando la possibile correlazione tra la presenza di DSA e rigetto, utilizzando una metodica Luminex Single Antigen (One Lambda, Thermo Fisher, Canoga, USA). Con una età mediana al trapianto di 8 anni (range 2-17), 14 pazienti (70%) hanno ottenuto attecchimento di neutrofili e piastrine con una mediana di 14 e 11 giorni da HSCT, rispettivamente. Sei pazienti (30%) sono andati incontro a rigetto; 5 di questi hanno avuto attecchimento completo dopo il haplo-HSCT (3 dallo stesso donatore, 2 da diverso donatore), mentre in un caso si è resa necessaria reinfusione di cellule staminali autologhe per ulteriore rigetto del II Haplo-HSCT. Abbiamo identificato la presenza di anticorpi anti-HLA di isotipo IgG in 17 su 20 pazienti studiati (85%); 4 casi hanno mostrato livelli di MFI superiori a 5000, sia in Classe I che in Classe II. Valori di MFI superiore a 5000 erano presenti in 3 di 6 pazienti andati incontro a rigetto (50%) e in 1 paziente di 14 con attecchimento completo (7,1%),  $p=0.06$ . Questo studio contribuisce a definire l'importanza che riveste la ricerca di DSA in pazienti affetti da emoglobinopatie sottoposti ad haplo-HSCT. Sarà interessante in futuro verificare, in un gruppo più ampio di pazienti, i dati ottenuti in questo studio, oltre a determinare se differenze a livello di eplets tra donatore e ricevente in questo setting di trapianti possa meglio contribuire a caratterizzare le cause di rigetto primitivo o secondario.



Abstract Code: AIB18718-69

## **Potenzialità dell'immunosequencing applicato all'analisi del repertorio immunitario di un paziente affetto da leucemia linfoblastica acuta di tipo T sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche**

A. Scarpa<sup>1</sup>, E. Borotti<sup>1</sup>, D. Ferrarese<sup>1</sup>, S. Guidotti<sup>1</sup>, V. Scaglia<sup>1</sup>, A. Schiro<sup>1</sup>, A. Rossi<sup>1</sup>, D. Vallisa<sup>2</sup>

(1) UOC Biologia dei trapianti, Ospedale "G. da Saliceto", AUSL, Piacenza, (2) UOC Ematologia e CTMO, Ospedale "G. da Saliceto", AUSL, Piacenza

L'analisi dei riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline e del T-cell receptor (TCR) mediante Next Generation Sequencing (NGS) si sta affermando come strumento altamente sensibile per il monitoraggio della malattia minima residua nelle neoplasie linfoproliferative. La sua applicazione ha trovato un interessante riscontro nel monitoraggio della malattia minima residua (MRD) di un paziente affetto da leucemia linfoblastica di tipo T. Il paziente è stato sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) in regime di condizionamento TBI (12 Gray) + ciclofosfamide (120 mg/kg), da donatore non correlato 10/10 con HLA-DPB1 mismatch permissivo. La tipizzazione HLA del paziente e del donatore è stata eseguita in NGS valutando, inoltre, la compatibilità dei loci HLA-DRB3/4/5, DPA1 e DQA1. La valutazione MRD ha confermato la remissione completa pre-HSCT e la negatività persistente post-HSCT del marcatore TCRbeta identificato all'esordio. L'analisi ha evidenziato la presenza crescente e quantificabile di due nuovi cloni TCRbeta a partire dalla valutazione +30 giorni dal trapianto. L'origine tumorale di questi due cloni e di conseguenza l'insorgenza di una leucemia secondaria, anche se possibile, è stata da subito esclusa della clinica. Sulla base delle competenze attuali e degli strumenti bioinformatici a disposizione sono state quindi formulate diverse ipotesi relative alla possibile origine reattiva dei due nuovi cloni. L'utilizzo del database IMGT ha permesso di identificare le regioni determinanti la complementarietà (CDR): la regione CDR3, responsabile del riconoscimento e dell'interazione con vari peptidi antigenici presentati dalle molecole MHC e le regioni CDR1 e CDR2, cruciali per l'interazione tra TCR e complesso MHC. Lo studio della regione CDR3 può evidenziare l'affinità del recettore TCR verso agenti infettivi oppure l'origine reattiva del clone T determinata da ipersensibilità ad alcuni farmaci, mediata dalla presenza di alleli HLA di suscettibilità condivisi tra donatore e ricevente. Questa prima ipotesi è stata valutata sulla base del trattamento farmacologico somministrato al paziente in tutto il periodo di ricovero pre e post-HSCT. Parallelamente è stata ipotizzata una correlazione tra la presenza e l'andamento dei nuovi cloni identificati con fenomeni immunitari post-HSCT quali la ricostituzione del repertorio T e l'insorgenza di GVHD e GVL, i cui attori principali sono linfociti T alloreattivi del donatore. Per sostenere questa ipotesi il dato MRD è stato affiancato dall'analisi del chimerismo post-HSCT su linea separata CD3+. L'analisi di questo caso ha permesso un utilizzo trasversale della tecnologia NGS applicata all'immunogenetica, configurandosi come un potente e promettente strumento che potrà in futuro chiarire numerosi aspetti relativi all'immunologia del trapianto di CSE.

Abstract Code: AIB18721-63

## Identificazione di un nuovo gene KIR ibrido generato da crossing-over ineguale tra KIR2DP1 e KIR2DL1

A. Scarpa<sup>1</sup>, M. Troiano<sup>2</sup>, R. Meazza<sup>3</sup>, G. Rombolà<sup>4</sup>, M. Andreani<sup>2</sup>, M.P. Azzaro<sup>5</sup>, A. Pecoraro<sup>6</sup>, M. Curcio<sup>7</sup>, F. Ingrassia<sup>6</sup>, S. Lai<sup>8</sup>, G. Mongelli<sup>9</sup>, A. Pasi<sup>10</sup>, A. Rossi<sup>1</sup>, R.E. Saladino<sup>11</sup>, R. Littera<sup>8</sup>, M.C. De Stefano<sup>12</sup>, R. Crocchiolo<sup>13</sup>, M.P. Perrone<sup>14</sup>, F. Papola<sup>15</sup>, M. Falco<sup>16</sup>

(1) Ospedale Guglielmo da Saliceto, Piacenza, (2) IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, (3) IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, (4) AOU Careggi, Firenze, (5) AOU Policlinico San Marco, Catania, (6) P.O. Cervello - A.O.R. Villa Sofia-Cervello, Palermo, (7) Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, (8) SC. Genetica Medica, ASL, Cagliari, (9) AOUC Policlinico, Bari, (10) Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (11) G.O.M. Bianchi Melacrinò Morelli, Reggio Calabria, (12) Centro Nazionale Trapianti, Istituto Superiore di Sanità, Roma, (13) ASST Grande Ospedale Metropolitano, Niguarda, Milano, (14) AOU Policlinico Umberto I, Roma, (15) Ospedale S. Salvatore ASL1 Abruzzo, L'Aquila, (16) IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

I geni *KIR* sono caratterizzati da un elevato grado di polimorfismo determinato sia da variabilità aplo-tipica che allelica. Circa il 95% degli aplotipi *KIR* presenti nella popolazione caucasica è composto da una delle tre regioni centromeriche più frequenti (CenA, CenB1 e CenB2) e da una delle due regioni telomeriche più comuni (TelA, TelB). La quota rimanente è caratterizzata da aplotipi espansi o contratti; questi aplotipi si formano mediante crossing-over ineguale nelle regioni intrageniche o all'interno dei geni *KIR*; quest'ultimo meccanismo genera geni *KIR* ibridi ossia composti da esoni appartenenti a geni *KIR* differenti.

In questo studio, analizzando i controlli di qualità AIBT per la tipizzazione *KIR*, abbiamo identificato un donatore per il quale non è stato raggiunto il consensus al locus *KIR2DL1*. Questa discrepanza è strettamente correlata alla metodica utilizzata; il kit commerciale basato su un approccio SSO-PCR permetteva l'identificazione del locus *KIR2DL1*, mentre i kit che utilizzano metodiche di SSP-PCR e RT-PCR tipizzavano il campione come *KIR2DL1* negativo. Il gDNA è stato quindi analizzato con un kit commerciale basato su NGS con primer locus-specifici per l'amplificazione di alcuni geni *KIR*. Da una prima analisi il risultato NGS concordava con il consensus ottenuto confermando la presenza dei geni *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*. Non è stato ottenuto prodotto di PCR per il locus *KIR2DL1*. Un'analisi più approfondita ha evidenziato la presenza di un paramplificato individuabile al di sopra del segnale di noise del gene *KIR2DL2*. Nonostante il coverage estremamente ridotto (profondità media di lettura 35), l'allineamento di tale sequenza ha portato ad ipotizzare la presenza di un gene ibrido caratterizzato da una sequenza omologa a *KIR2DP1* negli esoni 1-6 e a *KIR2DL1* per gli esoni 7-9. Questo risultato potrebbe spiegare i dati discordanti ottenuti con le due tecniche in quanto i primers utilizzati in SSP-PCR sono specifici per l'esone 4 di *KIR2DL1*, mentre le sonde presenti sulle biglie della metodica SSO-PCR ibridizzano una PCR che include gli esoni 7-9 di *KIR2DL1*. L'analisi fenotipica delle cellule NK di questo donatore ha confermato l'assenza del recettore KIR2DL1 sulla superficie cellulare sia della popolazione policlonale "resting" che di quella attivata mediante coltura in presenza di IL-2. La sequenza della PCR ottenuta utilizzando come template il cDNA derivato da NK attivate ha confermato i dati NGS relativi alla regione codificante. È stato infine analizzato mediante sequenziamento di nested-PCR parte dell'introne 6 identificando il punto nel quale dovrebbe essere avvenuto il crossing-over ineguale tra il *KIR2DP1* e *KIR2DL1*.

Questo studio sottolinea a) l'enorme variabilità di questa famiglia genica, b) come i dati ottenuti utilizzando kit commerciali possano non rivelare la presenza di geni ibridi "nuovi", c) l'importanza di un approccio NGS capture-based per l'analisi accurata del repertorio *KIR*.

**Abstract Code: AIB18723-65**

## **Identificazione di una duplicazione funzionale di HLA-B, HLA-C e MICA in una famiglia cariotipicamente normale**

F. Gualandris<sup>1</sup>, L. Castellani<sup>1</sup>, A. Pansa<sup>2</sup>, D.L. Roelen<sup>3</sup>, J.J.M. Drabbels<sup>3</sup>, S. Van Wageningen<sup>4</sup>, E. Rozemuller<sup>4</sup>, D.C. Hart<sup>4</sup>, F. Ingrassia<sup>5</sup>, E. Longhi<sup>6</sup>, L. Barcella<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica (SIMT), ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo, (2) Laboratorio di Citogenetica e Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII Bergamo, (3) Department of Immunohematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, (4) GenDx, Utrecht, The Netherlands, (5) Laboratorio di Immunogenetica Ospedale Cervello Palermo, (6) Transfusion and Immunohaematology Centre Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

### **Introduzione**

Gli antigeni leucocitari umani (HLA) sono codificati da una famiglia di geni altamente polimorfici localizzati sul braccio corto del cromosoma 6. Nel presente lavoro descriviamo una duplicazione del locus HLA-B, HLA-C e MICA identificata incidentalmente in un donatore di cellule staminali emopoietiche iscritto al Registro Italiano dei Donatori di Midollo Osseo (45 anni) e in due membri della sua famiglia (padre 79 anni; il fratello 52 anni).

### **Materiali e metodi**

La prima tipizzazione è stata eseguita mediante SBT, la successiva con NGS con ampliconi per l'intero gene. Lo studio familiare è stato condotto mediante analisi SSO. L'assetto cromosomico è stato indagato mediante CGH e STR. Il sistema preposto alla riparazione degli errori di replicazione del DNA è stato indagato mediante studio dell'instabilità dei microsatelliti. L'espressione proteica è stata rilevata con test sierologico.

### **Risultati**

La tipizzazione eseguita con SBT del locus HLA-B del caso indice, del padre e del fratello ha mostrato un piccolo trinucleotidico sull'elettroferogramma. La successiva tipizzazione, eseguita con NGS, ha mostrato la duplicazione dei locus HLA-B, HLA-C e MICA nei tre familiari. Il chimerismo è stato escluso utilizzando sia campioni di sangue che salivari. Lo studio familiare ha identificato la segregazione aplo-tipica degli alleli identificati. Confrontando le sequenze nucleotidiche è stato possibile distinguere gli alleli cosegreganti e quello trasmesso per via materna. È stata identificata un'ulteriore posizione trinucleotidica nel locus HLA-B del campione paterno. Non sono state identificate mutazioni su altri cromosomi. L'analisi nei microsatelliti ha escluso alterazioni del sistema di riparazione del DNA. La tipizzazione sierologica ha identificato l'espressione delle tre proteine superficiali. L'impatto di tale espressione sul sistema immunitario è stato simulato con il software NetMHCpan-4.1.

### **Conclusione**

A nostra conoscenza è la prima descrizione di una duplicazione genica del sistema HLA in assenza di alterazioni nel numero dei cromosomi. L'area interessata dalla duplicazione è lunga circa 150 kilobasi e probabilmente è il risultato di una duplicazione in tandem o di un crossing over diseguale. Non è stato possibile identificare la posizione esatta della copia genica aggiuntiva, tuttavia è molto probabile che si trovi adiacente all'altra copia allelica. Gli esami del cariotipo e dei frammenti STR hanno escluso alterazioni su altri cromosomi. Dallo studio familiare si deduce che la duplicazione sia stata trasmessa dal padre alla prole. La presenza di tre diverse proteine HLA-B altera il sistema di presentazione ai linfociti T citotossici e induce una risposta immunitaria potenziata dei linfociti CD8+. L'anamnesi patologica personale e familiare dei soggetti indagati è risultata muta, pertanto è possibile ipotizzare che la duplicazione genica da noi identificata non determini conseguenze clinicamente significative.

Abstract Code: AIB18724-66

## Attività degli autoanticorpi anti-AT1R e anti-ETAR su cellule del sistema immunitario dopo trapianto renale pediatrico

M. Vadori<sup>1</sup>, E. Cuciz<sup>1</sup>, S. Negrisola<sup>2</sup>, E. Vianello<sup>3</sup>, J. Igeno San Miguel<sup>3</sup>, B. Antonello<sup>2</sup>, A. Carraro<sup>2</sup>, E. Poggi<sup>4</sup>, A. Manfreda<sup>4</sup>, R. Labbadia<sup>5</sup>, V. Sioli<sup>6</sup>, E. Longhi<sup>6</sup>, T. De Feo<sup>6</sup>, M. Spada<sup>7</sup>, M. Andreani<sup>8</sup>, E. Benetti<sup>3</sup>, E. Cozzi<sup>1</sup>

(1) UOSD Immunologia dei Trapianti, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova, (2) Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale Università di Padova, (3) UOC Nefrologia Pediatrica, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale Università di Padova, (4) CNR-IFT Roma San Camillo-Centro Regionale Trapianti Lazio-Laboratorio di Tipizzazione Tissutale e Immunologia dei Trapianti, Ospedale San Camillo, Roma, (5) UOC Follow up trapianto Renale. Ospedale pediatrico Bambino Gesù. Roma, (6) UOC Trapianti Lombardia/NITp, Fondazione IRCCS CA' Granda Ospedale Policlinico di Milano, (7) Chirurgia Epatobiliopancreatica e del Trapianto di Fegato e di Rene, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, (8) UOS Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

**Introduzione.** Studi recenti suggeriscono che autoanticorpi contro il recettore di tipo I dell'angiotensina II (AT1R) e contro il recettore di tipo A dell'endotelina (ETAR) potrebbero influenzare la sopravvivenza d'organo a medio e lungo termine. In questo studio, sono stati valutati possibili effetti mediati dagli autoanticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sulla migrazione delle cellule del sistema immunitario.

**Metodologia.** Pazienti pediatrici sono stati arruolati nei centri di trapianto pediatrico dell'Ospedale Bambino Gesù, Roma e dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sono stati misurati pre- e post trapianto. Sono stati inoltre valutati gli anticorpi anti-HLA. L'espressione dei recettori AT1R e ETAR è stata valutata sulle cellule T e NK mediante immunofluorescenza. È stata valutata la chemiotassi delle cellule immunitarie mediata da IgG purificate dal siero dei pazienti pediatrici trapiantati.

**Risultati.** Oltre il 50% dei pazienti arruolati ha anticorpi anti-ETAR e anti-AT1R preformati. L'analisi immunofluorescente evidenzia che AT1R e ETAR sono espressi su cellule T umane e su cellule NK-92. Le IgG ottenute da pazienti con anticorpi anti-AT1R e ETAR inducono un aumento statisticamente significativo della migrazione di cellule T e NK. Tale effetto è indipendente dalla presenza di anticorpi anti-HLA. L'analisi statistica ha rivelato un'associazione tra attività chemiotattica e titoli anticorpali.

**Conclusioni.** Questi dati suggeriscono un ruolo degli autoanticorpi anti-AT1R e ETAR sul reclutamento delle cellule NK e T. Gli studi in corso determineranno il possibile ruolo di tali anticorpi sulla sopravvivenza a lungo termine dei trapianti renali pediatrici.

Abstract Code: AIB18725-67

## Associazione fra la divergenza evolutiva del sistema HLA e l'esito clinico del trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico: uno studio del registro europeo EBMT

P. Crivello<sup>1</sup>, J.E. Mooyaart<sup>2</sup>, N. Kröger<sup>3</sup>, R. Peffault De Latour<sup>4</sup>, H. Sengeloev<sup>5</sup>, I. Yakoub-Agha<sup>6</sup>, J. Finke<sup>7</sup>, W. Bethge<sup>8</sup>, P. Merli<sup>9</sup>, M. Andreani<sup>9</sup>, S. Pagliuca<sup>10</sup>, C. Gurnari<sup>11</sup>, J.D. Hoogenboom<sup>12</sup>, L.C. De Wreede<sup>2</sup>, B. Meyer<sup>13</sup>, T.L. Lenz<sup>13</sup>, C. Chabannon<sup>14</sup>, F. Malard<sup>15</sup>, A. Ruggeri<sup>16</sup>, K. Fleischhauer<sup>1</sup>

(1) University Hospital Essen, Germany, (2) EBMT Statistical Unit, Leiden, The Netherlands, (3) University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany, (4) Saint-Louis Hospital, BMT Unit, Paris, France, (5) Bone Marrow Transplant Unit L 4043, Copenhagen, Denmark, (6) CHU de Lille, Lille, France, (7) University of Freiburg, Freiburg, Germany, (8) University of Tübingen, Tübingen, Germany, (9) IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy, (10) CHRU Nancy and CNRS UMR 7365 IMoPa, Nancy, France, (11) University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy, (12) EBMT Leiden Study Unit, Leiden, The Netherlands, (13) University of Hamburg, Germany, (14) Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France, (15) Hopital Saint Antoine, Paris, France, (16) IRCCS San Raffaele, Milan, Italy

La divergenza evolutiva del sistema HLA (HLA Evolutionary Divergence, HED) è un parametro immunogenetico basato sulla variabilità chimico-fisica degli amminoacidi presenti a livello della tasca antigenica delle molecole HLA, e indirettamente associato alla diversità degli immunopeptidomi presentati da queste ultime. Studi precedenti (*Daull, Front Immunol* 2022; *Merli, Br J Haematol* 2022, *Pagliuca, Nat Commun* 2023) hanno suggerito un'associazione fra la mediana degli score HED e outcomes dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE). In questo studio, condotto sotto l'egida del Cellular Therapy Immunobiology Working Party dell'EBMT, abbiamo analizzato l'impatto dell'HED sui risultati clinici del TSCE in una coorte pan-Europea di 17,525 pazienti adulti con diagnosi di emopatia maligna.

I pazienti hanno ricevuto TCSE negli anni 2010-2019 per il trattamento di leucemia acuta, oppure sindrome mielodisplastica o mieloproliferativa, con cellule da donatore compatibile per i loci HLA-A, -B, -C, DRB1, -DQB1 (10/10), consanguineo (N=3,682) o non-consanguineo (N=13,843). Sono state analizzate la sopravvivenza globale (overall survival, OS); la sopravvivenza libera da malattia (relapse-free survival, RFS), la mortalità non dovuta a ricaduta della malattia (non-relapse mortality, NRM), la ricaduta di malattia, e la malattia del trapianto contro l'ospite (graft-versus-host disease, GvHD) acuta e cronica. Gli score HED sono stati considerati utilizzando dei modelli di rischio proporzionale causale-specifici, includendo in analisi multivariata anche le variabili cliniche più comuni.

La distribuzione degli score HED è risultata simile nei trapianti da donatore consanguineo o non-consanguineo (0-15 per HLA-A,-B,-C; 0-20 per HLA-DRB1,-DQB1). Nell'ambito del trapianto da donatore consanguineo, non sono state riscontrate associazioni significative per nessuno degli eventi clinici studiati. Al contrario, per i trapianti da donatore non-consanguineo, le probabilità di sopravvivenza aumentavano significativamente con l'incremento degli score HED al locus B, sia per la OS (hazard ratio [HR] 0.99 per unità di differenza,  $p=0.004$ ) che per la RFS (HR 0.99,  $p<0.001$ ). Questo era rispecchiato da un rischio inferiore di NRM (HR 0.98,  $P=0.004$ ) e GvHD acuta di grado 2-4 (HR=0.99,  $P=0.014$ ). L'aumento degli score HED-B era accompagnato da un numero maggiore di peptidi potenzialmente presentati dal citomegalovirus e dall'aspergillo, patogeni frequentemente coinvolti in complicanze cliniche dopo trapianto, come rilevato dall'applicazione di algoritmi bioinformatici per la predizione dei legami peptidici. I nostri dati, che concordano con quelli precedentemente da noi pubblicati su una coorte pediatrica (*Merli, Br J Haematol* 2022), dimostrano una debole ma coerente associazione protettiva fra gli score HED-B e la sopravvivenza dopo TSCE da donatore non-consanguineo, e suggeriscono un possibile ruolo dell'HED nella stratificazione dei rischi in questo ambito.



Abstract Code: AIB18726-68

## HLA class I expression on human platelets is highly variable and correlates with distinct allele frequencies

R. Cantisani<sup>1</sup>, V. Del Re<sup>1</sup>, F. Toraldo<sup>1</sup>, S. Cantara<sup>2</sup>, S. Pozzessere<sup>1</sup>, G. Marotta<sup>1</sup>, A. Spreafico<sup>1</sup>

(1) Department of Innovation, Experimentation and Clinical and Translational Research, University Hospital of Siena, Siena, Italy, (2) Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences, University of Siena, Siena, Italy

### HLA class I expression on human platelets is highly variable and correlates with distinct allele frequencies.

Rocco Cantisani<sup>1</sup>, Valeria Del Re<sup>1</sup>, Francesca Toraldo<sup>1</sup>, Silvia Cantara<sup>2</sup>, Simone Pozzessere<sup>1</sup>, Giuseppe Marotta<sup>1</sup>, Adriano Spreafico<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Innovation, Experimentation and Clinical and Translational Research, University Hospital of Siena, Siena, Italy

<sup>2</sup>Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences, University of Siena, Siena, Italy

**Background** - HLA class I molecules are expressed on human platelets and can represent a source of alloimmunization in recipient patients during platelet transfusions. Furthermore HLA mismatch between donor and recipient may be associated by the induction of anti-HLA antibodies which can culminate in platelet transfusion refractoriness. In the present study we analyzed HLA allele frequencies and HLA expression level on human platelets among blood donors.

**Materials and methods** - Platelet rich plasma was collected from 139 donors and analyzed by flow cytometry to monitor platelet HLA I expression. DNA from donors with high and low platelet HLA expression was analyzed for genotypic study. Frequencies of -large and normal-size platelet subpopulations were analyzed by flow cytometry and HLA-I expression was studied. MPV (Mean Platelet Volume) and P-LCR (Platelet-Large Cell Ratio) platelet parameters were analyzed in both group of donors.

**Results** - Flow cytometry analysis showed a variable platelet HLA I expression with a significative difference among donors. The analysis of HLA I allele frequency in donors with high and low platelet HLA expression showed distinctive genotypic features with HLA alleles strictly connected with the expression level. Platelet HLA I expression does not change during time and during freezing-thawing cycles. The analysis of platelet subpopulations showed a statistically significative higher expression of HLA I molecules on large platelets compared to normal size platelets. Moreover donors with high HLA I expression showed higher frequency of large size platelets compared to donors with low HLA I expression ( $p < 0.0001$ ). The analysis of P-LCR parameter in both groups of donors showed a significative difference ( $p < 0.05$ ) within high HLA expression donors.

**Discussion** - Our data suggest an allele-dependent expression of HLA class I molecules on human platelets with distinctive HLA allele frequencies and different platelet subpopulation frequencies among blood donors.

Abstract Code: AIB18727-69

## Mismatch antigenico ed epitope mismatch nel trapianto cardiaco

S. Manfroi<sup>1</sup>, M. Masetti<sup>2</sup>, L. Borgese<sup>3</sup>, A. Aloisio<sup>2</sup>, L. Giovannini<sup>2</sup>, A. Zanetti<sup>1</sup>, L. Potena<sup>2</sup>

(1) Programma Dipartimentale Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, (2) SSD Insufficienza Cardiaca e Trapianti, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, (3) Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC) Università di Bologna

A causa del breve tempo di ischemia, della limitata disponibilità di organi e dell'urgenza clinica la compatibilità HLA nel trapianto di cuore non è solitamente considerata nell'allocazione. La valutazione del rischio immunologico si basa sulla presenza di anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA), strettamente associati a rigetto, perdita di funzione e aumento di mortalità; il rischio di rigetto e la mortalità si associano anche a DSA de novo (dnDSA). Il grado di compatibilità tra donatore e ricevente è tradizionalmente valutato a livello antigenico, ma la tipizzazione molecolare HLA ad alta risoluzione (HR), la conoscenza del ruolo degli epitopi nel riconoscimento dell'antigene e nuovi tools informatici permettono la valutazione dell'*epitope mismatch* (EMM) che numerosi studi correlano con la comparsa di dnDSA, a sua volta responsabile di ridotta sopravvivenza dell'organo trapiantato. Abbiamo analizzato retrospettivamente 165 pazienti trapiantati di cuore dal 2014 al 2022 (43 c. ischemica, 77 c. dilatativa, 22 c. ipertrofica, 23 altra patologia) presso il Policlinico S.Orsola di Bologna, sottoposti a routinario follow up biotipico per il monitoraggio del rigetto; sono stati raccolti e analizzati i dati relativi a: mismatch HLA (MM) pre trapianto, score PIRCHE, rigetto anticorpo mediato e cellulare (>2 episodi consecutivi). L'outcome primario è la sopravvivenza libera da eventi cardiovascolari maggiori (MACE): ricovero per scompenso, necessità di angioplastica coronarica, decesso per cause cardiovascolari. Durante un follow up medio di  $3,4 \pm 2,6$  anni si sono verificati 14 MACE e 44 episodi di rigetto umorale (AMR). Il numero di MM correla: a) con MACE:  $96,7 \pm 0,9\%$  e  $96,7\% \pm 1,9\%$  vs  $92,7 \pm 3,1\%$  e  $89,3 \pm 3,9\%$  rispettivamente ad 1 e 2 anni per i pazienti con <6 MM vs >6MM ( $p < 0.05$ ); b) con AMR a 6 mesi e 1 anno dal trapianto:  $83,8 \pm 3,8$  vs  $69,6 \pm 5,5\%$ ;  $82,6 \pm 3,9\%$  vs  $66,3 \pm 5,7\%$ , <6MM, vs > 6MM ( $p < 0.05$ ). Lo score PIRCHE correla con il numero dei MM ( $p < 0.001$ ); 45 pazienti con dnDSA a 1 mese hanno un trend verso uno score PIRCHE sopra il valore mediano di 95 ( $63.2\%$  vs  $37.5\%$ ,  $p = 0.09$ ); tuttavia lo score PIRCHE non correla con l'incidenza di MACE o AMR. I dnDSA a 1 e a 6 mesi correlano con l'incidenza di AMR a 1 anno e di MACE a 1 anno. PIRCHE consente l'inserimento della tipizzazione HLA A, B, C, DRB1, DQB1 in bassa risoluzione dei donatori e dei riceventi, come usualmente inserita ed utilizzata per l'allocazione nella piattaforma Donor Manger del Centro Riferimento Trapianti della Regione Emilia Romagna, mentre in letteratura è utilizzata quella in HR. È verosimile che con un maggior grado di risoluzione della tipizzazione HLA, come in letteratura, anche nella nostra casistica lo score PIRCHE si dimostri utile per la stratificazione del rischio immunologico nel trapianto cardiaco facilitando l'identificazione e il monitoraggio dei pazienti ad elevato rischio di produrre dnDSA.

Abstract Code: AIB18728-70

## Caratteristiche demografiche ed immunologiche dei pazienti in lista per trapianto di rene da donatore cadavere

C. Biagini<sup>1</sup>, F. Vistoli<sup>2</sup>, V. De Gregorio<sup>1</sup>, E.F. Kauffmann<sup>2</sup>, S. Fornaciari<sup>1</sup>, R. Lamanna<sup>1</sup>, F. Galati<sup>1</sup>, S. Di Beo<sup>1</sup>, L. Felet<sup>1</sup>, U. Boggi<sup>2</sup>, M. Curcio<sup>1</sup>

(1) Sezione Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy, (2) UO Chirurgia Generale e dei Trapianti-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

L'algoritmo nazionale per l'allocazione degli organi (*INKA*) utilizza una serie di parametri immunologici e demografici, tra questi, in ordine, *gruppo sanguigno*, *Panel Reactive Antibody (PRA)*, *età ricevente*, *anzianità dialitica* e *di lista di attesa*. Alcune di queste variabili possono influire sulla permanenza in lista di attesa. Di conseguenza risulta di fondamentale importanza stratificare ed analizzare tali variabili in funzione del livello di presensibilizzazione.

Sono stati arruolati ed analizzati 124 pazienti i cui dati, immunologici e demografici, sono stati estrapolati dal gestionale regionale *Gestione Integrata Trapianti (eGIT)*. Le variabili prese in considerazione, oltre a quelle sopra riportate, sono anche la presenza o meno di precedenti trapianti (*pTx*).

Nella prima fase dello studio i pazienti sono stati stratificati sulla base del livello di presensibilizzazione utilizzando il max *PRA* ed utilizzando un range incrementale pari al 10%. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso il *chi-quadrato* ed il *Mann-Whitney U-test*. Come mostrato in tabella 1, il livello di presensibilizzazione dei pazienti non segue una distribuzione normale.

PRA	N.°	Freq. %
0 - 10	50	40%
10 - 20	7	6%
20 - 30	2	2%
30 - 40	4	3%
40 - 50	3	2%
50 - 60	5	4%
60 - 70	2	2%
70 - 80	2	2%
80 - 90	6	5%
90 - 100	43	35%
<b>Totali</b>	<b>124</b>	<b>100%</b>

Tabella 1 Distribuzione dei pazienti in funzione del livello di pre-sensibilizzazione

Sulla base della distribuzione dei pazienti in funzione del *PRA* è stato possibile suddividere la popolazione in due principali gruppi; pazienti con  $90\% < PRA \leq 100\%$  (**I gruppo**) versus quelli con  $PRA < 90\%$  (**II gruppo**).

Il confronto delle diverse variabili prese in considerazione fra i due gruppi ha messo in evidenza:

- **Sesso** (nessun precedente Tx): 11% maschi e 89% femmine (I) vs 70% maschi e 30% femmine (II) ( $p < 0.01$ ).
- **ABO**: A (42%) I vs A (18%) II ( $p < 0.01$ ); O (30%) I vs O (67%) II ( $p < 0.01$ ).
- **Tempo medio di dialisi**: 8,05 anni (I) vs 3,55 (II) ( $p < 0.01$ ).
- **Anzianità media di lista**: 4,72 anni (I) vs 2,25 (II) ( $p < 0.01$ ).
- **pTx** ( $\geq 1$ ): 79% (I) vs 25% (II) ( $p < 0.01$ ).

Il maggior tempo di permanenza in lista sembrerebbe essere fortemente dipendente da un livello di  $PRA \geq 90\%$ . In aggiunta, i nostri dati non evidenziano alcuna correlazione lineare fra il tempo di permanenza in lista ed i livelli di sensibilizzazione. In accordo con la letteratura, precedenti gravidanze e *pTx* si confermano fattori immunizzanti che impattano fortemente sul tempo di permanenza in lista. Infine, il gruppo sanguigno A è risultato più frequente nei pazienti con  $PRA \geq 90\%$ .

L'analisi demografica ed immunologica della lista dei pazienti in attesa di trapianto di rene rappresenta uno strumento utile nell'individuare gruppi di potenziali candidati per strategie di desensibilizzazione come l'Imflidase o il trapianto di milza. In conclusione, un approccio olistico della moderna immunologia dei trapianti diventa sostanziale nel supportare il clinico durante le fasi di stratificazione del rischio/beneficio al trapianto.

Abstract Code: AIB18729-71

## Introduzione della tecnologia NGS nella pratica clinica: standard EFI e punti critici

R. Lamanna<sup>1</sup>, C. Biagini<sup>1</sup>, S. Fornaciari<sup>1</sup>, V. De Gregorio<sup>1</sup>, D. Mandarino<sup>1</sup>, D. Gonnella<sup>1</sup>, F. Salvadori<sup>1</sup>, B. Luchetti<sup>1</sup>, M. Curcio<sup>1</sup>

(1) Sezione Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italy

**Introduzione:** Gli standard EFI (versione 8.0) contemplano aspetti inerenti l'organizzazione del laboratorio, la qualifica del personale, la gestione della qualità, le metodiche. Tra queste vi è il sequenziamento di nuova generazione, *Next Generation Sequencing* (NGS). Il laboratorio di Immunogenetica dell'AOUPisana, ha redatto per la metodica NGS, la relativa istruzione operativa, eseguita la formazione del personale, la validazione della metodica, definito i criteri di accettabilità dei risultati, la loro interpretazione e la loro tracciabilità, fino alla refertazione del dato. Il laboratorio è stato sottoposto a visita ispettiva *ad interim* per la verifica dei requisiti richiesti dagli Standard.

**Materiali e Metodi:** La validazione della metodica ha previsto l'esecuzione della tipizzazione HLA in alta risoluzione (HR) dei loci HLA-A, B, C, DRB1-3-4-5, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1 su circa 30 campioni (Controlli di Qualità e pazienti) eseguiti in precedenza nel laboratorio mediante altre metodiche in HR e su 24 campioni forniti da un laboratorio accreditato EFI per la metodica NGS (samples sharing). La library è stata generata attraverso la tecnologia "*hybrid capture enrichment*" ed analizzata mediante il sequenziatore MiSeqDx Illumina. Per l'interpretazione dei risultati sono stati utilizzati i parametri suggeriti dalla casa produttrice.

**Risultati:** L'analisi dei dati della tipizzazione *intra-laboratorio* ed *inter-laboratorio* ha mostrato un grado di concordanza dei risultati, pari al 100%. Per l'assegnazione delle specificità alleliche sono stati considerati, sezione E4.10 degli standard EFI, i seguenti parametri: assenza di campi ambigui nel pannello dei risultati; un valore del Q30 superiore al 75%, una profondità media di copertura pari almeno a 100, l'assenza di mismatches o ambiguità di fase. Il training del personale ha evidenziato la presenza di alcuni punti critici quali un elevato grado di variabilità durante le fasi della preparazione della libreria. Risulta fondamentale un attento monitoraggio della temperatura ambientale/umidità allo scopo di garantire la stabilità di alcuni reagenti (punto C2.3-standard EFI).

**Discussione e Conclusioni:** La tecnologia NGS si è dimostrata estremamente robusta ed affidabile e la validazione della metodica è stata portata a termine con successo. Permangono alcuni punti critici insiti nella metodica che possono avere un impatto negativo sul dato finale, quali:

- Tempi lunghi di esecuzione
- Numerosi passaggi manuali e di conseguenza aumento del rischio di errori
- Elevata variabilità operatore-dipendente
- Elevato numero di campioni/test maneggiati per seduta

Nella nostra esperienza le criticità sopra richiamate sono state ridotte al minimo agendo sull'organizzazione e sull'ottimizzazione dei flussi di lavoro. Inoltre è auspicabile che la formazione del personale avvenga da parte di un primo operatore a cascata sugli altri, allo scopo di minimizzare la variabilità insita nella trasmissione del "*know-how*".

Abstract Code: AIB18730-63

## Selezione e purificazione delle cellule Natural Killer in pazienti oncoematologici pediatrici sottoposti a trapianto di cellule staminali

D. Madalese<sup>1</sup>, R. Colucci<sup>1</sup>, L. Auriemma<sup>1</sup>, G. Maisto<sup>1</sup>, S. Nappo<sup>1</sup>, M. Toriello<sup>1</sup>, R. Casalino<sup>1</sup>, F.P. Tambaro<sup>2</sup>, R. Penta De Vera D'aragona<sup>1</sup>

(1) UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon", Napoli, Italia, (2) UOC Trapianto di cellule emopoietiche e Terapia cellulari – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon", Napoli, Italia

**Introduzione:** Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è una pratica salvavita ampiamente utilizzata per trattare diverse patologie oncoematologiche. La valutazione della ricostituzione immunitaria è cruciale per monitorare l'efficacia del trapianto e la possibile insorgenza di rigetto. Nel paziente trapiantato le cellule Natural Killer alloreattive sono in grado di prevenire le ricadute grazie ad un'efficace attività antileucemica (GvL). Le cellule NK sono fondamentali nelle prime settimane del post-trapianto rappresentando la *front-line* immunitaria primaria dell'organismo. Il nostro laboratorio ha messo a punto una metodica di selezione delle NK da sangue intero ed estrazione del DNA al fine di studiare questa popolazione cellulare da un punto di vista morfologico e funzionale mediante analisi del metiloma.

**Metodica:** Sono stati analizzati campioni di sangue periferico prelevati da pazienti sottoposti a trapianto di CSE da diversa origine. Le cellule sono state isolate con metodica MACS a selezione positiva da 5 campioni di pazienti post-trapianto e da 10 campioni di UCB per ottenere una popolazione pura di CD56<sup>+</sup> (EasySep CD56<sup>+</sup> Positive Selection Kit - StemCell). Il DNA è stato poi estratto sia da sangue intero che dalle NK isolate con Maxwell® RSC Buffy Coat DNA Kit (Promega).

**Risultati:** I risultati hanno dimostrato che la selezione delle NK tramite MACS è altamente efficiente. Dalle analisi, è emerso che da circa  $3.21 \times 10^3$  WBC/ $\mu$ l nel sangue periferico, è possibile ottenere almeno  $0.37 \times 10^3$  CD56<sup>+</sup>/ $\mu$ l con una purezza dell'89%. Questo fornisce una quantità significativa di materiale per l'analisi post-trapianto con una quantità di DNA estratta di 10 ng/ $\mu$ l eluito in 100  $\mu$ l.

	WBC Mediana (range)	CD56 Mediana (range)	Purezza Mediana (range)	DNA Mediana (range)
<b>Camp Int</b>	3.21(2.6–4.65)	0.47(0.25–0.69)	16%(12–19)	177(154–202)
<b>Camp Iso</b>	0.42(0.11–0.57)	0.37(0.29–0.42)	89%(72–94)	10(3–21)
<b>UCB Int</b>	10.35(9.67–12.5)	0.70(0.18–2.09)	16%(11–25)	186(165–203)
<b>UCB Iso</b>	0.36(0.12–1.50)	1.00(0.49–1.35)	96%(84–98)	31(11–42)

Come mostrato in tabella, le prime due righe si riferiscono a campioni di sangue periferico prelevati da pazienti post-trapianto e rappresentano la media di 5 procedure. Le ultime due righe rappresentano 10 procedure effettuate su campioni cordonali (UCBs) e le NK isolate da essi.

**Conclusioni:** Le NK costituiscono il 10-15% dei linfociti circolanti, nel nostro esperimento confermiamo questo dato con un range 12%-19% in campioni di sangue intero. I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia della nostra metodica nel fornire una quantità sufficiente di materiale su campioni di pazienti pediatrici sottoposti a trapianto consentendo di ottenere una popolazione cellulare con un range di purezza 72%-94%. Questo tipo di ricerca potrebbe contribuire a una migliore comprensione dei meccanismi immunitari coinvolti nel trapianto di CSE e potenzialmente portare a miglioramenti nelle strategie di trattamento oltre che puntar ad innovative *tailored therapy*.



**Abstract Code: AIB18731-64**

## Metodiche di estrazione: standardizzazione ed analisi statistica

L. Auriemma<sup>1</sup>, D. Madalese<sup>1</sup>, R. Colucci<sup>1</sup>, S. Nappo<sup>1</sup>, M. Toriello<sup>1</sup>, R. Casalino<sup>1</sup>, R. Penta De Vera D'aragona<sup>1</sup>

(1) UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia

**Introduzione:** L'estrazione del DNA riveste un ruolo cruciale nella diagnostica molecolare e nella terapia personalizzata. La tipologia di campione di partenza può variare molto: campioni poveri di cellule, volumi ridotti, campioni freschi o congelati e campioni provenienti da centri esteri e sottoposti a stress termici o meccanici legati al trasporto. Questa variabilità obbliga ogni laboratorio a standardizzare la metodica di estrazione per ottenere dal prelievo di partenza un campione di DNA su cui poter lavorare

**Metodica:** Sono state comparate 243 estrazioni da diverse tipologie di prelievo di cui 21 provenienti da paesi esteri e sottoposti a stress legati al viaggio. I restanti campioni sono di origine ambulatoriale di pazienti sottoposti a trapianto di CSE, HLA e malattie e donatori sani. L'estrazione è stata effettuata con sistema Maxwell (Promega), quantizzate con fluorimetro (Quantifluor Promega) e normalizzate a volume di eluizione pari a 200µl. Il confronto è stato fatto per tipologia di campione e kit utilizzato: sangue intero (kit Whole Blood); buffy coat (Buffy Coat Kit). L'analisi statistica è stata effettuata su Colab (Google) sfruttando librerie open source

**Risultati:** I risultati hanno rivelato che la nostra metodica di estrazione permette una standardizzazione indipendente dai campioni di partenza mostrando una resa confrontabile di DNA estratto

	Whole Blood	Buffy Coat
<b>T-Test</b>	0,459	0,739
<b>P-Value</b>	0,648	0,461

Nella tabella sono indicati i valori del T-Test e del P-Value per le due metodiche, comparando i campioni estratti dopo più giorni e sottoposti stress, rispetto a campioni estratti da sangue fresco. Il P-Value è superiore a 0,05 facendo accettare l'ipotesi nulla del test

Confrontando i risultati ottenuti dai 2 kit differenti, otteniamo valori riportati nella tabella sottostante

	DNA BC vs. WB
<b>T-Test</b>	4,138
<b>P-Value</b>	0,00068

**Conclusioni:** L'analisi statistica ha rivelato che la metodica di estrazione automatica in uso è efficace su tutti i campioni che giungono in laboratorio, freschi o “stressati” e con una diversa concentrazione di cellule nucleate di partenza. Nello specifico:

Whole Blood il T-Test è 0,459 e il P-Value è 0,648

Buffy Coat, il T-Test è 0,739 e il P-Value è 0,461

Entrambi i P-Value sono superiori a 0,05 quindi non significativi nella resa di DNA estratto tra i diversi tipi di campione di partenza. Viceversa confrontando i risultati tra le due metodiche di estrazione, Buffy Coat e Whole Blood, si ottiene:

T-Test per il confronto delle concentrazioni di DNA tra Buffy Coat e Whole Blood è di 4,138

P-Value di 0,00068 indicando che vi sono differenze significative nella resa di DNA tra i campioni di Buffy Coat e i campioni di Whole Blood. Pertanto si può concludere che l'estrazione del DNA da buffy ha una resa significativamente superiore rispetto all'altra.

L'analisi conferma che questa metodica permette di ottenere DNA di qualità per le indagini HLA, indipendentemente dal campione di partenza e dal tempo intercorso tra prelievo ed estrazione.

Abstract Code: AIB18732-65

## Convalida della metodica di rilevazione del dd-cfdna per la sorveglianza del trapianto di rene mediante estrazione automatizzata

D. Londero<sup>1</sup>, C. Sindici<sup>1</sup>, C. Cervellin<sup>1</sup>, E. Cecchini<sup>1</sup>, I. Sandron<sup>1</sup>, G. Barillari<sup>1</sup>

(1) Dip. Med. Trasfusionale, ASUFC Udine

**Introduzione** Il DNA libero circolante derivante da donatore (dd-cfDNA) rappresenta un biomarcatore non invasivo per il monitoraggio post-trapianto degli organi solidi. Si tratta infatti di un parametro il cui aumento in circolo è correlato al danno d'organo e/o al rigetto. Scopo di questo lavoro è la convalida di un metodo diagnostico per la rilevazione del dd-cfDNA nei pazienti trapiantati di rene, utilizzando un metodo di estrazione automatizzato che consenta una maggior standardizzazione della metodica, dalla fase pre-analitica a quella analitica. La convalida di un metodo diagnostico è obbligatoria prima della sua introduzione nella pratica clinica.

**Materiali e Metodi** Sono stati raccolti 18 campioni in doppio di pazienti trapiantati di rene rispettivamente in provette Streck Cell-Free DNA BCT e in provette in K2-EDTA. I campioni sono stati sottoposti a doppia centrifugazione secondo protocollo, suddivisi in aliquote e congelati. Il dd cf-DNA è stato estratto con un metodo manuale (kit NONACUS Cell3™ Xtract.) e con un metodo automatizzato mediante l'uso dell'estrattore automatico Qiasymphony® (QIAsymphony® Circulating DNA Kit). Gli estratti sono quindi stati analizzati mediante il kit AlloSeq cfDNA, basato su metodica NGS che utilizza 202 SNPs per quantificare il dd-cfDNA nel plasma dei riceventi del trapianto. L'efficienza di estrazione delle due metodiche (manuale vs automatico) è stata valutata confrontando le % di dd-cfDNA, partendo da diversi volumi di plasma; l'accuratezza del metodo è stata valutata mediante prove di ripetibilità e riproducibilità.

**Risultati** Sono stati complessivamente eseguiti 46 test ed il confronto tra il metodo standard (estrazione manuale) e quello in fase di convalida (estrazione automatica) è risultato concordante in termini di % di dd-cfDNA quantificato nel 80% dei casi. Prove di ripetibilità e riproducibilità ottimali hanno confermato l'accuratezza del metodo. La tipologia dei campioni testati ha dato esito >1% dd-cfDNA (alto rischio) nel 8% dei casi, tra 0,5-1% dd-cfDNA (soglia di attenzione) nel 42%, <0,2% dd-cfDNA (basso rischio) nel 50%.

**Conclusioni** I risultati preliminari rappresentano un primo passaggio promettente nella fase di convalida e standardizzazione del metodo di prelievo, di estrazione, di conservazione dei campioni e di rilevazione del cf-DNA derivante da donatore. Ulteriori prove sono in corso per concludere la fase di convalida del metodo diagnostico e per consentire l'introduzione del test nella pratica clinica per un corretto monitoraggio dei pazienti sottoposti a trapianto di rene.

Abstract Code: AIB18737-70

## Incompatibilità a livello di eplets ed esito clinico del trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore aploidentico in pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne

M. Andreani <sup>1</sup>, P. Merli <sup>2</sup>, P. Crivello <sup>3</sup>, R.M. Pinto <sup>2</sup>, M. Troiano <sup>1</sup>, K. Fleishhauer <sup>3</sup>, F. Locatelli <sup>4</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy, (2) Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia, (3) Institute for Experimental Cellular Therapy, University Hospital Essen, Germany, (4) Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) da donatore aploidentico (aplo-HSCT) è una opzione terapeutica routinaria nel trattamento di diverse malattie ematologiche maligne come leucemie acute e sindromi mielodisplastiche. Spesso il donatore scelto per questo tipo di trapianto è un membro della famiglia del ricevente che condivide un solo alotipo con il paziente, mostrando pertanto frequenti incompatibilità HLA sul secondo alotipo. Studi pubblicati in letteratura mostrano risultati contrastanti rispetto a possibili associazioni tra il numero di alleli HLA mismatched tra donatore e ricevente e andamento clinico di aplo-HSCT. Tuttavia, pochi studi hanno valutato il possibile impatto dovuto alla presenza o meno di un elevato numero di differenze a livello di eplets. Questi sono componenti essenziali degli epitopi HLA, costituiti da alcuni residui aminoacidici, la cui distanza è compresa in un raggio tra 3 e 3.5 Armstrong, e identificati da una nomenclatura specifica (es. 11AMR, eplet di classe I). La tipizzazione HLA dei pazienti e dei donatori eseguita ad alta risoluzione sugli 11 loci permette di analizzare il numero di mismatch epitopici attraverso l'utilizzo di un software specifico, il FUSION Matchmaker - Epitope Matching, versione 4.1 (Thermo Fisher, Canoga, USA). Nel trapianto di organi solidi, in particolare quello di rene, è stato recentemente osservato come la presenza di un numero elevato di differenze a livello di eplets tra donatore e ricevente influenzi negativamente l'esito dell'approccio trapiantologico. In questo studio abbiamo analizzato la possibile correlazione tra l'andamento clinico del trapianto e il numero delle differenze eplets in un gruppo di 170 pazienti pediatrici o giovani adulti affetti da malattie ematologiche maligne trattati con aplo-HSCT, dopo procedura di deplezione delle cellule T-alfa/beta e CD19+. L'età mediana al trapianto era di 9,4 anni (range 0,9-22,4); 47 pazienti erano affetti da leucemia mieloide acuta e 123 da leucemia linfoblastica acuta; tutti i pazienti erano in remissione completa al momento del trapianto e hanno ricevuto un condizionamento mieloablativo (per 135 basato sulla TBI). I risultati non hanno mostrato differenze significative tra l'andamento del trapianto e la presenza di eplets mismatched. Sarà in futuro importante verificare se queste differenze presenti in casistiche con un maggior numero di pazienti arruolati, potrà rappresentare un criterio di scelta per un donatore aploidentico in pazienti affetti da patologie ematologiche maligne. È in corso di valutazione in questa stessa coorte anche l'impatto che potrebbe avere il valore di HED, la divergenza evolutiva del sistema HLA (HLA Evolutionary Divergence, HED), un parametro immunogenetico basato sulla variabilità chimico-fisica degli amminoacidi presenti a livello della tasca antigenica delle molecole HLA, e indirettamente associato alla diversità degli immunopeptidomi, presentati da queste ultime.

Abstract Code: AIB18738-71

## Monitoraggio precoce del chimerismo in pazienti pediatrici oncoematologici

R. Colucci<sup>1</sup>, D. Madalese<sup>1</sup>, R. Casalino<sup>1</sup>, L. Auriemma<sup>1</sup>, S. Nappo<sup>1</sup>, M. Toriello<sup>1</sup>, F.P. Tambaro<sup>2</sup>, R. Penta De Vera D'aragona<sup>1</sup>

(1) UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia, (2) 2UOC Trapianto di cellule emopoietiche e Terapia cellulari – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon”, Napoli, Italia

**Introduzione:** Il ruolo del chimerismo post-trapianto è essenziale nei trapianti per le patologie ematologiche maligne in correlazione alla valutazione della Malattia residua misurabile (MRD) è essenziale per l'individuazione di una recidiva precoce, mentre nelle patologie non maligne può dare informazioni precoci riguardanti una secondary graft failure. L'attuale pratica clinica prevede che l'analisi del chimerismo venga effettuata dopo 30 giorni dall'infusione delle CSE. Presso il nostro centro abbiamo valutato il chimerismo subito dopo l'attecchimento dei neutrofili a soli 15 giorni dal trapianto, evidenziando come attecchimento ed emopoiesi avvengano molto precocemente dopo il trapianto.

**Metodica:** Sono stati analizzati campioni diversi (6 da PBSC e 4 da BM) di pazienti sottoposti a trapianto, ed è stato monitorato il chimerismo a 15, a 20, e a 30 giorni dal trapianto. Lo studio è stato condotto su 10 pazienti, 3 sottoposti a trapianto allogenico da Match Unrelated Donors (MUDs) e 7 con trapianto Aploidentico Familiare. Il chimerismo è stato determinato mediante l'analisi degli Short Tandem Repeats (STRs) utilizzando il kit PowerPlex Fusion a 24 loci (Promega) e, come piattaforma di elettroforesi capillare, il sequenziatore AB3500 (Applied Biosistem).

**Risultati:** Come riportato in tabella, per la tipologia di trapianto “Aploidentico” (n=7), la percentuale media di chimerismo è stata del 94.78% con un range 65.5%-100%. Il numero di neutrofili ha mostrato una media di 15.6 con un range 11-19, mentre la media delle piastrine è stata di 14.2 con un range 11-16. Nel gruppo del trapianto “Allogenico MUD” (n=3), la percentuale media di chimerismo è stata del 98.4% con un range 95.3%-100%. Il numero di neutrofili ha mostrato una mediana di 19.5 con un range 13-26, mentre la mediana delle piastrine è stata di 20.5 con un range 17-24.

Tipologia	Chimerismo % Mediana (range)	Neutrofili Mediana (range)	Piastrine Mediana (range)
Aplo Fam	99.5 (65.5 – 100)	17 (11 – 19)	15 (11 – 16)
Allo MUD	100 (95.3 – 100)	19.5 (13 – 26)	20.5 (17 – 24)

**Conclusioni:** Lo studio suggerisce che il chimerismo può essere valutato a soli 15 giorni dal trapianto, osservando precocemente l'attecchimento dei neutrofili e l'emopoiesi. Un risultato migliore si è evidenziato nel gruppo di trapianti MUD rispetto al Familiare con una percentuale di chimerismo più alta, nonché con un numero di neutrofili e piastrine più elevato. Questo approccio può fornire informazioni utili riguardanti la probabilità di recidiva precoce in pazienti con patologie ematologiche maligne o informazioni riguardanti una possibile secondary graft failure nelle patologie non maligne. È necessario comunque ampliare l'indagine su un numero maggiore di pazienti per confermare questi risultati e stabilirne l'effettiva utilità clinica.

Abstract Code: AIB18739-72

## **Imlifidase: nuove prospettive per i pazienti iperimmuni. L'esperienza del centro Trapianti di Parma.**

C. Labate<sup>1</sup>, S. Giuliadori<sup>1</sup>, S. Bardini<sup>1</sup>, M. Benecchi<sup>1</sup>, P. Berni<sup>1</sup>, C. Foroni<sup>1</sup>, M. Iaria<sup>2</sup>, F. Lobascio<sup>1</sup>, E. Magni<sup>1</sup>, J. Manduca<sup>1</sup>, R. Merli<sup>1</sup>, A. Palmisano<sup>3</sup>, J. Parrotta<sup>1</sup>, I. Pezzani<sup>1</sup>, C. Puliatti<sup>2</sup>, E. Russello<sup>1</sup>, V. Sgobba<sup>1</sup>, R. Troiano<sup>1</sup>, U. Maggiore<sup>3</sup>, P. Zanelli<sup>1</sup>

(1) SDD Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, (2) UO Chirurgia trapianti, Clinica Chirurgica Generale, AOU di Parma, (3) SS Trapianti, UO Nefrologia, AOU di Parma e Dipartimento di Medicina e Chirurgia Università di Parma

L'Imlifidase è un farmaco in grado di clivare le immunoglobuline G portando ad un rapido declino dei livelli di anticorpi e all'inibizione della risposta immuno-mediata da IgG, fornendo una nuova opportunità per i pazienti iperimmuni che di norma hanno un limitato accesso al trapianto renale a causa della presenza di anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA). Nel centro trapianti di Parma è stato eseguito il secondo trapianto italiano dopo trattamento con Imlifidase di un paziente iperimmune maschio di 48aa, 94Kg, secondo trapianto, anzianità dialitica 8 anni, altamente sensibilizzato (PRA >99%) in prima classe. In seguito all'analisi mediante hierarchical clustering/K-means clustering sono state classificate le specificità anticorpali presenti in 3 classi di rischio (alto, moderato e basso) e applicato il "delisting" per rischio-moderato-basso, con una riduzione degli antigeni proibiti del 70%. Questo ha permesso di selezionare una donatrice cadavere di 46 anni della Regione Emilia Romagna contro la quale il paziente presentava 3 DSA C1q negativi, 1 a rischio moderato (B\*38:01 con MFI 6000) e 2 a basso rischio (C\*06:02 e C\*12:03, rispettivamente con MFI 1400 e 3700) precedentemente identificati mediante LSA (Luminex Single Antigen class I/II, OneLambda). I sieri più significativi del paziente sono stati analizzati mediante cross-match citotossico (CDC-XM) e citofluorimetrico (FC-XM); il primo è risultato negativo sia sui linfociti T che sui B, il secondo positivo su entrambi (linfociti T MCS 567 e linfociti B MCS 524). L'FC-XM e lo studio degli anticorpi anti-HLA sono stati eseguiti sui sieri prelevati a 2 e 4 ore dalla somministrazione del farmaco: i *crossmatch* sono risultati negativi e i DSA presentavano valori di MFI al di sotto di 500. In seguito al trapianto sono stati monitorati quotidianamente i livelli dei DSA. Il *rebound*, iniziato in 7° giornata, ha avuto il picco in 10° (B\*38:01 MFI 21000) per poi lentamente ridursi (MFI < 7500) in 24° giornata; tali valori si sono mantenuti anche a 72hr post-plasmaferesi (10 sessioni in 19 giorni). Il paziente è stato dimesso in 30° giornata con creatininemia stabile (1.6mg/dL) ma con rigetto subclinico C4d positivo alla 2°-3° biopsia (15°, 26° giornata) per cui è stato pianificato un breve trattamento con eculizumab. Il trattamento con imlifidase, unito ad una minuziosa e frequente analisi degli anticorpi pre e post-trapianto, nonché alla collaborazione di varie figure professionali, permetterà anche ai pazienti altamente sensibilizzati di accedere al trapianto renale con buoni risultati.



**Abstract Code: AIB18740-64**

## **Identificazione di 2 nuovi alleli HLA di classe II mediante Next Generation Sequencing.**

S. Giuliadori <sup>1</sup>, P. Berni <sup>1</sup>, C. Labate <sup>1</sup>, J. Manduca <sup>1</sup>, J. Parrotta <sup>1</sup>, R. Troiano <sup>1</sup>, P. Zanelli <sup>1</sup>

(1) SDD Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

L'utilizzo della Next Generation Sequencing (NGS) per la tipizzazione HLA in alta risoluzione dei pazienti in attesa di trapianto renale e degli eventuali donatori viventi si è rivelato uno strumento di grande utilità nella valutazione dei cosiddetti antigeni proibiti e nella ottimizzazione della ricerca del miglior donatore. Nel corso della tipizzazione in NGS di 2 diversi pazienti sono stati identificati nel nostro centro 2 nuovi alleli di classe II non presenti nel database IMGT aggiornato al momento dell'analisi (IPD-IMGT/HLA Database v3.51.0). Le tipizzazioni sono state eseguite mediante kit NGSgo<sup>®</sup>-MX11-3 (GenDx) e piattaforma iSeq100 (Illumina) e i risultati analizzati mediante software NGSengine v2.29.0. La tipizzazione HLA a 3 campi del locus DRB1 nel paziente 1 viene assegnata dal software come DRB1\*14:01:01, \*14:54:01 con un mismatch in posizione 8865 del DNA genomico e 663 del CDS; in tale posizione dell'esone 2 si osserva la sostituzione di una timina (T) con una citosina (C) nella terza posizione del codone 192 Serina (TCT->TCC), senza variazione dell'amminoacido (192S). La tipizzazione HLA a 3 campi del locus DRB4 nel paziente 2 viene assegnata dal software come DRB4\*01:03:01 (il paziente presenta un DRB5\*01:02:01) con un mismatch in posizione 9724 del DNA genomico e 168 del CDS; in tale posizione dell'esone 4 si osserva la sostituzione di di una guanina (G) con una citosina (C) nella terza posizione del codone 27 Leucina (CTG->CTC) senza variazione dell'amminoacido (27L). La sequenza dei nuovi alleli è stata confermata in entrambi i pazienti: per il locus DRB1 del paziente 1 mediante NGS con differente kit (AllType<sup>™</sup> NGS, One Lambda; il test è stato eseguito dai colleghi dell'Ospedale Pediatrico Bambin Gesù di Roma) e per il locus DRB4 del paziente 2 mediante SBT (SBT Excellerator<sup>®</sup>, GenDx). Questi nuovi alleli sono stati inviati a GenBank (accession numbers OR466088 e OR466087) e al database IPD-IMGT/HLA (accession numbers HWS10067399 e HWS10067395) in attesa che venga loro assegnato un nuovo nome. La tipizzazione in alta risoluzione mediante NGS dei pazienti in attesa di trapianto renale e dei loro donatori viventi è un utile strumento per la corretta valutazione della compatibilità immunologica tenendo conto anche della possibilità di identificare nuovi alleli HLA.

Abstract Code: AIB18741-65

## **Impiego della trasfusione piastrinica come parte della desensibilizzazione nei pazienti con DSA di classe I pre-trapianto allogenico HLA-mismatch: esperienza monocentrica nel decennio 2013-2023**

G. Lando<sup>1</sup>, R. Crocchiolo<sup>1</sup>, G. Di Maggio<sup>1</sup>, G. Cornacchini<sup>1</sup>, G. Grillo<sup>2</sup>, B. Mazzi<sup>3</sup>, S. Rossini<sup>1</sup>, M. Tassara<sup>4</sup>

(1) SIMT, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, (2) Centro Trapianti Midollo, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, (3) Laboratorio HLA, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano, (4) SIMT. IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

La presenza di DSA nei pazienti candidati a trapianto di CSE da donatore HLA-mismatch rappresenta un fattore di rischio di mancato o parziale attecchimento, con conseguente peggioramento della prognosi per il paziente trapiantato. Per tale ragione lo screening è attualmente raccomandato in tutti i pazienti candidati a tale tipo di trapianto, al fine di eseguire la desensibilizzazione oppure di selezionare un donatore differente. In Italia ogni centro trapianti possiede una propria strategia desensibilizzante, mancando una policy omogenea e condivisa. Il nostro centro prevede, all'interno dello schema desensibilizzante, anche la trasfusione piastrinica a scopo di adsorbimento in vivo, in considerazione dell'espressione delle molecole HLA di classe I sulla superficie piastrinica.

Riportiamo qui la nostra esperienza con l'impiego di trasfusioni piastriniche a scopo di adsorbimento su 9 pazienti DSA+, tra il 2013 ed il 2023; tali emocomponenti sono stati ottenuti tramite piastrinoafèresi da donatori noti, tipizzati per HLA di classe I, presentanti l'allele contro cui era diretto il DSA; la loro somministrazione è avvenuta all'interno del protocollo di desensibilizzazione comprendente PEx, Rituximab ed Ig ev.

L'età mediana dei pazienti è 63 anni (range 44-70), con un rapporto M/F: 2/7. Due terzi dei trapianti sono aploidentici T-repleti, di cui tutti *child-to-mother* tranne uno. La mediana di MFI del DSA più alto è 7810 (range 2730-19000) ed il numero mediano di trasfusioni piastriniche per paziente è 2 (range 1-5), sempre eseguite nei giorni -1 e/o 0. I donatori impiegati per la piastrinoafèresi sono familiari in 3 casi e non consanguinei in 6, quest'ultimi ottenuti grazie alla collaborazione con un centro del medesimo DMTE che possiede un piccolo registro di donatori di piastrine tipizzati per HLA di classe I. Non sono state documentate reazioni trasfusionali e la desensibilizzazione è risultata efficace nel 78% dei pazienti, con una mediana di attecchimento dei neutrofili in tali pazienti di 17 giorni (range 13-21). E' in corso un'analisi di correlazione tra il contenuto piastrinico trasfuso e la riduzione dei DSA nei pazienti valutabili.

In conclusione, i dati ottenuti dalla nostra esperienza decennale mostrano l'utilità dell'impiego della trasfusione piastrinica a scopo di adsorbimento all'interno dello schema desensibilizzante, al fine di migliorare l'efficacia della desensibilizzazione nei casi di DSA diretti contro Ag di classe I. La creazione di un ampio registro di donatori tipizzati a tale scopo permetterebbe un incremento dell'impiego di una tale strategia, a vantaggio di un maggior numero di pazienti.

Abstract Code: AIB18742-66

## Probabile disomia uniparentale materna del cromosoma 6 (upd(6)mat) in un paziente affetto da Leucemia Mieloide Acuta in attesa di trapianto di CSE

F. Papola<sup>1</sup>, A. Zoli<sup>2</sup>, A. Olivieri<sup>3</sup>, R. Azzarone<sup>1</sup>, O. Valdez<sup>1</sup>, M.G. Tupone<sup>1</sup>, S. Agolini<sup>2</sup>, I. Scortechini<sup>3</sup>, E. Trinchini<sup>1</sup>, C. Battistoni<sup>1</sup>, S. Scipione<sup>1</sup>, S. Scacchi<sup>1</sup>, G. Rombolà<sup>4</sup>, C. Cervelli<sup>1</sup>

(1) Centro Regionale di Immunoematologia e tipizzazione tissutale - ASL1 Avezzano Sulmona L'Aquila, (2) Laboratorio HLA - Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche - Ancona, (3) Clinica Ematologica - Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche - Ancona, (4) Immunogenetica, SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

La disomia uniparentale materna o paterna di un cromosoma (upd(Ch)mat/pat) è una rara condizione in cui la prole eredita entrambe le copie di un cromosoma da un solo genitore. La rilevanza clinica di questa condizione non è ancora chiara: imprinting anormale, evidenza di malattie genetiche per omozigosi dei geni recessivi, mosaicismo somatico o una condizione clinicamente silente. Abbiamo analizzato un paziente adulto di sesso maschile affetto da LMA, con fenotipo in apparenza normale, in valutazione per un trapianto di CSE e abbiamo evidenziato, nonostante la fase di completa remissione della patologia, omozigosi in tutti i loci HLA sia con NGS che con SSO su sangue periferico. Per verificare la possibile perdita allelica dovuta alla patologia, abbiamo studiato gli aplotipi HLA dell'intera famiglia (padre, madre e 2 fratelli) dimostrando l'assenza dell'aplotipo HLA paterno nel paziente. Il genotipo del soggetto veniva confermato tipizzando l'HLA su tessuti diversi dal sangue periferico, come swab buccale e saliva, riconfermando l'omozigosi dell'intera regione HLA dovuta alla presenza del solo aplotipo materno. Al fine di definire la corretta discendenza del soggetto, è stata eseguita l'analisi degli STR (Powerplex Fusion23), evidenziando su tutti i loci considerati la reale discendenza dal padre naturale (probabilità di paternità = 99.99999%; LR = 1.7e+011 da *Families3*). Queste analisi hanno quindi portato alla luce, nel soggetto studiato, una disomia uniparentale materna del cromosoma 6 (upd(6)mat) confermata, successivamente dall'anamnesi che evidenziava anomalie della placenta durante la gravidanza, basso peso alla nascita, facies caratteristica, anomalie scheletriche durante la crescita. Nella storia clinica del paziente si descrive esordio di lesioni cutanee multiple nodulari suggestive alla biopsia di neoplasia ematologica, successivamente caratterizzato sia su sangue che midollo osseo, come Leucemia Mieloide Acuta con riarrangiamento NUP98 (in circa il 40% delle cellule) in conseguenza di una traslocazione t(7;11)(p15;p15) in FISH (rischio sfavorevole secondo ELN 2022). L'aplotipo unico del paziente mostra una frequenza massima di 0,087% negli individui caucasici e perciò non è presente indicazione all'attivazione di una ricerca MUD. La presenza di una sorella che condivide l'aplotipo materno è attualmente in studio per la donazione di CSE da donatore aploidentico con compatibilità HLA, di fatto, completa nella direzione GvHD. Lo studio della ereditarietà degli aplotipi deve essere sempre eseguito (attraverso genitori, fratelli, figli) nell'ambito familiare soprattutto in soggetti leucemici che mostrano omozigosità sia per alcuni loci, che per l'intero aplotipo HLA, come pure dovrebbe essere eseguita una riconferma HLA su materiale biologico diverso dal sangue periferico o midollare. Sono in corso ulteriori studi per valutare la completa o parziale isodisomia materna del cromosoma 6 mediante la tecnologia SNP array.

Abstract Code: AIB18746-70

## Gruppo di Lavoro Operativo AIBT-CNT per la standardizzazione della analisi bead-array Luminex per la ricerca anticorpi HLA: risultati preliminari

D. Ciappi<sup>1</sup>, A. Piazza<sup>2</sup>, G. Rombolà<sup>1</sup>, M.C. De Stefano<sup>2</sup>, F. Papola<sup>3</sup>

(1) AOU Careggi Firenze, (2) Commissione Controlli Qualità HLA e Chimerismo Centro Nazionale Trapianti Roma, (3) Centro Regionale Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale, PO L'Aquila

**Introduzione.** Il test bead-array Luminex è la tecnica di riferimento per ricerca e caratterizzazione anticorpi anti HLA nel trapianto organi e CSE ed il valore MFI, misurazione semi-quantitativa, indiretta del titolo anticorpale, è utilizzato come riferimento per le scelte cliniche. AIBT, in collaborazione con Commissione Controlli Qualità HLA del CNT, ha istituito un Gruppo di Lavoro Operativo per implementare un protocollo standardizzato di analisi, uniformare i risultati tra piattaforme commerciali e definire soglie di valore MFI condivise per stratificazione rischio immunologico.

### Metodologia.

- 10 sieri da precedenti Controlli Qualità HLA del CNT analizzati mediante Single Antigen Beads da 20 laboratori, tra cui i 16 della rete trapianto organo, per caratterizzazione specificità classe I e II con piattaforme commerciali in uso (14 laboratori piattaforma #1, 8 lab piattaforma #2) e protocollo standardizzato su indicazione ditte
- Analisi grafica e statistica è condotta con strumenti di facile applicazione e interpretazione per i laboratori. Sui risultati, riportati in formato excel ed esclusi valori outlier, calcolati Medie, DS, Mediane e Quartili tra i laboratori per tutte le biglie
- Per comparazione tra piattaforme, sui risultati allineati per specificità condivise da biglie, analizzati coefficiente variabilità ( $CV=DS/M$ ) tra laboratori, correlazione, analisi differenze MFI, definizione cutoff uniformi tra le piattaforme

**Risultati.** Per piattaforma #1 e #2 sono state identificate, rispettivamente, 479 e 303 reazioni positive ( $MFI>1000$ ) per classe I, 350 e 189 per classe II (copertura specificità rispettivamente: 100% e 95%)

### Comparazione tra laboratori

- CV medio per ciascun siero
- CV tutte biglie stratificato per valore MFI (500-1000-3000-5000)
- CV per locus HLA

Modelli statistici per comparazione tra piattaforme commerciali (in accordo a CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute #EP09 e documento SIBioC 2015)

- Correlazione: coefficiente r di Pearson
- Analisi correlazione: retta regressione non parametrica di Passing-Bablok con limiti confidenza. Analisi distribuzione residui per validazione modello
- Analisi bias differenze delle misurazioni: Plot di Bland-Altman. Ratio differenza vs. media misurazioni
- Definizione cutoff uniformi: curve ROC. Valori MFI delle due piattaforme che massimizzano riproducibilità di cutoff di positività e permissività in termini di sensibilità, specificità e accuratezza

**Conclusioni.** Analisi in corso e risultati preliminari saranno discussi con laboratori e presentati a Congresso AIBT. L'introduzione di un protocollo standard e la condivisione dei risultati permetterà una riduzione del CV tra laboratori sotto 20% (limite FDA per tecnica semiquantitativa). La comparazione delle misurazioni tra le diverse piattaforme tecnologiche permetterà di definire cutoff uniformi da utilizzare nelle scelte cliniche. I risultati sono propedeutici all'aggiornamento delle Linee Guida AIBT sulla istocompatibilità nel trapianto organo

Abstract Code: AIB18747-71

## Rilevanza della tipizzazione HLA mediante NGS in un caso di HLA loss in LNH-B

I. Sbarsi<sup>1</sup>, P. Bergamaschi<sup>1</sup>, L. Chiesa<sup>1</sup>, E. Roncoroni<sup>2</sup>, R. Sciarra<sup>2</sup>, C. Cavalloni<sup>2</sup>, R. Cacciato<sup>1</sup>, C. Bottazzi<sup>1</sup>, C.T. Prezioso<sup>1</sup>, A. Pasi<sup>1</sup>, C. Perotti<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunogenetica, SIMT, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, IT, (2) SC Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, IT

Riportiamo il caso di un paziente maschio, 57a, LNH-B, tipo "High-grade B-cell lymphoma" (HG-BCL, sec. WHO 2017), stadio IV con leucemizzazione periferica. Componente monoclonale: IgMk. Analisi citogenetica e molecolare su sangue midollare: cariotipo complesso (49-50,XY); mutazione L265P del gene MYD88. IgHV mutato. Riferito al nostro laboratorio HLA per attivare la ricerca di un MUD compatibile. La tipizzazione HLA-HR mediante NGS (MX11-3, GenDx) su DNA estratto da sangue periferico (sp) rivelava la presenza di tre alleli al locus B, uno dei quali con una delezione di 11 bp che lo rendeva un allele potenzialmente nullo a causa dello slittamento della fase di lettura. La presenza di tre alleli al locus B non veniva invece rilevata dall'analisi in PCR-SSO (RSSOXR, One Lambda) e PCR-SSP (Olerup) sul medesimo campione. Si approfondiva il caso mediante tipizzazione HLA in NGS (MX11-3) su DNA estratto da tampone salivare, ove non veniva riscontrata la presenza dell'allele con la delezione. Sulla base di tali risultati, si ipotizzava una mutazione somatica, a carico della popolazione blastica presente nel sp, caratterizzata da un'iniziale perdita di eterozigosi in classe I al locus B (*HLA loss*) con il significato di un possibile *escape* immunologico dei blasti leucemici vs linfociti T. E' noto infatti come la deregolazione dell'HLA di classe I, per il suo ruolo nell'immunosorveglianza, non raramente sia implicata nella progressione tumorale e nella risposta all'immunoterapia. In particolare, nell'ambito dei LNH-B, è descritto che il 50% dei DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) sia caratterizzato da perdita di espressione dell'HLA di classe I come meccanismo di evasione del riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici, con patogenesi in più fasi ed origine sia germinale che somatica. Riguardo poi all'effetto dell'*HLA loss* al locus B sull'attività antitumorale NK, la tipizzazione dei KIR evidenziava la presenza di tre recettori inibitori (KIR3DL2, 3DL1, 2DL3) ed uno solo attivatorio (KIR2DS4), che abbiamo analizzato rispetto alla presenza dei ligandi HLA di classe I. In particolare, in base alla tipizzazione HLA-B\*15:01,\*38:01 (Bw6/Bw4) e B\*15DEL,\*38:01 (-/Bw4) per HLA normale e mutato, rispettivamente, e dal momento che non sono descritti KIR che legano allotipi Bw6, era ipotizzabile che non ci fosse effetto dell'*HLA loss* sull'inibizione delle NK (mediata da KIR3DL1-Bw4) e di conseguenza che non ci fosse reclutamento delle cellule NK vs blasti leucemici, risultando in un ulteriore contributo all'*escape* immunologico. Questo caso conferma l'importanza dell'analisi dei KIR nell'algoritmo di scelta del donatore, anche in funzione di terapie cellulari, quali CAR-NK. Il paziente, recidivato, refrattario a plurime linee di terapia di salvataggio, non candidabile a CAR-T per localizzazione di malattia al SNC e persistente trombocitopenia, veniva avviato ad ibrutinib a uso individuale, con ulteriore progressione di malattia condizionante il decesso.



Abstract Code: AIB18748-72

## Significato di varianti SNPs-HLA in pazienti anziani affetti da leucemia mieloide acuta: risultati di uno studio randomizzato multicentrico

M. Cuzzola<sup>1</sup>, M. Francone<sup>1</sup>, R.E. Saladino<sup>1</sup>, E. Spiniello<sup>1</sup>, A. Candoni<sup>2</sup>, P. Salutari<sup>3</sup>, G.A. Palumbo<sup>4</sup>, G. Reda<sup>5</sup>, G. Ianni<sup>6</sup>, G. Tripepi<sup>7</sup>, D. Capelli<sup>8</sup>, C. Alati<sup>9</sup>, M.C. Cannata<sup>10</sup>, S. Barilla<sup>10</sup>, P. Musto<sup>11</sup>, I.M. Delfino<sup>9</sup>, N. Yasuhito<sup>12</sup>, S. Ogawa<sup>13</sup>, C. Mammi<sup>10</sup>, E.N. Oliva<sup>9</sup>

(1) UOSD Tipizzazione Tissutale, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi Melacrino Morelli, Reggio Calabria, Italia, (2) Divisione di Ematologia, P.O. Santa Maria della Misericordia, A.S.U.F.C. di Udine, Italia, (3) Dipartimento di Ematologia, Ospedale Civile Spirito Santo, Pescara, Italia, (4) UOC Ematologia, Grande Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate "G.F. Ingrassia", Università di Catania, Italia, (5) Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Italia, (6) Dielnet SRL, CRO, Reggio Calabria, Italia, (7) IFC-CNR Istituto di Fisiologia Clinica, Reggio Calabria, Italia, (8) Clinica di Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche, Ospedali Riuniti di Ancona, Italia, (9) UOC Ematologia, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi Melacrino Morelli Reggio Calabria, Italia, (10) UOSD Genetica Medica, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi Melacrino Morelli Reggio Calabria, Italia, (11) Dipartimento di Medicina di Precisione e Rigenerativa e Area Ionica, "A. Moro" Università Scuola di Medicina di Bari, Italia, (12) Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University. Institute for Advanced Study of Human Biology (WPI-ASHBi), Kyoto University, Kyoto, Japan, (13) Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

**Razionale:** La prognosi dei pazienti anziani affetti da leucemia mieloide acuta (LMA) è generalmente infausta. Recenti GWAS basati su tecnologia NGS hanno mediato l'approfondimento delle conoscenze relative al rapporto tra alleli HLA e marcatori SNPs in patologia. In uno studio randomizzato multicentrico, sono state confrontate l'efficacia di azacitidina (AZA) rispetto alla migliore terapia di supporto (BSC) per il trattamento della LMA in pazienti di età > 60 anni che hanno raggiunto la remissione dopo chemioterapia intensiva (QoLESS AZA-AMLE, Oliva et al. Cancers, 2023). La sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 2 anni è stata di 6,0 (IC 95%:0,2–11,7) mesi nel braccio BSC e 10,8 (IC 95%:1,9–19,6 p=0,23) mesi nel braccio AZA. Presentiamo i risultati preliminari dello studio traslazionale ancillare, QOL-ONE Trans-2.

**Obiettivo:** Lo scopo era valutare le variazioni delle mutazioni geniche nei soggetti prima e dopo randomizzazione in relazione al trattamento (AZA o BSC) e alla DFS.

**Metodi:** Il DNA estratto da sangue midollare prelevato alla diagnosi, alla remissione e a 6 mesi dopo randomizzazione è stato analizzato mediante capture sequencing utilizzando un pannello *in house* di 350 geni frequentemente mutati nelle neoplasie mieloidi. Una VAF  $\geq 4\%$  identifica la soglia minima di clonalità.

**Risultati:** Campioni di 24 soggetti con materiale biologico disponibile, 11 assegnati al braccio AZA e 13 al braccio BSC, sono stati analizzati. Alla diagnosi, tutti i pazienti presentavano simultanee mutazioni con un range da 5 a 17 (mediana 10). Tra le mutazioni più frequenti (DNMT3A, TET2, NPM1, NUP214, WT1, RUNX1, NCOR1, IDH2, FANCA, CEBPA, BCOR), le varianti SNPs non sinonime a livello del locus HLA-A sono state rilevate in 7 soggetti, 3 nel braccio AZA e 4 nel braccio BSC; 6 pazienti presentavano lo SNP rs1136741 (missense variant, esone 4), 1 paziente anche SNP rs41542016 (stop gained, esone 3), e 1 paziente SNP rs61760919 (missense variant, esone 2). La presenza di SNPs HLA-A era associata ad un minor rischio di recidiva (HR 0.277, 95% CI 0.08 - 0.95; p=0.049) e ad una DFS significativamente più lunga. In un modello di COX multivariato, l'effetto della mutazione HLA-A era indipendente dal braccio di allocazione (P=0,041). Le mutazioni SNPs individuate sono registrate in dbSNP (ncbi.nlm.nih.gov/snp) e per nessuna di queste varianti è attualmente descritto in letteratura un significato clinico.

**Conclusioni:** Le mutazioni HLA non sono generalmente incluse nel pannello mutazionale della LMA. L'ampio pannello utilizzato in questo studio includeva geni HLA e ne ha rivelato un possibile ruolo favorevole nei pazienti anziani con LMA. Questa scoperta merita ulteriori indagini per confermare il suo valore prognostico e le sue implicazioni terapeutiche. È in corso l'analisi HR-NGS HLA 11 loci per approfondire la conoscenza circa la tipizzazione HLA dei 7 pazienti e poter eventualmente meglio comprendere l'aplotipo LD associato agli SNPs individuati.

**Abstract Code: AIB18749-73**

## **DSA ad alto valore MFI verso epitopi pubblici anti DP in un trapianto CSE MUD 10/10**

M.L. Mattei<sup>1</sup>, S. Palchetti<sup>1</sup>, G. Rombolà<sup>1</sup>, S. Iozzi<sup>1</sup>, M. Betti<sup>1</sup>, E. Pelo<sup>1</sup>

(1) SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze

### **INTRODUZIONE**

La presenza di anticorpi anti HLA specifici verso il donatore (DSA) sono tra i fattori di rischio per il graft failure ed il poor graft function nel trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE), in particolare da donatore aploidentico (Raccomandazioni AIBT-GITMO, Crottiolo 2023). Il 75% dei trapianti MUD 10/10 presenta mismatch DP e DSA anti DP, possibili responsabili di mancato attecchimento (Ciurea 2011, Cardoso, 2023). Si presenta un caso clinico di un candidato a trapianto MUD con presenza di DSA ad alto valore MFI verso donatori 10/10.

### **CASE REPORT**

Paziente 66 anni, LMA, candidata a trapianto CSE. Studio del siero bead-array Luminex mostra estesa immunizzazione anti I e II classe (PRA 83% e 87%) ad alto titolo (MFI massimo 20637 e 21642), da riferirsi a precedenti due gravidanze. Ricerca MUD attivata per iniziale assenza di donatori familiari eleggibili. Selezionati due donatori 10/10, mismatch DP. La paziente presenta DSA anti DP2 e DP4 dei donatori con valore MFI superiore a 20000. Flow-crossmatch non effettuato per mancata disponibilità di linfociti del donatore ed eventuale desensibilizzazione resa difficile da problemi logistici di programmazione e raccolta di CSE con centro estero.

### **DISCUSSIONE**

L'analisi in silico mostra la presenza di anticorpi specifici verso epitopi pubblici DPB1 85GPM con valore MFI>20000 e 96R con MFI > 3000. Verifica su tool bioinformatico Epitope Registry mostra che questi epitopi sono comuni ad alleli DP frequenti, in particolare DPB1\*02 e DPB1\*04:01/\*04:02 ed altamente esposti. In particolare, la posizione 85 descrive un dimorfismo 85GPM/85DEAV (Cano, 2009) che si è mostrato altamente immunogeno e responsabile di rigetto in trapianto rene (Daniels,2022). Entrambi gli epitopi sono sperimentalmente verificati da anticorpi specifici e la maggiore frequenza di anticorpi 85DEAV può essere legata a diversa immunogenicità per carica elettrostatica o diversa espressione (85DEAV/85GPM sono rispettivamente presenti in alleli DP ad alta e bassa espressione in accordo a Petersdorf, 2015).

### **CONCLUSIONI**

La ricerca di anticorpi anti DP e la loro caratterizzazione a livello epitopico deve essere sempre preliminarmente effettuata nel paziente candidato a trapianto midollo osseo e la presenza di DSA ad elevata MFI, diretti verso epitopi pubblici condivisi da alleli ad alta frequenza deve intervenire nella selezione di donatore MUD 10/10, in particolare quando l'estesa immunizzazione rende difficile la ricerca di un donatore aploidentico. DSA anti DP pubblici ad alto valore MFI possono determinare difficile attecchimento e un peggiore esito del trapianto. In questo contesto la desensibilizzazione deve essere raccomandata e richiede linfociti freschi del donatore ed è aleatoria nel risultato, rendendo la programmazione di un trapianto da donatore MUD logisticamente più complessa.

**Abstract Code: AIB18750-65**

## **Effetto prozona in citometria? Una possibile strategia per evitare risultati falsi negativi.**

E. Trovato Salinaro<sup>1</sup>, L. Del Giudice<sup>1</sup>, S. Andreis<sup>1</sup>, R. Favero<sup>1</sup>, F. Agusson<sup>2</sup>, P. Da Rugna<sup>1</sup>, S. Fabris<sup>1</sup>, R. Longhin<sup>1</sup>, P. Donato<sup>3</sup>, G. Ugolini<sup>3</sup>, M.P. Albergoni<sup>1</sup>

(1) UOC Immunotrasfusionale, Azienda Ospedale Università Padova, DIMT Padova, (2) UOC Medicina Trasfusionale, AULSS6 Euganea, DIMT Padova, (3) USD Chirurgia dei Trapianti di Rene, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona

### **Introduzione**

Il crossmatch in citometria (FCXM), eseguito prospetticamente prima dell'esecuzione del trapianto da vivente, permette di valutare la presenza di anticorpi donatore specifici (DSA) nel siero di un paziente candidato a trapianto d'organo. La presenza di DSA preformati in presenza di crossmatch positivo può costituire una controindicazione al trapianto. È noto che l'FCXM può dar luogo a risultati falsi positivi dovuti alla presenza, nel siero del paziente, di anticorpi non-HLA, autoanticorpi, anticorpi monoclonali somministrati al paziente sottoposto a desensibilizzazione, trasfusioni. È noto inoltre che i dati dell'FCXM hanno solitamente buona correlazione con i risultati dello studio anticorpale già in presenza di DSA con MFI>5000/8000; risultano meno evidenze riguardo l'effetto prozona in FCXM.

### **Materiali e metodi**

Paziente F.P., 49 anni, candidato a trapianto di rene da donatore vivente.

Esecuzione FCXM utilizzando anticorpi monoclonali marcati con diversi fluorocromi (anti-CD3-PerCP-Cy5.5 e anti-CD19-PE) per identificare linfociti T e B del donatore e anti-IgG umana (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/FITC); analisi mediante acquisizione al citofluorimetro BD FACSCanto II.

Identificazione anticorpi anti-HLA su siero del paziente, prelevato lo stesso giorno dell'FCXM, eseguito nei giorni successivi con Immucor Lifecodes Single Antigen Assays su piattaforma Luminex.

### **Risultati**

FCXM: linfociti T negativo, linfociti B negativo.

Presenza di DSA in classe II: DQA1\*02 MFI=20323 e DQB1\*02 MFI=15478, PRA 59%.

In assenza di correlazione tra i risultati di FCXM e anticorpi, l'esito negativo ottenuto in citometria è stato attribuito a un possibile effetto prozona.

È stato quindi ripetuto l'FCXM con diluizioni scalari del siero del paziente fino a 1:16: risultato negativo per i linfociti T, positivo per i linfociti B a partire dalla diluizione 1:4.

In parallelo è stata ripetuta la ricerca di anticorpi anti-HLA nel siero del paziente con le stesse diluizioni scalari. I valori di MFI dei DSA sono rimasti elevati nonostante le diluizioni: DQA1\*02 MFI=14004 e DQB1\*02 MFI=8974 in diluizione 1:16.

Tutti gli anticorpi anti DQ risultati positivi condividevano il medesimo epitopo con MFI elevato: MFI=20518 su siero intero, MFI=16696 su siero diluito 1:16.

### **Conclusioni**

Questi dati rendono plausibile che un probabile effetto prozona in FCXM abbia influenzato il risultato del test, mentre il risultato in fase solida ha confermato l'elevato titolo anticorpale, nonostante le diluizioni del siero.

Alla luce dei risultati ottenuti si ritiene utile programmare l'esecuzione dell'FCXM dopo lo studio anticorpale del paziente e dopo l'esecuzione della tipizzazione HLA di ricevente e potenziale donatore, in modo da permettere adeguata pianificazione dei test da eseguire.

Questo approccio potrebbe essere utile per giungere alla corretta interpretazione dei risultati dell'FCXM, nonché alla corretta valutazione del rischio immunologico.

**Abstract Code: AIB18751-66**

## **Introduzione e validazione del sequenziamento di nuova generazione dei geni del sistema HLA mediante piattaforma automatizzata.**

M. Zompa<sup>1</sup>, L. Rocchi<sup>1</sup>, T. Melchiorre<sup>1</sup>, A. Giordano<sup>1</sup>, R. Fiore<sup>1</sup>, D. Bongioanni<sup>1</sup>, E. Navaretti<sup>1</sup>, R. Chidichimo<sup>1</sup>, G.A. Mazzola<sup>1</sup>, F.E. Bertinetto<sup>1</sup>, E. Garino<sup>1</sup>, A. Amoroso<sup>1</sup>

(1) S.C. Immunogenetica e Biologia dei Trapianti Torino

La tipizzazione dei geni HLA riveste un ruolo cruciale nello studio delle risposte immunitarie, delle malattie autoimmuni e in ambito trapiantologico.

Il laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti di Torino utilizza dal 2017 la metodica NGS (Next-Generation Sequencing) per la tipizzazione dei geni HLA (Human Leukocyte Antigens).

Questo studio si focalizza sull'introduzione e la validazione dell'automazione mediante il sistema Biomek 4000 (Beckman Coulter) nelle fasi di preparazione dei campioni e nell'amplificazione di geni HLA con metodica NGS allo scopo di migliorare l'efficienza, la precisione, la riproducibilità, e incrementare la processività.

Sono state allestite 4 mandate di amplificazione con il kit NGSgo-MX6-1 (GenDx). Ogni mandata è composta da 47 campioni di cui 3 a tipizzazione nota in triplo e un controllo negativo (C-). L'avvenuta amplificazione è stata verificata mediante corsa elettroforetica di tutti gli ampliconi su gel di agarosio; inoltre, per ulteriore conferma, è stata misurata la concentrazione mediante Qubit (Invitrogen) del C-, dei 3 campioni a tipizzazione nota in triplo e di un campione scelto casualmente.

I risultati hanno confermato la robustezza e l'affidabilità del protocollo automatizzato: l'amplificazione è infatti stata ottimale per 179/188 campioni (4.8% di fallimenti).

Con l'automazione è stata ottenuta una riduzione dei tempi di lavorazione dell'operatore (10 minuti di lavoro di 1 operatore con lo strumento vs mezz'ora di lavoro di 2 operatori) e la standardizzazione del metodo con minor coinvolgimento del lavoro tecnico del personale non essendo più necessario il controllo di un secondo operatore. Questo ha comportato un grande vantaggio per le restanti attività del laboratorio.

L'introduzione e la validazione del sistema automatizzato per l'analisi NGS dei geni HLA tramite il sistema Biomek 4000 rappresentano un notevole passo avanti nelle realtà di laboratorio con alta processività sia da un punto di vista della tracciabilità, sia nella gestione e manipolazione dei campioni e dei reagenti.

Attualmente il laboratorio si sta occupando della validazione dello strumento Biomek i7 per l'allestimento in automazione delle librerie NGS.

Abstract Code: AIB18752-67

## Monitoraggio del chimerismo post-HSCT attraverso un sistema NGS: validazione ed applicazione alla routine di laboratorio

S. Iozzi<sup>1</sup>, D. Ciappi<sup>1</sup>, S. Palchetti<sup>1</sup>, M.L. Mattei<sup>1</sup>, M. Betti<sup>1</sup>, L. Trentin<sup>2</sup>, E. Durante<sup>2</sup>, G. Rombolà<sup>1</sup>, E. Pelo<sup>1</sup>

(1) SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze, (2) UOC Medicina TrASFusionale, AULSS2 Marca Trevigiana, Treviso

L'analisi molecolare del chimerismo post-trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) viene largamente utilizzata nella pratica di laboratorio per valutare l'attecchimento, per la diagnosi precoce di rigetto e di ricaduta in caso di disordini ematologici maligni. Sebbene l'utilizzo dei marcatori di tipo STR rappresenti la metodologia più comunemente diffusa tra i laboratori, negli ultimi anni il sequenziamento NGS è stato applicato anche al chimerismo ed al rilevamento della MRD, poiché data la sua elevata sensibilità e accuratezza è in grado di rilevare in modo più precoce percentuali di chimerismo misto. Negli ultimi anni è stato introdotto nel nostro centro un kit per lo studio del chimerismo post-HSCT mediante kit NGS (Devyser) in combinazione con sistema MiSeq. Tale sistema rappresenta una soluzione completa per il flusso di lavoro: si basa sul sequenziamento mirato di 24 indel distribuiti lungo il genoma umano e sulla misurazione della loro frequenza allelica, con un software analitico dedicato. Dopo una prima fase di confronto tra le tecniche e dopo aver effettuato una validazione interna su campioni consensus, il sistema NGS ha sostituito il metodo STR nella routine diagnostica del nostro centro. Recentemente è stato condotto uno studio per valutare la riproducibilità dei dati NGS con un lavoro interlaboratorio tra due centri Firenze (FI) e Treviso (TV): sono state analizzate due coppie ricevente-donatore ed un totale di 17 campioni di monitoraggio post-HSCT, in modo indipendente e separato tra i due laboratori, utilizzando lo stesso kit Devyser NGS su diverse piattaforme NGS Illumina. I risultati ottenuti dai due laboratori sulle percentuali di chimerismo dei campioni analizzati sono stati altamente concordanti: elevata concordanza per singolo marcatore, eccetto un solo marcatore (#19) di una coppia con valore p non significativo con un  $R = 0,52$ ; correlazione positiva tra tutti i marcatori informativi analizzati; non rilevata alcuna distorsione relativa al centro che ha eseguito il test (PCA, principal component analysis). Il kit Devyser NGS è in uso presso il nostro centro per l'analisi del chimerismo post-HSCT da gennaio 2019. Sono stati analizzati un totale di 2225 campioni di pazienti post-HSCT: 801 da sangue periferico e 1424 da sangue midollare. In totale, sono state studiate 295 coppie ricevente/donatore. Tutti mostrano >2 marcatori informativi, tranne 10 casi (correlati) con solo 2 marcatori informativi e un caso con un solo marcatore informativo. La media dei marcatori informativi è più alta nei pazienti che ricevono un donatore non consanguineo (9 marcatori) rispetto ai pazienti con un donatore consanguineo (5 marcatori). Data l'elevata sensibilità del metodo NGS, si prevede l'applicazione su popolazioni cellulari selezionate, per una stratificazione del rischio di ricaduta e per consentire di anticipare l'eventuale intervento terapeutico.



Abstract Code: AIB18754-69

## Trasmissione intrauterina dell'infezione da Citomegalovirus (CMV): coinvolgimento dell'interazione tra recettori KIR e molecole HLA

A. Pasi<sup>1</sup>, C. Fornara<sup>2</sup>, R. Cacciatore<sup>1</sup>, I. Sbarsi<sup>1</sup>, L. Chiesa<sup>1</sup>, C.T. Prezioso<sup>1</sup>, C. Radaelli<sup>1</sup>, P. Bergamaschi<sup>1</sup>, M. Furione<sup>3</sup>, A. Arossa<sup>4</sup>, P. D'angelo<sup>3</sup>, F. Baldanti<sup>5</sup>, A. Spinillo<sup>6</sup>, C. Perotti<sup>1</sup>, D. Lillieri<sup>2</sup>

(1) Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (2) Servizio di Medicina di Laboratorio, Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Pavia, (3) Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (4) Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (5) Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia & Dipartimento di Scienze clinico-chirurgiche, diagnostiche e pediatriche, Università degli Studi di Pavia, (6) Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia & Dipartimento di Scienze clinico-chirurgiche, diagnostiche e pediatriche, Università degli Studi di Pavia

Citomegalovirus (CMV) causa la più comune infezione virale congenita, che può determinare sordità e ritardo dello sviluppo neurologico. La risposta immunitaria materna ha un ruolo importante nel prevenire la trasmissione transplacentare del virus, il cui rischio diminuisce in caso di una precedente esposizione. L'impatto clinico è maggiore nelle prime 14 settimane, quando il sistema immunitario fetale è ancora in fase di sviluppo. L'esito clinico è il risultato di un processo multifattoriale comprendente fattori materni, placentari, fetali. Il trofoblasto extravillioso esprime HLA-C, HLA-E e HLA-G che interagiscono con i KIR delle cellule NK deciduali e il complesso cross-talk immunitario materno-fetale crea una nicchia tollerogenica per il normale sviluppo del feto. Il ruolo dei recettori KIR e delle molecole HLA all'interfaccia materno-fetale è stato dimostrato in complicanze della gravidanza quali la preeclampsia ma non nella trasmissione di CMV. Abbiamo tipizzato 54 madri CMV+ e 35 feti mediante PCR-SSO e PCR-SSP: 21/54 con trasmissione dell'infezione (T) e 33/54 senza (NT). La combinazione KIR3DL1+A+B-Bw4 caratterizza le madri T (75% vs 45,16%,  $p=0.04$ , OR=3.6). Viceversa, l'assenza di KIR3DL1+B-Bw4 è maggiore tra le madri NT (67,74% vs 35%,  $p=0.04$  OR=3.9). Anche se non significativamente, il genotipo AA è maggiormente presente tra le madri T (55,56%) mentre Bx è più frequente tra le madri NT (64,44%) ( $p=0.28$ ). Abbiamo inoltre rilevato un aumento di KIR2DL1 materno + C2 del feto tra le madri T (85,7% vs 66,67%  $p=0.26$ ). In particolare, confrontando due gemelli (1 T e 1 NT) abbiamo osservato che l'interazione KIR materno-HLA-C2 feto caratterizza il gemello con trasmissione verticale (tab 1). Si ipotizza che l'inibizione delle NK materne favorisca la trasmissione verticale del CMV e che ci sia un ruolo anche per l'interazione KIR:HLA-C, notoriamente coinvolta nella corretta placentazione. In futuro, sarà interessante indagare, in un set più ampio, anche le molecole HLA-G ed -E oltre ai recettori MICA/B materni, già noti per il loro coinvolgimento nell'infezione.

Tab 1

		C1/C2	BW4/ W6	A-BW4	A3/11	2DL1 + C2 feto	2DL2 + C1 feto	2DL3 + C1 feto	2DS1 + C2 feto	2DS5 + C2 feto		CEN MOTIV	TEL MOTIV
GEMELLO 1	<b>T*</b>	C1/C2	W6/W6	AW4	0	1	0	1	1	1			
MADRE		C1/C2	w6/w4	AW4	0						AB	CENA/ CENA	TELA/ TELB1
GEMELLO 2	<b>NT**</b>	C1/C1	w6/w4	AW4/ AW4	0	0	0	1	0	0			

\*T= presenza di trasmissione verticale del CMV

\*\*NT= assenza di trasmissione verticale del CMV

## Reclutamento dei potenziali donatori di CSE e tipizzazione HLA: quali strategie?

Nadia Ceschini, Anna Stanizzi, Angelica Moro, Paola Boccagni

U.O. Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale dell'Ospedale Santa Chiara di Trento

**Premessa:** il CDTN01 nasce nel dicembre 1992, nell'U.O. di Immunoematologia e Trasfusionale dell'Ospedale Santa Chiara di Trento. Negli anni è cresciuta una sinergia con ADMO che si è concretizzata nel 2011 in una convenzione fra ADMO e APSS per l'integrazione delle attività: ADMO sensibilizza la popolazione sul tema della donazione con incontri sul territorio e il team del laboratorio segue il donatore dalla tipizzazione alla donazione effettiva.

**Metodi:** al CDTN01 afferiscono i potenziali donatori programmati con appuntamento. Il medico trasfusionista fornisce una corretta descrizione del percorso di donazione, valuta l'anamnesi. A seguito dell'idoneità viene eseguito il prelievo di sangue per la tipizzazione HLA. Nel laboratorio operano un medico, un biologo e un borsista biologo. Le tipizzazioni sono eseguite in PCR-SSO Mr Spot. Una parte delle tipizzazioni è delegata al Laboratorio di GE01. In caso di compatibilità il CDTN01 si occupa dell'invio campione, del Work Up, della somministrazione del G-CSF e del follow up del donatore. La donazione di Midollo Osseo e PBSC viene eseguita presso il Centro di Verona Borgo Roma.

**Risultati:** Dal 2019 si è assistito ad un incremento progressivo di potenziali donatori da 700 annui nel 2019 a 882 nel 2022, con un indice di reclutamento (IR) su 10000 abitanti che è cresciuto da 67 a 82 nell'arco di 4 anni, a fronte di una riduzione dell'IR italiano da 36 a 26 nel medesimo intervallo temporale. Al 28/08/2023 sono stati prelevati 783 donatori. Le donazioni effettive nel 2023 sono 9, di cui 1 da midollo osseo e 8 da PBSC. La popolazione dei potenziali donatori di CSE di CDTN01 è di 11228 donatori.

Negli anni abbiamo assistito ad un incremento nel numero dei donatori richiamati per Work Up, che solo in parte, però, sono giunti all'effettiva donazione per sospensione del processo da parte dei Centri Trapianti.

La tabella rappresenta l'attività di CDTN01 dal 2019 al 28/08/2023.

ANNO	TIPIZZATI CDTN01	IR	IR italiano	TEST DI CONFERMA	WorkUp	Donazioni Effettive sospese CT	Donatori effettivi
2019	700	67	36	18	5	0	7
2020	701	67	19	32	16	1	12
2021	729	76	22	28	18	2	16
2022	882	82	26	50	25	4	22
28-08-2023	783			22	12	5	9

**Conclusioni:** la sinergia con ADMO, che sul territorio si occupa della sensibilizzazione dei potenziali donatori, e le strategie di accoglienza degli stessi presso il Laboratorio da parte di personale qualificato aiutano ad accrescere la motivazione dei donatori e questo ci ha permesso di conseguire il notevole incremento dei potenziali donatori tipizzati dell'ultimo quinquennio, che IBMDR ci ha riconosciuto per 2 anni consecutivi.

La numerosità dei nuovi donatori tipizzati ha permesso di individuare e identificare 8 nuovi alleli (2 nel 2020, 1 nel 2021, 4 nel 2022 e 1 nel 2023) nelle tipizzazioni in NGS eseguite a GE01.

I risultati ottenuti ci spingono a ricercare nuove strategie organizzative per la tipizzazione dei nuovi donatori attraverso un upgrade tecnologico con la Next Generation Sequencing e l'inserimento nel CDTN01 di nuovo personale.

**XXIX**  
**Congresso**  
**Nazionale**  
**AIBT**  
Associazione Italiana  
di Immunogenetica  
e Biologia dei Trapianti

 **PLANNING**