

GDL AIBT 2024 –

FCXM e Luminex

- *Raccolta dati: Silvia Giuliadori, Antonina Piazza*
- *Analisi Dati: Carla Cervelli, Silvia Giuliadori, Elvira Pog*
- *Responsabile Scientifico: Antonina Piazza*

Finalità

- ✓ Confrontare risultati FCXMs (QC-ISS 2024: 10 sieri/6 cellule), eseguiti con tecnica in house e/o tecnica standardizzata (protocollo GDL), al fine di valutarne la variabilità intra*- e inter-laboratorio.
- ✓ Analizzare correlazione tra valori di MFI degli anti-HLA Luminex (cellula specifici) e positività dei cross-match (FCXM e CDCXM).
- ✓ Gli anti-HLA Luminex utilizzati come set di validazione del modello di correlazione tra piattaforme/verifica della validità del modello per assegnazione specificità (GDL-Luminex 2023).

** Variabilità intra Lab = difficile valutazione (solo 4 Lab esecuzione FCXM con due protocolli (in house e GDL))*

GDL = 14 Laboratori

Bari

donata.mininni@policlinico.ba.it

Bologna

silvia.manfroi@aosp.bo.it

Cagliari

sara.lai@aslcagliari.it

L'Aquila

ccervelli@asl1abruzzo.it; fpapola@asl1abruzzo.it

Milano

elena.longhi@policlinico.mi.it

Napoli

direzione.immunoematologia@unicampania.it

Padova*

mariapaola.albergoni@aopd.veneto.it

Palermo

v.cappuzzo@villasofia.it

Parma

giovanni.rombola@ao.pr.it; sguliodori@ao.pr.it

Pisa

m.curcio@ao-pisa.toscana.it

Reggio Calabria

laboratorio.hla@ospedaleirc.it

Roma CRT

labrtl@scamilloforlanini.rm.it; elvira.poggi@cnr.it

Roma OPBG

marco.andreani@opbg.net

Torino*

cristiana.caorsi@unito.it

** Non eseguono CDC-XM*

Protocollo FCXM Standardizzato ⁽¹⁾

SIERO:

- **Centrifugare e/o filtrare** (pori 0,22 μm , $\varnothing$ 13 mm) **tutti i sieri**
- **Non scomplementare i sieri**, compresi i controlli (aumento del background)
- Eseguire il **test in duplicato su tutti i sieri**, compresi i controlli
- Utilizzare siero corrente e storico, se disponibile

CELLULE:

- **Utilizzare linfociti separati** (gradiente di densità/biglie a separazione negativa)
- **Valutare sempre la vitalità cellulare** (ottimale mediante 7-AAD)

RAPPORTO SIERO/CELLULE:

- **Utilizzare 2000-5000 cellule per ogni microlitro di siero concentrate in un piccolo volume**, al massimo uguale a quello del siero (diluizione del siero). (es. rapporto siero/cellule: 25 μl di siero + 12,5 μl di sospensione cellulare ad concentrazione di 10x10⁶ per ml)

Protocollo FCXM Standardizzato ^(III)

TEMPI/TEMPERATURE DI INCUBAZIONE:

- **1^a incubazione** (siero/cellule): **20 minuti a RT** (a 4°C incubare per 30 minuti)
- **2^a incubazione** (MoAb+Anti human IgG/IgM): **15-20 minuti a 4°C al buio** (tempi inferiori non ottimali per MoAb)

Le incubazioni dovrebbero essere eseguite in leggera agitazione

MoAB: anti-CD3 e anti-CD19 (o CD20), non superare i quantitativi suggeriti dalla ditta produttrice; in letteratura utilizzati 2 o 3 µl per test

ANTI-HUMAN IgG (IgM): Anti-Ig (G o M) debbono essere F(ab')₂, utilizzate dopo titolazione (ripetere al cambio lotto)

CUT-OFF POSITIVA' PER LINFOCITI T E B: Definito preliminarmente (multipli incroci sieri/cellule, analisi in una singola seduta (rivalutare al cambio lotto del CNEG).

Non superare le 2 DS (sia per T che per B)

Non aggiornare con i valori delle singole sedute di lavoro

Cutoff di Positività e MCS

- ✓ Cutoff di positività: deve essere definito prima dell'utilizzo della metodica nella routine del Lab., mediante multipli incroci sieri (negativi)/cellule (vitalità >95%) analizzati in una singola seduta
- ✓ Deve essere rivalutato (con minor numero di cellule) al cambio lotto del C-Neg (del commercio o «in house»)
- ✓ Non può essere aggiornato con i valori delle singole sedute di lavoro
- ✓ Dai risultati si evince:
 - Presenza di **cutoff molti bassi**, soprattutto dei B ma anche T (es. $T=11/B=9$, $T=10/B=33$)
 - **Non corretta valutazione del MCS (Median Channel Shift).**

$MCS = MFI \text{ del siero in esame} - MFI \text{ del Controllo Negativo.}$

$FCXM \text{ Pos } (T \text{ e/o } B) = MCS > \text{del cutoff } (T \text{ e/o } B)$

Form Risultati ⁽¹⁾

Laboratorio:		
Responsabile/Referente:		
FCXM cellula/ siero n°		
Domande	Risposte	
	Protocollo in house	Protocollo GDL
Siero centrifugato e/o filtrato; scomplementato	Tutti centrifugato (4/14 anche filtrato)	
Cellule separate mediante gradiente di densità o CPT o biglie a selezione negativa	10/14 gradiente; 4/14 selezione negativa	
Rapporto cellule/siero indicare quante cellule sono utilizzate per µl di siero	2.500-5.000=11 Lab.; 6.000 =1 Lab; 10.000=2 Lab	
1 ^a incubazione (cellule/siero) indicare durata (min.) e temperatura (R.T o 4°C)	20min/RT (o 30min/4°C)=5 Lab; 30min/RT=9 Lab	
MoAb per T e B indicare µl di MoAb utilizzati per ogni singolo te	0,5+1=1 Lab; 1=1 Lab; 1,6=3 Lab; 2,5-3=6 Lab.; 4+2=2 Lab; 10= 1 Lab	
Anti-Human IgG/IgM: indicare µl di anti IgG/IgM utilizzati per singolo	0,5=1 Lab; 1=2 Lab; 2-2,5=5 Lab.; 4-5=3 Lab; 10=2 Lab;?=1 Lab	
2 ^a incubazione (MoAb+anti Ig): indicare durata (min.) e temperatura (R.T o 4°C)	10min/RT=2 Lab; 20min/4°C=5 Lab; 30min/4°C=7 Lab	
Cutoff positività: indicare, per linfociti T e B, il cutoff utilizzato (2DS o 3DS) ed a quanti canali corrisponde. es. T (2DS o 3DS) = +40 canali; B (2DS o 3DS) = +80 canali.	2DS (T e B)=11 Lab; 2DS per T, 3DS per B=3 Lab	
Risultato FCXM IgG: Negativo o Positivo per linfociti T e B	A volte riportato un solo Pos; (a volte non riportato)	
Risultato FCXM IgM (se eseguito): Negativo o Positivo per linfociti T		

Form Risultati ^(III)

Domande	Risposte (Protoc. in house)				Risposte (Protoc. suggerito da GDL)			
	MFI - T	MFI - B	MCS - T	MCS - B	MFI - T	MFI - B	MCS - T	MCS - B
Controllo Negativo: indicare valori MFI per linfociti T e B Controllo Positivo: indicare valori MFI e MCS (dal controllo negativo) per linfociti T e B FCXM IgG: indicare valori MFI e MCS (dal controllo negativo) per linfociti T e B FCXM IgM (se eseguito): indicare valori MFI e MCS (dal controllo negativo) per linfociti T			/	/			/	/
	- In alcuni casi è stato necessario ricalcolare il MCS del siero in esame (non corretto quello riportato) - Conseguentemente, a volte, il risultato dell'FCXM, da noi calcolato dopo correzione del MCS, non concordava con quello riportato							
	/			/		/		/

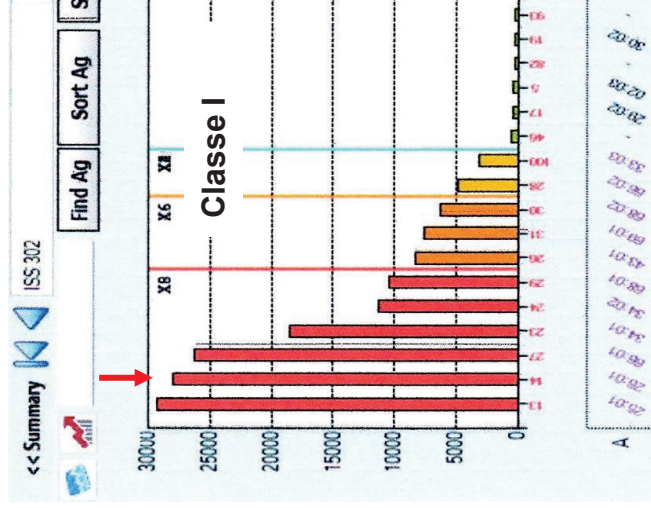
FCXM, CDCXM e anti-HLA Luminox⁽¹⁾

- ✓ Eseguiti in totale 20 XM (tecniche di FC e CDC) sui campioni del QC-ISS. In particolare:
 - 2 cellule (A e B) testate con 4 sieri (302, 303, 304, 305)
 - 2 cellule (C e D) testate con 3 sieri (306, 307, 308)
 - 2 cellule (E e F) testate con 3 sieri (309, 310, 311)
- ✓ Lo studio dei sieri è stato effettuato mediante Luminox Single Antigen Beads Classe I e II (One Lambda e/o Immucor). In particolare si evidenzia:
 - Siero 304 e 311 negativi per la presenza di anti-HLA sia di classe I che II;
 - Sieri 303 e 307 (sieri molto forti) hanno determinato FCXM e CDCXM positivi sia T che B

XM Cellula A-Siero 302

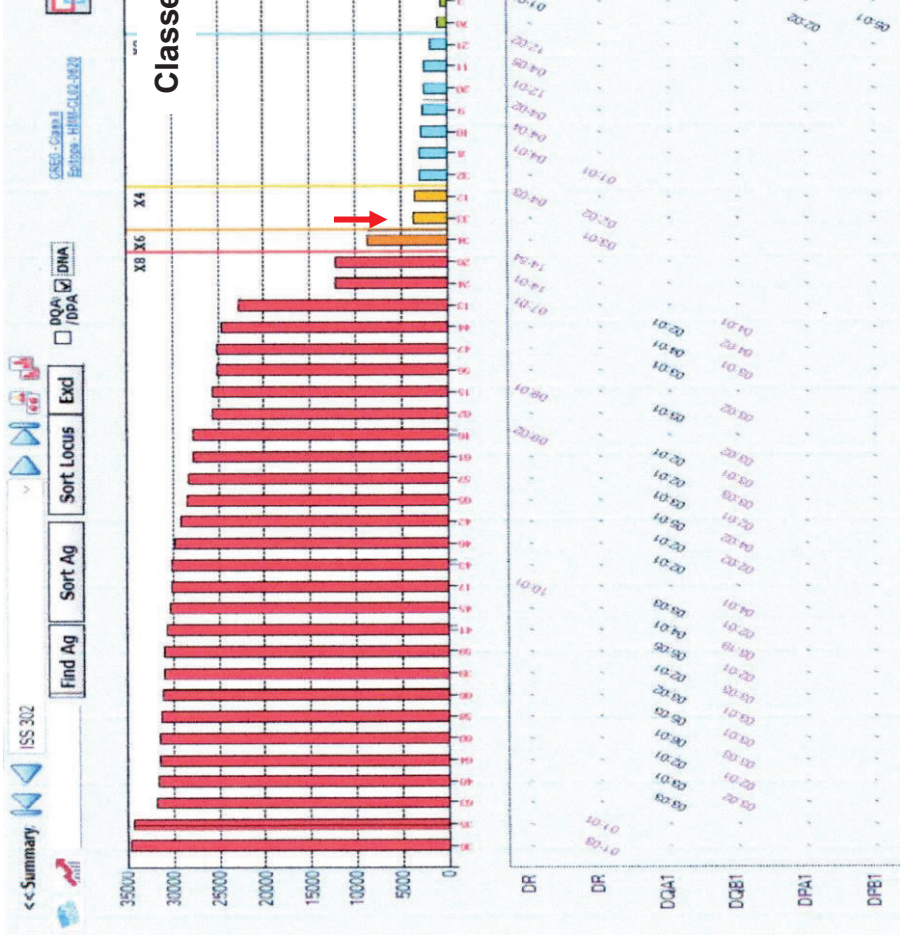
Luminex SAB-Siero 302:

Anti-HLA specifici per cell. A: **A*26:01** (MFI: OL = 24.000, IMM = 16.000), **DRB3*02:02** (MFI: OL = 3.500, IMM = 5.000)



-XM: **T Neg/B Pos** (1/12 Lab: T Pos/B Pos)

KM: T Pos/B Pos (per tutti)



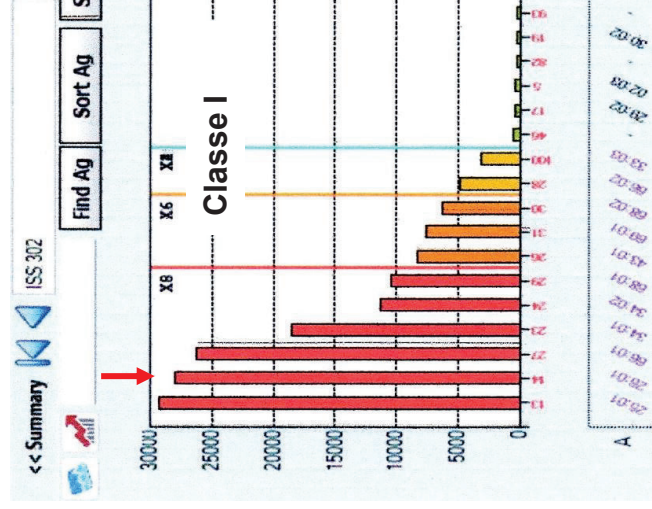
CXM su T non evidenzia anti-HLA con MFI > 16.000

Bassa espressione di A26?

XM Cellula B-Siero 302

uminex SAB-Siero 302:

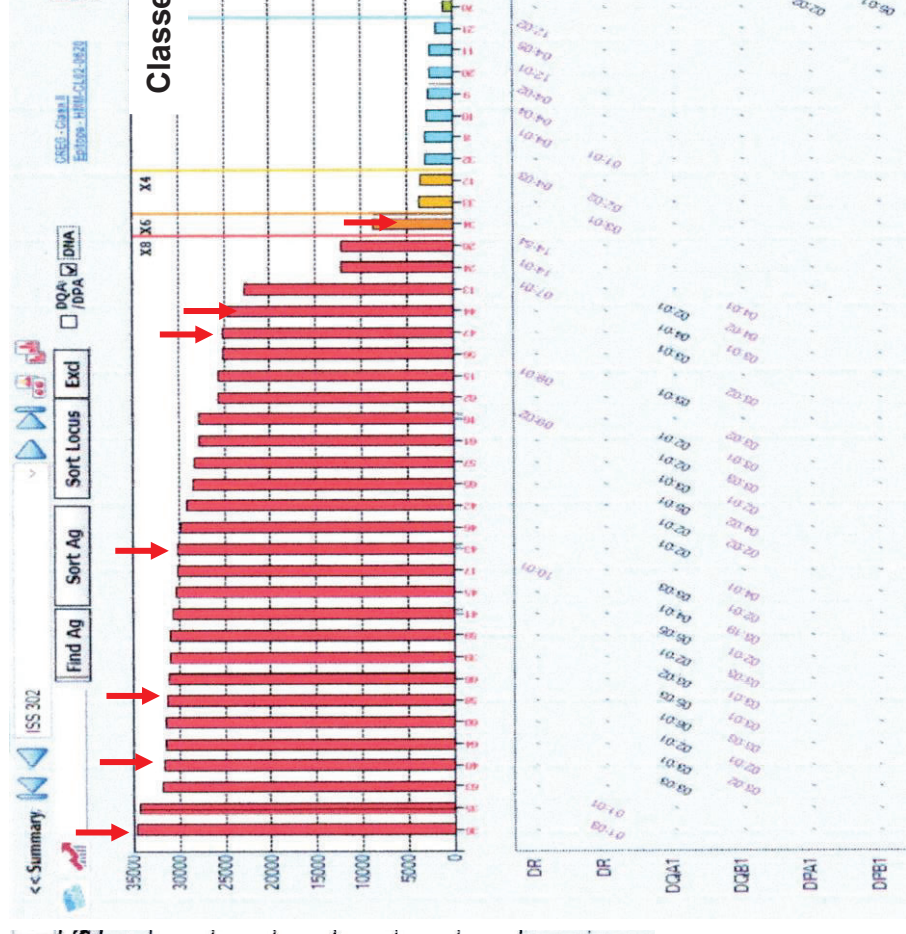
anti-HLA specifici per cell. B: **A*26:01** (MFI: OL = 24.000, IMM = 16.000), **DRB1*07:01** (MFI: OL e IMM = 20.000), **DRB3*02:02** (MFI: IMM = 4.000), **DRB4*01:01** (MFI: OL = 29.000, IMM = 20.000), **DQA1*02:01** (MFI: OL e IMM = 25.000), **DQB1*02:02** (MFI: OL= coperto e IMM = 20.000)



DC-XM: **T ND/B Pos** (9 Lab: T Pos/B Pos,

3 Lab T Neg/B Pos)

C-XM: T Pos/B Pos (per tutti)



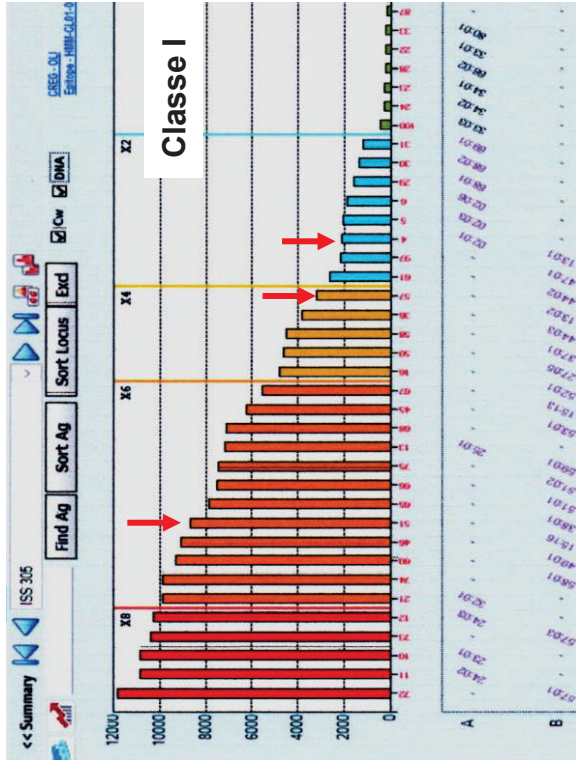
2 (75%) CDCXM T evidenziano anti-HLA con MFI > 16.000

giore espressione di A26 su cellula B rispetto a cellula A?

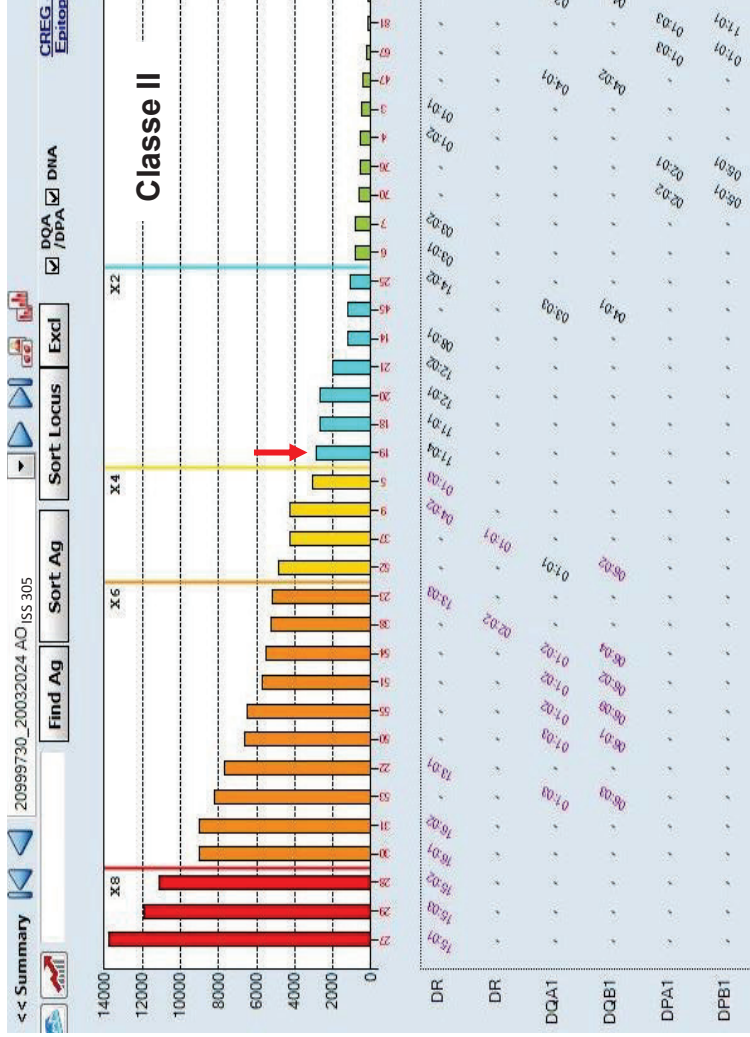
XM Cellula A-Siero 305

uminex SAB-Siero 305:

anti-HLA specifici per cell. A: **A*02:01** (OL=2.000, IMM=1.000), **B*38:01** (OL=8.000, IMM=4.000), **B*44:02** (OL=3.000, IMM=2.500),
 DRB1*11:03 (OL=no bed, IMM=4.000), **DRB1*11:04** (OL=4.000, IMM=3.500)



CDC-XM: **T Neg/B ND** (9 Lab: Neg/Neg; 3/12 Lab: T Neg/B Pos)
 CDC-XM: **T Pos/B Pos** (per tutti tranne 1 Lab: T Neg/B Pos)

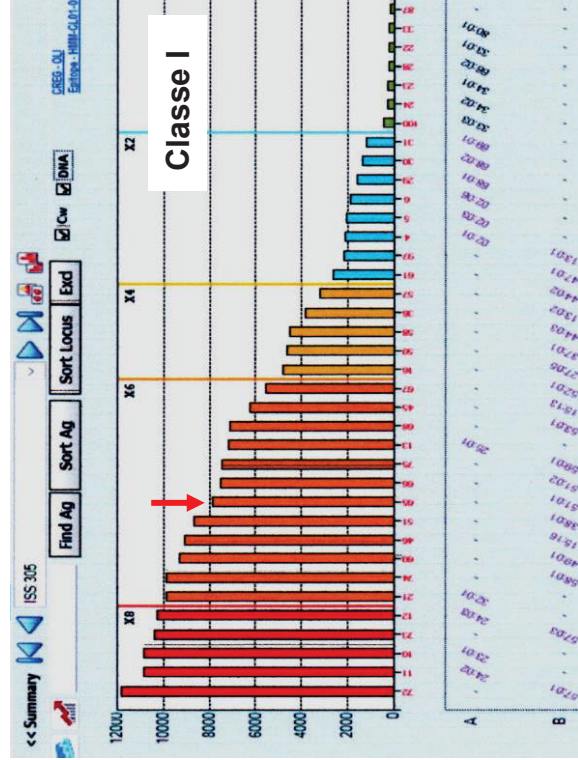


3/12 (25%) CDC-XM B evidenziano anti-HLA Classe I (somma MFI: 13.000/7.5000)
e/o anti Classe II (MFI: 4.000/7.500)

XM Cellula B-Siero 305

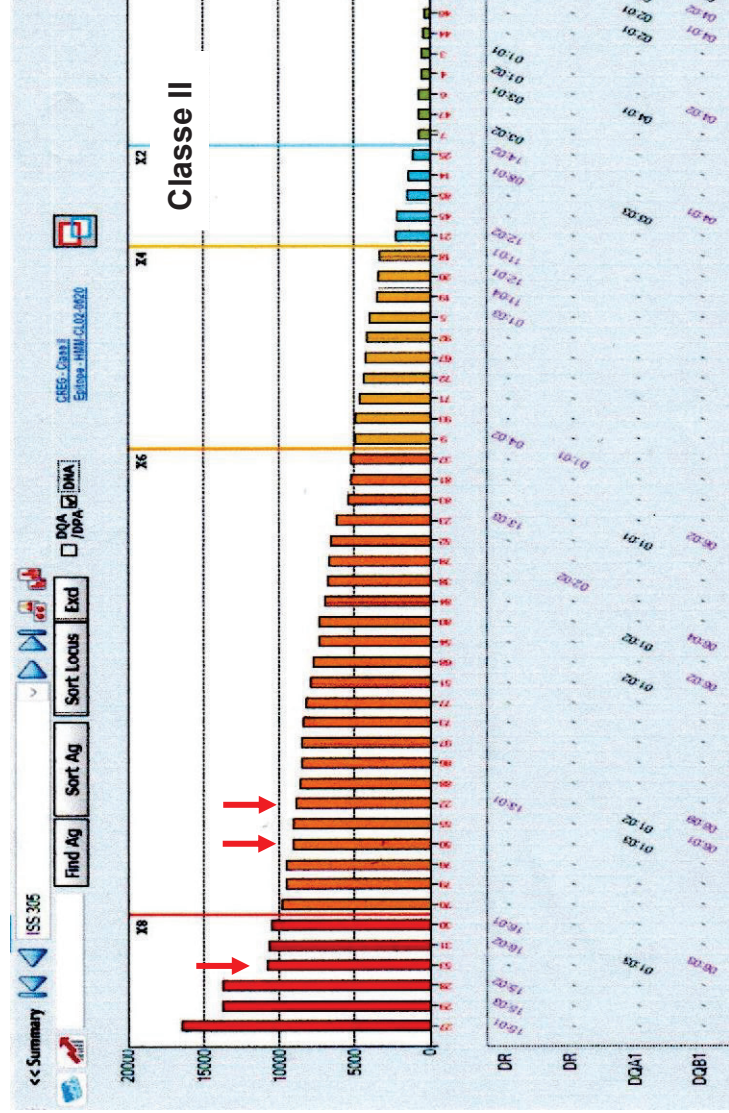
uminex SAB-Siero 305:

anti-HLA specifici per cell. B: **B*51:01** (OL=7.500, IMM =3.300), **DRB1*13:01** (OL=9.500, IMM =6.000), **DQA1*01:03** (OL=10.000, IMM =8.000, copre **DQB1*06:03**)



CDC-XM: **T Neg/B Neg** (1 Lab Neg/Pos)

C-XM: **T Pos/B Pos** (1 Lab Neg/Pos)

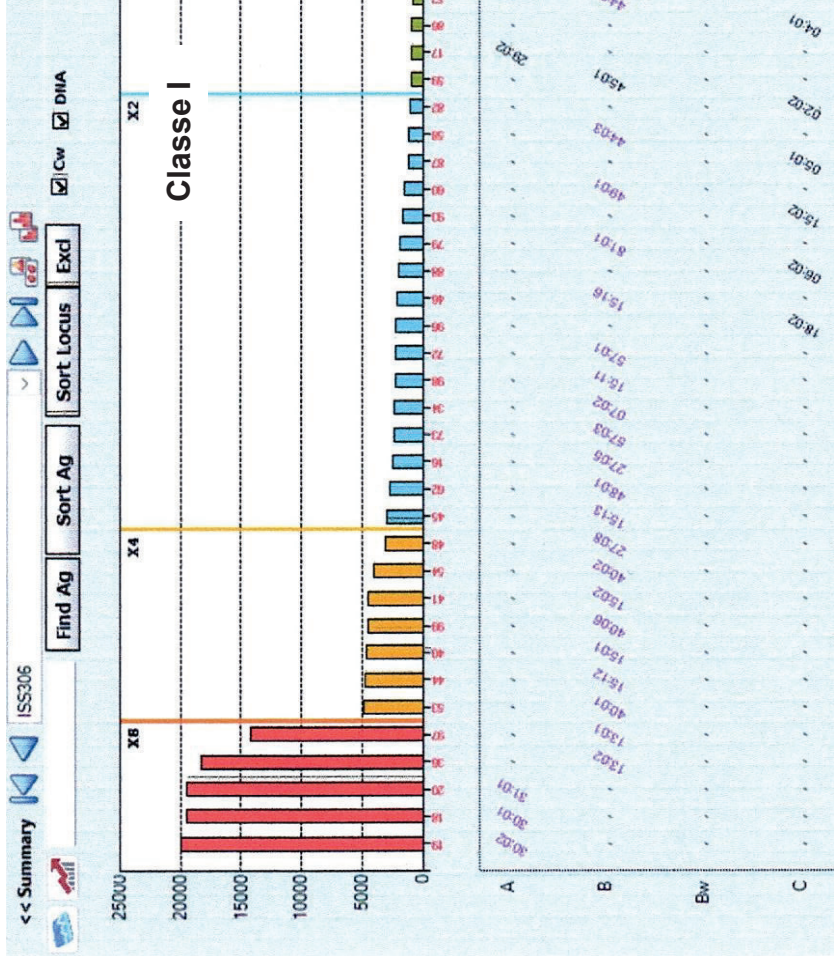


CDC-XM T e/o B non evidenza anti-HLA Classe I (7.500/3.300) e II (somma =19.000/14.000)

XM Cellula C-Siero 306

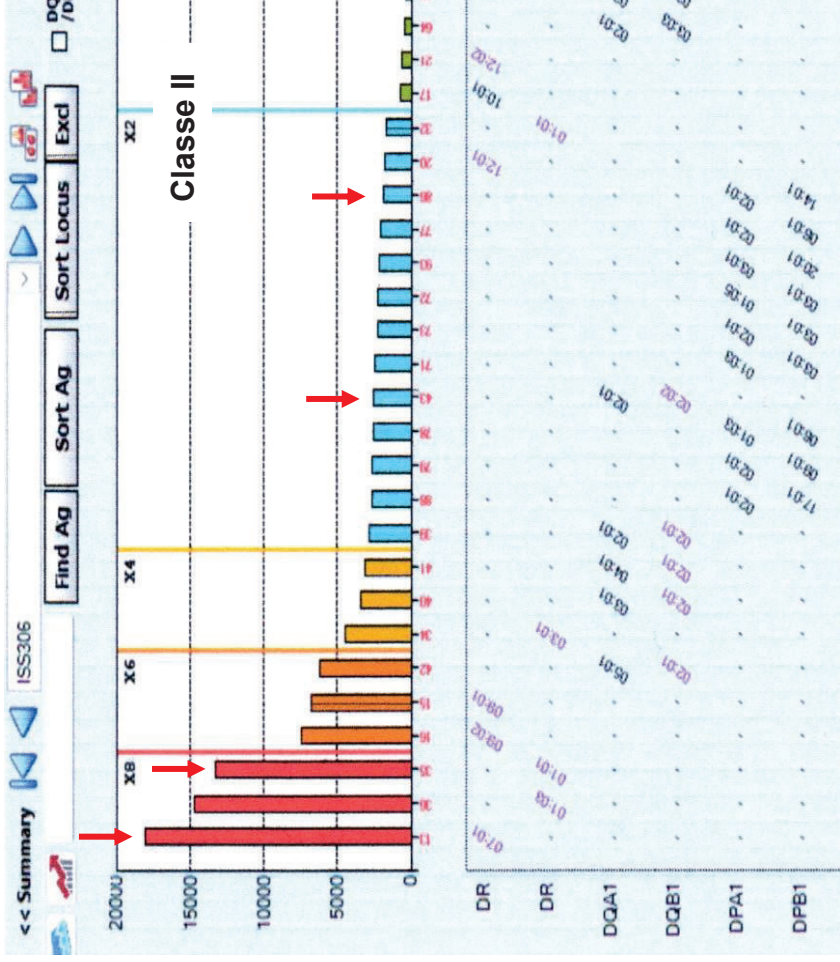
-uminex SAB-Siero 306:

Anti-HLA specifici per cell. C: **DRB1*07:01** (OL=18.000, IMM=12.000), **DRB4*01:01** (OL=13.000, IMM=6.000), **DQB1*02:02** (OL=3.000, IMM=1.000), **DPB1*14:01** (OL=2.000, IMM =700)



CDC-XM: T Neg/**B Neg** (1 Lab: Neg/Pos)

FC-XM: T Neg/B Pos (per tutti)



CDC-XM B non evidenza anti-HLA classe II

(somma = 36.000/19.700)

uminox SAB-Siero 306:

The screenshot shows the ISS306 software interface. On the left, there is a navigation bar with buttons for '<< Summary', a blue arrow, 'Find Ag', 'Sort Ag', 'Sort Locus', 'Exd', and checkboxes for 'Cw' and 'DHA'. The main area displays a bar chart titled 'Classe I'. The y-axis represents a numerical value from 0 to 25000. The x-axis shows three data series: X2 (blue bars), X4 (yellow bars), and X8 (red bars). A red arrow points to the X8 series. On the right, there is a list of values, likely representing a sequence or a set of data points, with some values highlighted in pink.



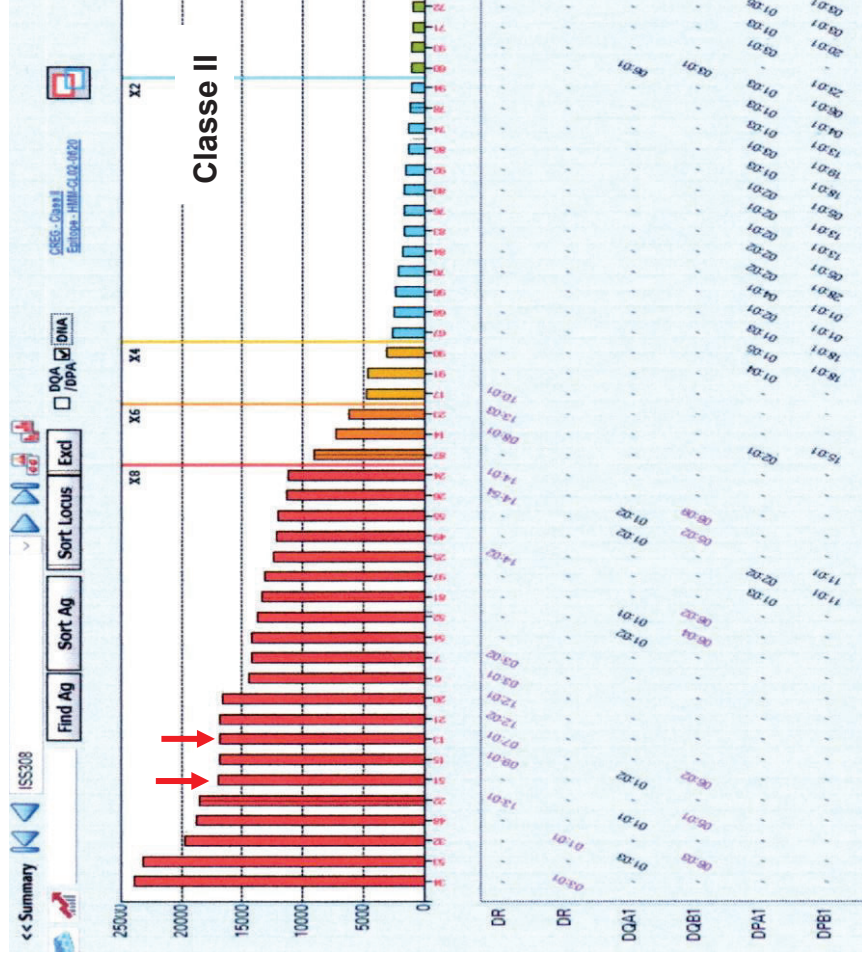
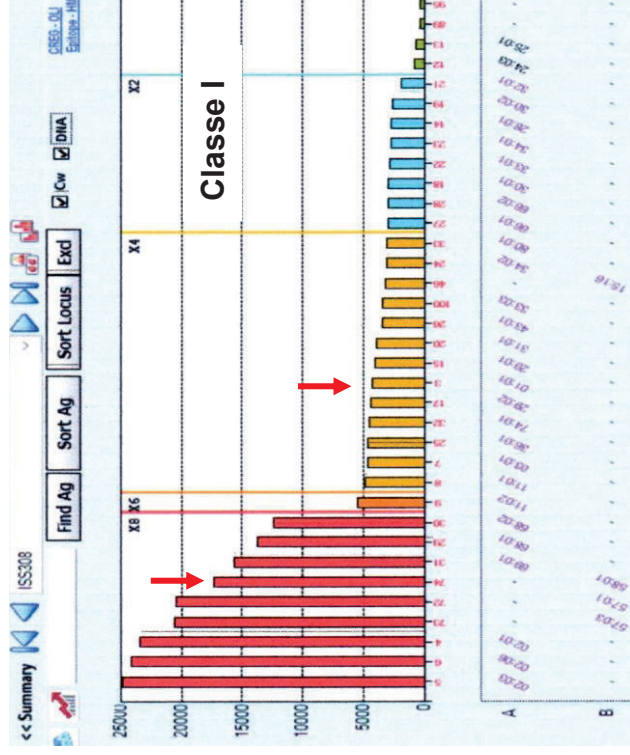
FC-XM: T Pos/B Pos (per tutti)

anti-HLA classe I (somma = 20.000/5.500)

XM Cellula C-Siero 308

Luminex SAB-Siero 308:

Anti-HLA specifici per cell. C: **A*01:01** (OL=4.000, IMM=1.000), **B*58:01** (OL=17.000, IMM 7.500), **DRB1*07:01** (OL=17.000, IMM =12.000), **DQB1*06:02** (OL~16.000, IMM=6.500)



CDC-XM: **T Neg/B Pos** (2/12 Lab: Neg/Neg)

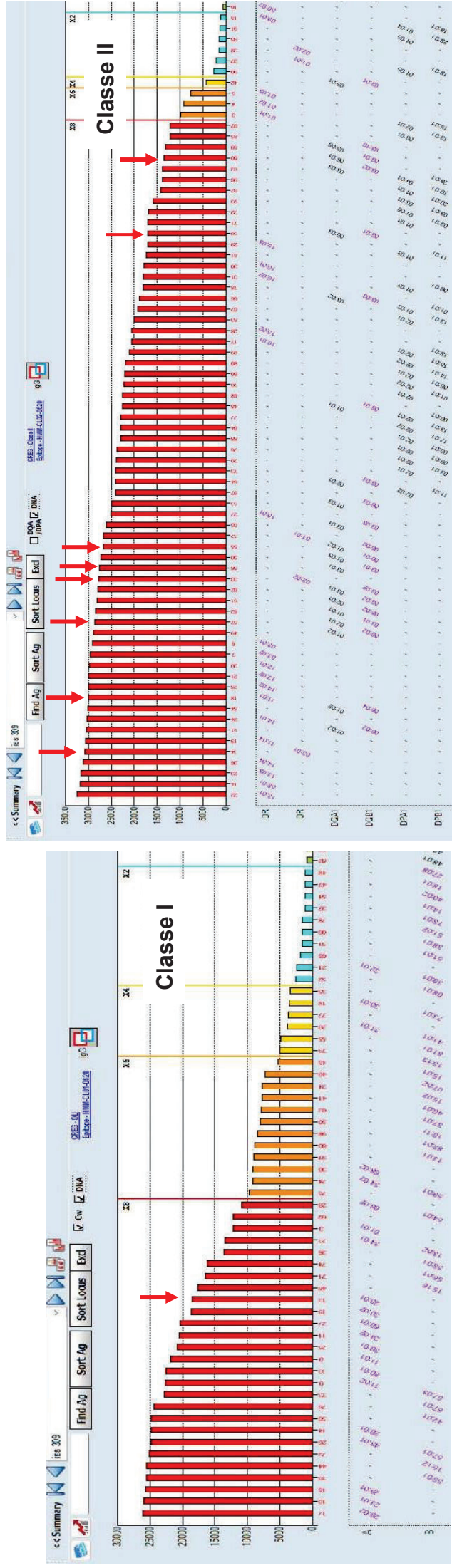
FC-XM: **T Pos/B Pos** (per tutti)

10/12 (83%) CDC-XM T non evidenzia anti-HLA Classe I (somma 21.000/8.500)

XM Cellula E-Siero 309

Luminex SAB-Siero 309:

Anti-HLA specifici per cell. E: **A*30:02** (OL=16.000, IMM=no bead), **DRB1*11:01** (OL=23.000, IMM=20.000), **DRB3*02:02** (OL=23.500, IMM=20.000), **DRB3*03:01** (OL=26.000, IMM=20.000), **DQB1*03:01** (OL=23.000, IMM=18.000), **DQB1*06:09** (OL=24.000, IMM=no bead)



CDC-XM: **T Neg/B Pos** (1 Lab: Pos/Pos)

FC-XM: **T Pos/B Pos** (per tutti)

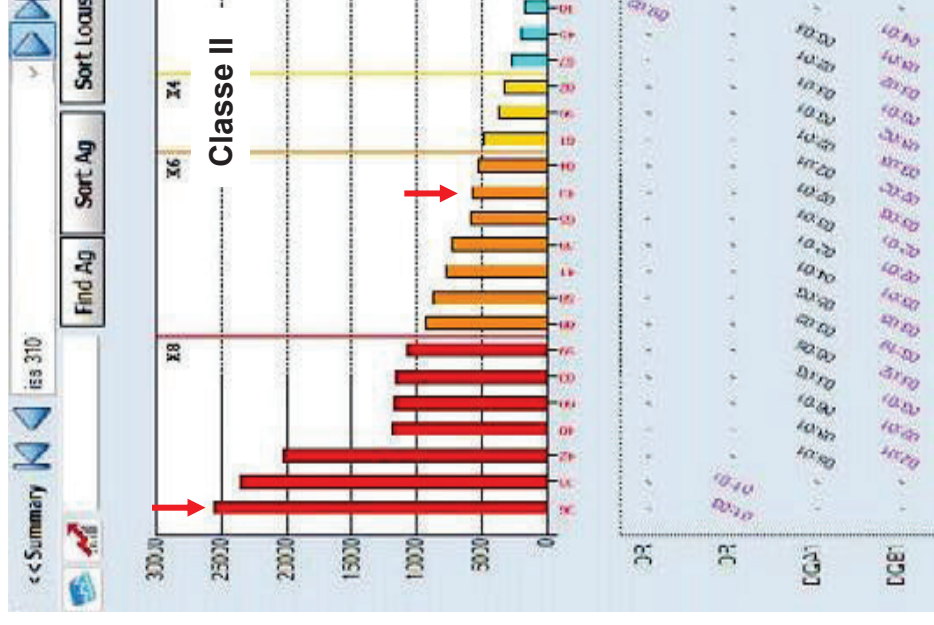
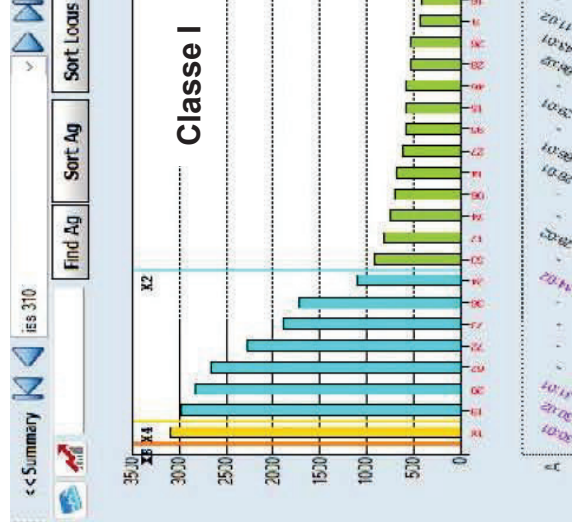
11/12 (92%) CDC-XM T non evidenziano anti-HLA Classe I (OL 16.000/Imm no bead)

8/14 (57%) FC-XM B evidenziano anti-HLA Classe I e/o II (somma OL 21.000/Imm no beads)

XM Cellula F-Siero 310

Luminex SAB-Siero 310:

Anti-HLA specifici per cell. F: **DRB1* 04:05** (OL=no bead, IMM=640), **DRB4*01:03** (OL=22.000, IMM=no bead), **DQB1*02:02** (OL=5.000, IMM=1.600)



CDC-XM: T Neg/B ND (per tutti)

FC-XM: T Neg/B ND (5 * /14 Lab: T Neg/B Pos)

*1/5 Luminex Immucor

5/14 (38%) FC-XM B evidenziano anti-HLA Classe II (OL somma 27.000/Imm 2.000)

Considerazioni: CDC-XM vs FC-XM

CDC-XM:

- Affidabilità del risultato dipendente dalla vitalità cellulare
- Identifica solo anticorpi fissanti il complemento
- Scarsa sensibilità
- Lunghi tempi di esecuzione (~ 3 ore)
- Soggettiva interpretazione del risultato (dipendente da "expertise" dell'analizzatore)
- Scarsissima correlazione con MFI degli anti-HLA rilevati da Luminex-SAB
- Elevata incidenza di risultati falsamente positivi/negativi

FC-XM:

- Affidabilità del risultato scarsamente dipendente dalla vitalità delle cellule (aumento background)
- Identifica anticorpi fissanti o no il complemento
- Elevata sensibilità
- Tempi di esecuzione brevi (~ 1,5 ore in piastra)
- Obiettiva interpretazione del risultato (valutazione del MCS del siero rispetto al NC)
- Buona correlazione con MFI degli anti-HLA rilevati da Luminex-SAB
- Bassa incidenza di risultati falsamente positivi/negativi

Considerazioni: Alleli HLA e Luminex SAB

Non tutti gli alleli HLA sono rappresentati sulle SAB (Luminex)!!!

Alleli HLA non presenti sulle biglie (14/156 =9%) ma presenti sulle cellule degli XMs esaminati

A	B	C	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPB1
*01:03	*07:06	*02:08	*04:05	/	*01:03	/	*03:03	*06:09	*104:01
*30:02	*07:18	*11:03					*05:05		*105:01
*30:03	*15:05	*13:02							

OL IMM OL+IMM

Importante l’analisi per epitopi degli anti-HLA evidenziati !!

Name	Description	Evidence	Esposition	Status	Str. eplet	Frequency	3D View (Luminex® Alleles)
56R	56R	A2	High	Confirmed		View	A*30:01, A*30:02, A*31:01
76EG	76E79G	B	High	Confirmed		View	A*30:02
87Y	87Y	B	Intermediate	Confirmed		View	DQB1*05:01 DQB1*05:02 DQB1*5:03 DQB1*06:04 DQB1*06:09

Considerazioni: Tecnica FCXM

- ✓ Preferire l'utilizzo tecnica condivisa dalla maggior parte dei laboratori (maggiore omogeneità inter-laboratori dei risultati);
- ✓ Attenzione ai punti critici della tecnica:
 - Rapporto siero/cellule
 - Test in duplicato
 - Valutazione vitalità cellulare
 - Tempi e temperature di incubazione (eseguita in leggera agitazione)
 - MoAb e Ig utilizzati in quantitativi idonei
 - Attenta valutazione del cut-off di positività (non superare le 2SD, deve essere coerente al tipo di cellula esame cioè cut-off B maggiore di T)
 - Corretta valutazione del MCS

Reducing number of laboratories performing complement dependent cytotoxicity crossmatching: Reasons and conclusions

Prabhakar Putheti ^{a,b,*}, Robert S. Liwski ^c, Peter T. Jindra ^d

^a Immunogenetics and Transplantation Center, The Rogosin Institute, 430E, 71st Street, New York, NY 10021, USA

^b Division of Nephrology and Hypertension, Joan and Sanford I. Weill Department of Medicine, New York Presbyterian-Weill Cornell Medicine, 1300 York Avenue, New York, NY 10065, USA

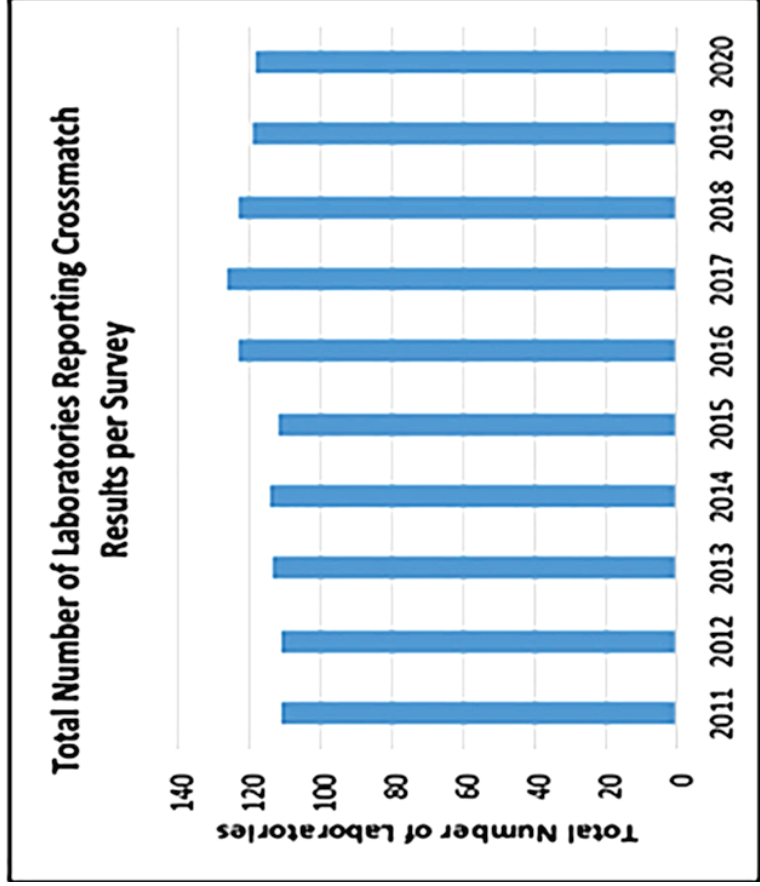
^c Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada

^d Department of Surgery, Immune Evaluation Laboratory, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, MS:BCM 504, Houston, TX 77030, USA

We analyzedproficiency testing (PT) data of American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) from 2011 to 2020 and examined: a) how many laboratories have been performing CDC-XM vs. FCXM; b) the overall efficiency of laboratories in reporting 80% consensus CDC-XM vs. FCXM result; and c) reasons for non-consensus results in the two assays.

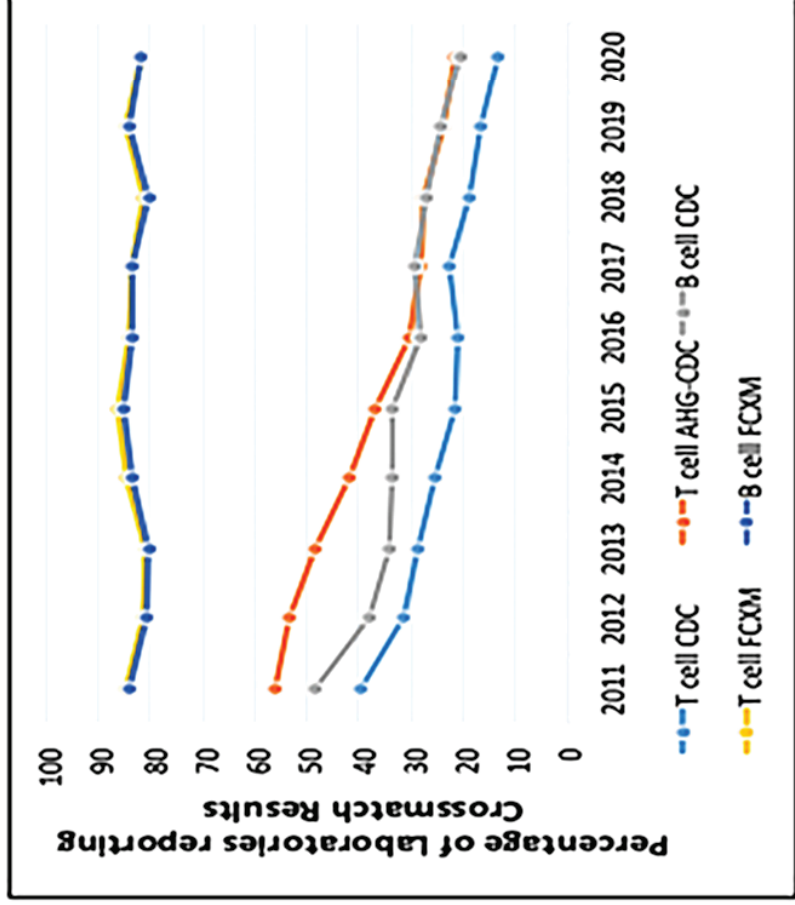
From 2013 to 2020, 480 out of 600 CDC-XMs had solid phase complement fixing HLA Class I and II test results. Of the 480 CDC-XMs, 186 (39%) had complement fixing HLA Class I antibodies, 246 (51%) had complement fixing HLA Class I and/II antibodies, 48 (10%) did not have complement fixing HLA Class I and/II antibodies.

A



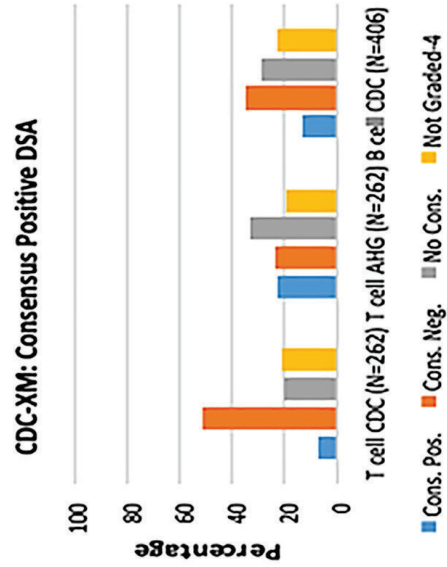
(A) Stable number of laboratories reporting crossmatch results from 2011-2020

B

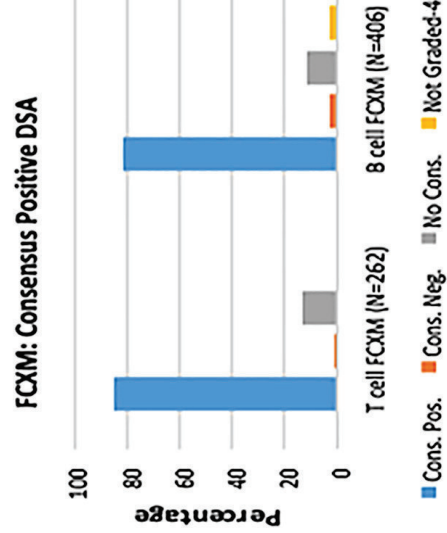


(B) Reduced percentage of laboratories reporting CDC-XM results, but stable percentage of laboratories reporting FCXM results from 2011 to 2020.

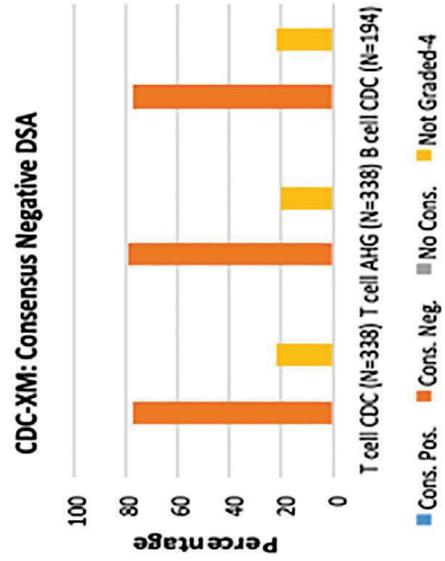
A



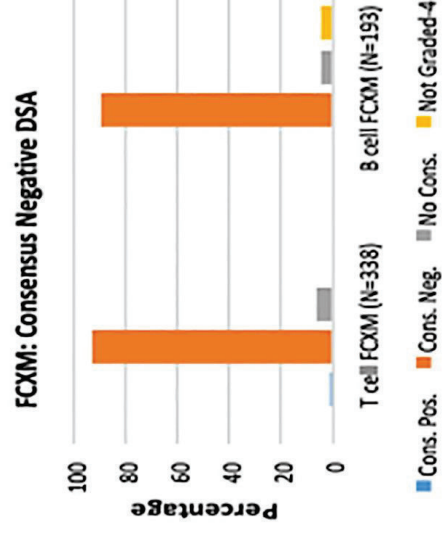
B



C



D



Percentage of Laboratories reporting ASHI PT crossmatch results in presence of consensus positive or consensus negative HLA IgG donor specific IgG antibodies (DSA) over the years (2011-2020).

Consensus positive, consensus negative, no consensus, and not graded T/B CDC-XM and FCXM) , using a consensus positive DSA serum (A and B) and using a consensus negative DSA serum (C and D)

Improving the performance of virtual crossmatch results by correlating with nationally-performed physical crossmatches: Obtaining additional value from proficiency testing activities

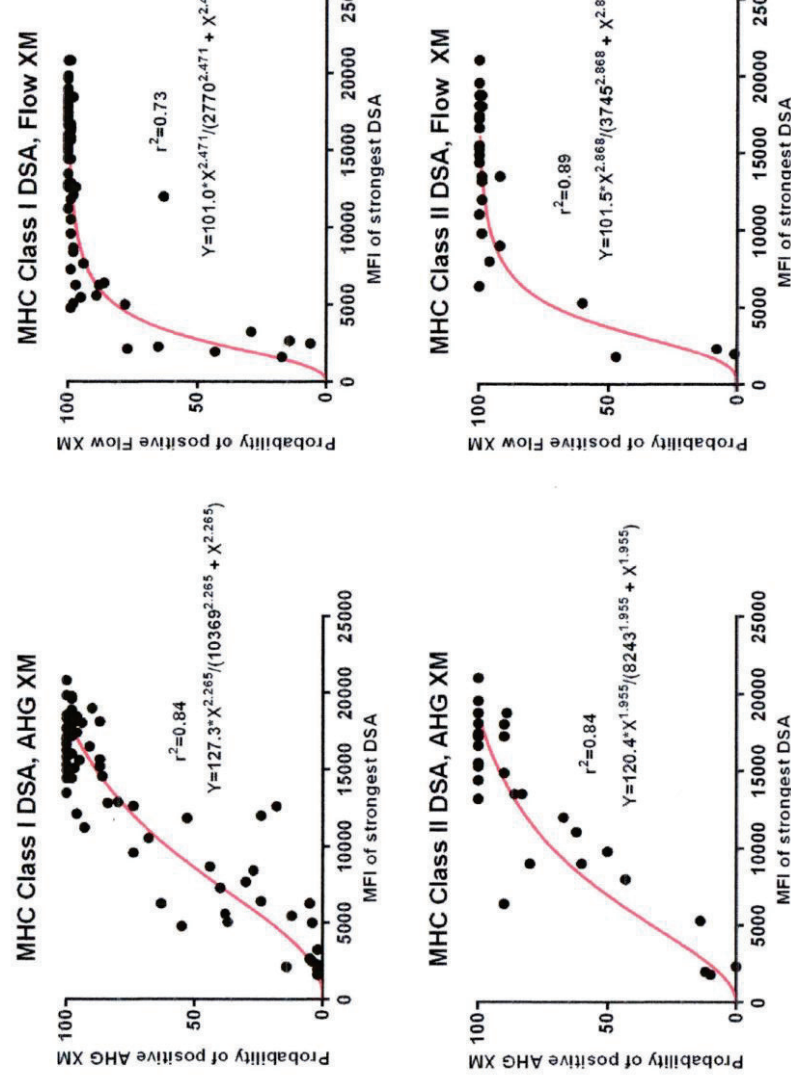
Sean M. Wrenn^{a,*}, Carlos E. Marroquin^a, Donna-Sue Hain^b, Sarah K. Harm^b, Jaime A. Pineda^a, Paulette B. Hammond^b, Diti H. Shah^b, Susan E. Hillyard^{b,a}, Mark K. Fung^b

^a University of Vermont Robert Larner, M.D. College of Medicine, Department of Transplant Surgery, Burlington, VT, United States

^b University of Vermont Robert Larner, M.D. College of Medicine, Department of Pathology, Burlington, VT, United States

In this study we retrospectively reviewed reports from nationally distributed samples for HLA antibody testing and crossmatching (2011–2015, College of American Pathologists (CAP) , and correlated our institutional HLA laboratory Luminex antibody results for strength of reactivity as MFI against the percentage of laboratories that were able to obtain a positive crossmatch by either the less sensitive cytotoxic method or the more sensitive flow cytometric method

We compared the probability of a positive XM when the top DSA was an HLA Class I (A, B, C) vs. Class II (DR, DQ) antigen. The cut-off values for a “probably” positive XM were determined at the 50th percentile (y=50) for each regression equation.



Positive crossmatches by CDC-AHG and flow cytometric crossmatch methods were associated (50th percentile) with MFI of greater than 8554 and 2748 respectively for HLA class I, and 6919 and 3707 respectively for HLA class II

Cumulative MFI value of sample	Total number of samples (n)	Mean CAP %		Mean CAP %		Mean CAP %	
		Direct XM Positive (SD)	Positive (SD)	AHG XM Positive (SD)	Flow XM Positive (SD)	Flow XM Positive (SD)	Flow XM Positive (SD)
0	43	2% (2.8)	3.3% (6.2)	8% (19.8)			
1–3000	9	3.1% (2.0)	5.7% (5.1)	30.8% (28.5)			
3001–8000	9	7.7% (6.5)	14.4% (15.0)	58.3% (19.8)			
8001–15,000	26	34.7% (29.6)	60.7% (27.5)	93.9% (8.3)			
15,001–20,000	48	84.75% (21.2)	91.9% (14.8)	99.5% (1.0)			
20,001–30,000	27	85.5% (24.3)	93.6% (17.4)	99.7% (0.7)			
30,001–40,000	11	93.6% (7.5)	98.5% (2.8)	100% (0.0)			
40,001 and above	7	96.9% (2.2)	92.9% (10.3)	99.9% (0.3)			
Total	180	50.9% (42.8)	58.7% (42.8)	72.1% (41.2)			

MFI values exhibited a direct correlation with probability of a direct XM.



**Grazie
per
l'attenzione!**

**Domande? E' tempo
per farle!**

