



Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

**RACCOMANDAZIONI AIBT PER LA VALUTAZIONE DELLA ISTOCOMPATIBILITA'
NEL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE**

(Versione 1.1 del 20 Luglio 2022)

Andreani, Marco
Crocchiolo, Roberto
Falco, Michela
Fusco, Caterina
Garbarino, Lucia
Papola, Franco
Rombolà, Gianni
Vecchiato, Cinzia

Approvato dal Consiglio Direttivo AIBT in data 21/01/2022

Presidente Dr. Franco Papola
Vice Presidente Dr. Giovanni Rombolà
Segretario Dr. Roberto Crocchiolo
Tesoriere Dr.ssa Lia Mele
Consigliere Dr.ssa Benedetta Allegra Mazzi

Condiviso con il Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo, cellule staminali emopoietiche e terapia cellulare (GITMO) in data 06/04/2022.

Presidente: Prof. Fabio Ciceri

Condiviso con il Centro Nazionale Trapianti in data 20/07/2022.

Direttore Generale Dr. Massimo Cardillo

INDICE

Premessa e obiettivo del documento	pag. 3
Metodologia e gradi di raccomandazione	pag. 4
Ambito di applicazione	pag. 4
Termini e livelli di risoluzione nella tipizzazione HLA	pag. 5
Abbreviazioni	pag. 6
1. Trapianto da donatore familiare HLA compatibile	pag. 7
2. Trapianto da donatore familiare HLA aploidentico	pag. 8
3. Trapianto da donatore non correlato	pag. 9
Bibliografia	pag. 14
Allegato A	pag. 20
Allegato B	pag. 23

Premessa

L'aumento delle indicazioni al trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE), la sempre maggiore disponibilità di donatori nei Registri internazionali, i continui progressi nelle terapie hanno reso il trapianto di CSE una opzione terapeutica consolidata per un numero sempre più ampio di pazienti, nonostante la complessità delle procedure e la possibilità di complicazioni gravi nel post-trapianto. L'esito del trapianto allogenico di CSE è influenzato in maniera significativa dal grado di istocompatibilità tra donatore e ricevente: è stato dimostrato che differenze antigeniche e/o alleliche (mismatches), nel secondo e nel terzo esone dei geni HLA di classe I e nel secondo esone per i geni HLA di classe II, sono significativamente associate ad una ridotta sopravvivenza (OS) del ricevente, sia nei regimi mieloablativi che in quelli a ridotta intensità (*Petersdorf et al. Blood 2004, Lee et al. Blood 2007, Pidala et al, Blood 2014, Kekre et al. Am J Hematol 2016, Picardi A et al. Transplant Cell Ther 2021*). Dati recenti indicano che l'esito del trapianto può essere negativamente influenzato anche dalla presenza nel ricevente di anticorpi anti-HLA specifici, diretti verso gli antigeni HLA del donatore (DSA - DonorSpecificAntigens) (*Spellman et al, Blood 2010*), in particolare nel trapianto da donatore aploidentico (*Little et al, Int J Immunogenetics 2016, Ciurea et al BMT 2020*). Nuove evidenze emergono su ulteriori fattori che possono influenzare l'outcome del trapianto, quali il matching DPB1 (*Fleischhauer K et al, Lancet Oncol 2012, Oran B et al, Blood 2018; Morishima S et al, Blood 2018, Ghobadi A et al, Curr Res Transl Med. 2019, Lorentino F et al, Haematologica 2020*) e l'analisi dei geni KIR nei trapianti da donatore non correlato e in quelli da donatore aploidentico (*Neuchel C et al, PloseOne2017, Graczyk-Pol E et al, HLA 2018, Willem C et al, J Immunol 2019*). Negli 88 Centri Trapianto presenti in Italia (https://www.gitmo.it/storage/gitmo/article/pdf/123/743-Book%20GITMO_2021_4%20May2021_finale%20copia.pdf), vengono eseguiti circa 2.000 trapianti allogenici di CSE/anno (1.911 nel 2020, dati GITMO), con un incremento medio annuo del 5-10%. A differenza di altre nazioni, dove l'attività di Immunogenetica e Istocompatibilità è più centralizzata, l'Italia ha una realtà caratterizzata dalla presenza di numerosi laboratori di Istocompatibilità, sensibilmente diversi tra loro per volume di prestazioni e dotazione di risorse, con conseguenti disomogeneità nei processi assistenziali e nei relativi esiti. Società scientifiche internazionali come European Federation for Immunogenetics (EFI) e

American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) hanno sviluppato programmi di accreditamento, obbligatori in Italia per i laboratori di istocompatibilità impegnati nelle attività relative ai trapianti, che prevedono l'adeguamento a standard minimi di qualità. Tuttavia, le nuove evidenze scientifiche suggeriscono la necessità di fornire agli operatori coinvolti nell'istocompatibilità indicazioni univoche e condivise relative alla definizione della compatibilità HLA nelle diverse tipologie di trapianto di CSE.

Sulla base di linee guida internazionali e della letteratura più recente in tema di trapianto di CSE, il gruppo di studio ha elaborato le presenti raccomandazioni auspicando di fornire un utile strumento per migliorare la qualità dell'assistenza, potenziando la sinergia con i clinici trapiantologi (GITMO) e permettendo una maggiore razionalizzazione dell'utilizzo delle risorse disponibili.

Metodologia e gradi di raccomandazione

Raccolta dei dati esistenti in letteratura utilizzando, come fonti Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Cochrane (<http://www.thecochranelibrary.com/>), EMBASE (<http://www.embase.com/>) etc. ed attribuzione del grado di raccomandazione secondo la seguente scala:

Forza della raccomandazione: - Livello **1** alto impatto clinico. Raccomandato "*Must*"
- Livello **2** basso impatto clinico. Consigliato "*Should*"

Grado evidenza: - grado **A**: consenso in letteratura o presente in standard o linee guida di istituzione o Società Scientifica di riferimento (EFI, IBMDR, EBMT, NMDP, BSHI etc.)

- grado **B**: indicazione da estesi dati di letteratura

- grado **C**: parere su expertise Gruppo di Lavoro AIBT

Ambito di applicazione

Le presenti raccomandazioni sono dedicate ai Programmi Trapianto che eseguono le seguenti tipologie di trapianto di cellule staminali emopoietiche:

1. trapianto da donatore familiare HLA identico o *mismatched* per un singolo locus
2. trapianto da donatore familiare HLA aploidentico
3. trapianto da donatore non familiare

Queste attività devono obbligatoriamente essere eseguite da laboratori in possesso di accreditamento internazionale (EFI, ASHI) con personale in possesso dei requisiti previsti dagli standard degli enti accreditatori.(1A)

Termini e livelli di risoluzione nella tipizzazione HLA

Gli alleli HLA possono essere identificati a vari gradi di risoluzione in base alle metodologie di tipizzazione usate. Per uniformare la comunicazione tra laboratori, clinici e registri è necessario utilizzare definizioni del livello di tipizzazione condivise, così come definite dal Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group (*Nunes E. et al, Blood 2011*):

1. *Risoluzione allelica*: Il risultato della tipizzazione è rappresentato da un unico allele tra quelli identificati nella versione più recente del IPD-IMGT/HLA database (<http://hla.alleles.org>).

2. *Alta Risoluzione*: Il risultato della tipizzazione è rappresentato da un set di alleli che codificano per la stessa sequenza aminoacidica nella regione della molecola che corrisponde all' *Antigen Recognition Domain* (ARD, include 2° e 3° esone per le molecole HLA di classe I e 2° esone per le molecole HLA di classe II) e che escluda alleli non espressi (Null) o con espressione dubbia (Q). È possibile utilizzare la nomenclatura WHO per gli alleli dei gruppi P.

3. *Bassa Risoluzione*: Il risultato della tipizzazione è rappresentato dalla caratterizzazione di antigeni o gruppo di antigeni HLA ed è limitato al primo campo (2 digits) della nomenclatura HLA DNA-based.

4. *Altri livelli di risoluzione*: Se l'alta risoluzione non è effettuabile dal laboratorio, i risultati possono essere riportati come risoluzione media, come ad esempio una tipizzazione che tenga conto solo degli alleli Common/Well Defined o come la designazione degli alleli in gruppi G, tenendo conto che un'eventuale ambiguità con alleli Null (es, A*01:01:01G) o Q deve (*must*) essere indicata in referto. Nel referto deve (*must*) essere definito il livello di risoluzione adottato dal laboratorio.

5. *Tipizzazione estesa*: È una tipizzazione eseguita per aggiungere informazioni ad una tipizzazione già effettuata, estesa o ad ulteriori loci non ancora tipizzati o a un livello di risoluzione superiore. Nel caso si utilizzi un campione differente e comprenda la verifica dei loci già tipizzati può essere considerata anche come tipizzazione di verifica.

6. *Tipizzazione di verifica*: È una tipizzazione eseguita su un campione diverso con lo scopo di verificare la concordanza con i risultati ottenuti con il primo campione. Non è necessario lo stesso livello di risoluzione della prima tipizzazione, ma solo la concordanza tra le due tipizzazioni.

Abbreviazioni:

ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
ARD	Antigen Recognition Domain
CDC	Citotossicità Complemento Dipendente
CDC-XM	Cross Match citotossico
CSE	Cellule Staminali Emopoietiche
DSA	Anticorpi Donatore Specifici
EFI	European Federation for Immunogenetics
FCXM	Cross Match citofluorimetrico
GITMO	Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigens
HVG	Host Versus Graft
IBMDR	Italian Bone Marrow Donor Registry
IPA	Inherited Paternal Antigens
IPD	Immuno Polymorphism Database
KIR	Killer Immunoglobulin Like Receptor
MUD	Marrow Unrelated Donor
NGS	Next Generation Sequencing
NIMA	Not Inherited Maternal Antigens
OS	Overall Survival
PRA	Panel Reactive Antibodies
PT	Programma Trapianto
TNC	Total Nucleated Cells
TCE	T Cell Epitope
UCB	Umbelical Cord Blood
WMDA	World Marrow Donor Association

1 - TRAPIANTO DA DONATORE FAMILIARE HLA COMPATIBILE

La ricerca di un donatore per un paziente in attesa di un trapianto di cellule staminali emopoietiche è generalmente eseguita prima all'interno del nucleo familiare. La probabilità di individuare un donatore compatibile HLA identico, è di circa il 25% - 30% dei nuclei familiari analizzati.

1.1 Prima tipizzazione

Per valutare la compatibilità di un potenziale donatore all'interno del gruppo familiare si deve (*must*) eseguire la tipizzazione almeno dei loci HLA-A, -B, -C e -DRB1 a bassa risoluzione sul paziente e su tutti i membri della famiglia, inclusi i fratelli, i genitori e i figli ove disponibili. I familiari clinicamente non idonei alla donazione, sulla base di una valutazione anamnestica eseguita dagli ematologi al momento dello studio familiare, possono essere tipizzati ugualmente al fine della corretta definizione della segregazione aplo tipica.

Nei casi in cui gli aplotipi parentali siano segregabili inequivocabilmente è possibile identificare un donatore HLA *genotipicamente* identico, anche senza eseguire la tipizzazione estesa (*Nunes E et al, Blood 2011*). La segregazione corretta degli aplotipi parentali è rilevante anche per la scelta di un possibile donatore aploidentico. **(1A)**

Nei nuclei familiari in cui la segregazione degli aplotipi parentali non sia possibile o non sia univoca (ad esempio nei casi in cui i genitori condividono un aplotipo o un genitore risulti omozigote ad uno o più loci), il donatore apparentemente HLA-identico è definito *fenotipicamente* identico.

Nota: Considerando che all'interno del nucleo familiare le probabilità di individuare un donatore genotipicamente o fenotipicamente HLA compatibile per un paziente sono relativamente scarse e che pertanto potrebbe essere necessario indirizzare rapidamente il paziente verso un trapianto da donatore non correlato (MUD, Matched Unrelated Donor) o aploidentico (Apl), è raccomandato eseguire sul candidato già in questa fase una tipizzazione genomica per i loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 e -DPB1 ad alta risoluzione, oltre che, facoltativamente, per i loci HLA-DRB3/4/5, -DQA1 e -DPA1. (Picardi A et al, Transfusion 2017).(1C)

1.2 Tipizzazione estesa per donatori familiari HLA identici

1.2.1 Tipizzazione estesa per donatori familiari HLA genotipicamente identici

Quando all'interno del nucleo familiare, in base alla segregazione degli aplotipi, sia stato individuato un donatore *genotipicamente* identico, è raccomandato (*should*) eseguire sulla coppia donatore-ricevente la tipizzazione del locus DPB1 per escludere eventuali eventi di ricombinazione genetica, relativamente frequenti a causa del basso linkage disequilibrium tra il locus DPB1 e le altre regioni di classe II (*Mariano L et al., BBMT 2019*). Dal punto di vista clinico i mismatches al locus DPB1 possono essere "permissivi" o "non permissivi", distinzione basata sulla minore o maggiore capacità di specifici allotipi DP di indurre risposte alloreattive da parte di linfociti T (*Fleischhauer K et al, Blood 2017*). **(2B)** Identificare un donatore con mismatches DPB1 TCE (T cell epitope)- permissivi è associato ad un miglioramento significativo dell'esito del trapianto di CSE (*vedi paragrafo 3.2*).

1.2.2 Tipizzazione estesa per donatori familiari HLA fenotipicamente identici

Qualora all'interno del nucleo familiare non sia possibile individuare univocamente la segregazione aplo-tipica, sul paziente e sul donatore *fenotipicamente* identico si deve (*must*) eseguire la tipizzazione ad alta risoluzione dei loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 e DPB1 o almeno dei loci in cui è riscontrata ambiguità di segregazione. La tipizzazione di altri loci può essere eseguita se richiesta da protocolli trapianto locali. **(1A)** Nel caso in cui si rilevino 1 o più *mismatches* nella coppia donatore-ricevente, come per esempio in caso di *crossing over*, si deve (*must*) eseguire lo screening degli anticorpi anti-HLA nel ricevente (vedi par 4.1)

1.2.3 Tipizzazione di verifica

Prima del trapianto la tipizzazione HLA deve (*must*) essere ripetuta su un secondo campione biologico sia del paziente che del donatore individuato con lo scopo di verificare la concordanza con i risultati ottenuti con il primo campione. In questo caso sarà sufficiente eseguire la tipizzazione almeno per i loci HLA-A, -B, -DRB1 a bassa risoluzione. **(1A)**

2 - TRAPIANTO DA DONATORE FAMILIARE HLA APLOIDENTICO

In mancanza di un donatore HLA *genotipicamente* o *fenotipicamente* identico all'interno del nucleo familiare e quando non sia possibile ricercare un MUD nei registri internazionali (*a questo scopo sono utili algoritmi disponibili per la prognosi della ricerca, tipo <http://search-prognosis.b12x.org>*), sono state sviluppate nel corso degli anni strategie trapianto alternative e di profilassi della GVHD. Soluzioni alternative di trapianto di cellule staminali emopoietiche sono rappresentate, ad esempio, dall'impiego del sangue cordonale o dalla possibilità di selezionare per il paziente un donatore familiare parzialmente compatibile. Tra i consanguinei del paziente (genitore, figlio, fratello, in alcuni casi anche cugino, nipote, zio) può essere identificato un donatore *aploidentico*, cioè che condivide con il paziente uno stesso aplotipo HLA, consentendo al paziente l'accesso alla terapia trapiantologica con risultati soddisfacenti per alcune tipologie di pazienti/patologie (*Luznik L et al, BBMT2008; Mancusi A et al, Blood 2015; Elmariah H et al, BBMT 2018; Ciurea SO et al, BMT 2020*).

2.1 Prima tipizzazione

Il Laboratorio deve disporre dei dati della prima tipizzazione, eseguita su tutti i membri della famiglia del paziente, come descritto nel paragrafo 1.1 del presente documento. Vengono pertanto qui di seguito descritti soltanto i test richiesti nel trapianto da donatore aploidentico.

2.2 Tipizzazione estesa per donatori correlati HLA aploidentici

Qualora attraverso lo studio della segregazione familiare sia possibile identificare tra i consanguinei del paziente un donatore che condivida un intero aplotipo HLA individuato univocamente, il donatore è definito *genotipicamente* aploidentico. In tal caso la tipizzazione deve (*must*) essere estesa come per il donatore *genotipicamente* identico (paragrafo 1.2.1). **(1A)** In assenza di una segregazione inequivocabile degli aplotipi, l'aploidenticità del donatore (donatore *fenotipicamente* aploidentico) deve (*must*) essere confermata dalla

tipizzazione ad alta risoluzione almeno dell'aplotipo condiviso per i loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 e DPB1.(1A)

2.2.1 Tipizzazione di verifica

Prima del trapianto la tipizzazione HLA deve (*must*) essere ripetuta su un secondo campione biologico sia del paziente che del donatore individuato con lo scopo di verificare la concordanza con i risultati ottenuti con il primo campione. In questo caso sarà sufficiente eseguire la tipizzazione almeno per i loci HLA-A, -B, -DRB1 a bassa risoluzione. (1A)

2.3 Ricerca anticorpi anti-HLA

Nella selezione del donatore aploidentico, data la presenza di numerosi mismatch tra donatore e ricevente, deve (*must*) essere eseguita la ricerca di anticorpi anti-HLA nel ricevente, per evitare la possibilità che anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA) compromettano l'outcome del trapianto, come dimostrato da numerosi studi recenti (*Spellman et al, Blood 2010; Little et al, Int J Immunogenetics 2016; Ciurea et al, BMT 2020*). (1A) Si raccomanda di eseguire lo screening degli anticorpi anti-HLA nelle fasi iniziali della ricerca del donatore, in modo da consentire la selezione del miglior donatore disponibile e di ripetere l'analisi al momento del work up, per la definizione del rischio clinico e l'eventuale necessità di applicare protocolli di desensibilizzazione. (2B)

Un approfondimento sulla ricerca di anticorpi anti-HLA nel trapianto di CSE è riportato nel paragrafo 4.1.

2.4 Alloreattività NK mediata

Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di una popolazione NK alloreattiva nel donatore è associata a un miglior decorso clinico del trapianto aploidentico (*Ruggeri L et al, Science 2002; Lueng WJ et al, Immunol 2004*), così come la presenza di particolari genotipi KIR (B/X e analisi del valore del B content) (*Oevanmann L et al, Blood 2014; Michealis SU et al, Ann Hematol 2014*) e di determinati geni KIR attivatori (*Mancusi A et al, Blood 2015; Ido K et al, Biol Blood Marrow Transplant 2019*). Questi studi hanno condotto l'EBMT (European Bone Marrow Transplantation) ad includere l'analisi dei geni KIR nelle raccomandazioni per l'analisi dei donatori aploidentici (*Ciurea SO et al, Bone Marrow Transplant 2019*). Nei casi in cui venga richiesta la valutazione della alloreattività NK mediata, la coppia ricevente-donatore aploidentico deve (*must*) essere esaminata in bassa risoluzione per il locus A e in alta risoluzione per i loci HLA-B e -C; deve inoltre essere eseguito lo studio del repertorio dei geni KIR del donatore. (2C)

Sono disponibili applicazioni per individuare nella coppia donatore-ricevente la possibilità di alloreattività NK-mediata, come il software KIR ligand calculator del sito IPD-IMGT (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>).

Un approfondimento dello studio della alloreattività NK mediata nel trapianto di CSE è riportato nel paragrafo 4.2.

3 - TRAPIANTO DA DONATORE NON CORRELATO

Il donatore non correlato (MUD) viene reclutato attraverso una ricerca nelle banche dati presenti nei registri nazionali di donatori di CSE, riuniti nella WMDA (World Marrow Donor Association). Per l'Italia il Registro Nazionale è l'IBMDR (Italian Bone Marrow Donor

Registry), la cui attività è disciplinata da standard di funzionamento annualmente aggiornati e adeguati agli avanzamenti tecnologici e scientifici. Questi prevedono che “Il donatore reclutato è tipizzato per le caratteristiche HLA-A,B,C, DRB1, DQB1 **(1A)** e DPB1 **(2A)**– (con metodiche di biologia molecolare a risoluzione medio/alta– 2 campi –con possibilità di utilizzare la nomenclatura WHO con i G/P e eventuale indicazione di ambiguità rare)” (V_24 St.11.21), preferibilmente mediante tecnologie a risoluzione allelica (NGS), a partire da campione di sangue periferico o salivare da cui estrarre il DNA.

La probabilità di individuare un donatore compatibile per i loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1(10/10) è attualmente circa 80% per gli individui caucasici, decresce notevolmente per gruppi etnici diversi (*Gragert L et al., NEJM 2014*). In Italia, la probabilità di trovare un donatore 8/8 è cambiata nel tempo come segue: nel 2012: 54%, nel 2017: 67%, nel 2018: 72%. (*Sacchi N, Presentazione Congresso AIBT 2019*).

3.1 Tipizzazione del paziente per attivazione della ricerca di donatore non correlato

Il paziente candidato ad un trapianto da donatore non correlato deve (*must*) essere tipizzato ad alta risoluzione per i loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, e -DQB1 e, facoltativamente, per i loci HLA-DRB3/4/5, -DQA1, -DPB1 e -DPA1. **(1A)** Questa tipizzazione viene definita di “Attivazione MUD” per il paziente. I dati genetici ottenuti devono essere inseriti dal laboratorio che ha eseguito la tipizzazione nel software gestionale IBMDR per attivare la ricerca.

Data la rilevanza clinica della eventuale presenza di anticorpi anti-HLA nel paziente, in particolare quelli specificamente diretti nei confronti del donatore (DSA), è altamente raccomandato (*must*) eseguire lo screening degli anticorpi anti-HLA all'attivazione della ricerca e ripetere l'analisi al momento del work up (vedi par 4.1)

Nota: Eventuali casi di omozigosi riscontrati nelle tipizzazioni di pazienti con alta concentrazione di cellule neoplastiche circolanti devono (must) essere confermati da studi familiari o dalla ripetizione della tipizzazione, possibilmente con altra metodica e/o su campioni biologici con numero ridotto di cellule neoplastiche (ad esempio tamponi salivari o campioni di sangue periferico dopo remissione di malattia).(1A) Particolare attenzione deve essere rivolta nei casi di pazienti già precedentemente sottoposti a trapianto, nei quali la persistenza di cellule del donatore potrebbe dare risultati erronei. In questi casi bisognerebbe utilizzare campioni pre-trapianto o campioni tissutali privi di infiltrazioni leucocitarie (ad es. tamponi salivari, swab ecc).

3.2 Tipizzazione estesa per donatore non correlato

In seguito all'individuazione di un potenziale donatore nei registri internazionali, gli standard IBMDR prevedono che il laboratorio di istocompatibilità di riferimento del Programma Trapianto (PT) riceva un campione biologico del donatore selezionato su cui deve (*must*) essere eseguita la tipizzazione genomica ad alta risoluzione dei loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 e -DPB1, facoltativamente quella dei loci HLA-DRB3/4/5, -DQA1 e -DPA1 in base al protocollo trapianti locale. **(1A)** Come già descritto nel paragrafo 1.2.1, il debole linkage disequilibrium del locus DPB1 implica che i mismatches nella coppia ricevente-MUD siano molto frequenti, anche nelle coppie compatibili per tutti gli altri loci

(circa 80%, *Petersdorf EW et al, Br J Haematol 2001*). È pertanto rilevante per l'outcome del trapianto identificare i mismatches TCE permissivi e non permissivi; a tale scopo sono disponibili sul web tools che consentono di predire gli effetti del mismatch ricevente-MUD al locus DPB1 in base ad algoritmi aggiornati, come il DPB1 T-Cell Epitope Algorithms (http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb_v2.html). **(2A)**

Nel web sono disponibili anche altri algoritmi (PIRCHE, HLA-Matchmaker) in grado di stimare il rischio di sviluppare risposte alloreattive correlato a specifici mismatches HLA.

È riportato che, oltre al numero, anche la direzionalità dei mismatches rilevati nella coppia donatore-ricevente è un fattore che può influenzare l'esito del trapianto di CSE. In particolare i mismatches host versus graft (HVG) sembrano avere una prognosi migliore dei mismatches graft versus host (GVH) e bidirezionali (*Hurley CK et al, Blood 2013*). È pertanto raccomandabile (*should*) la descrizione dei mismatches e la loro direzionalità nel referto di tipizzazione. **(2B)**

*Nota: Come riportato negli standard di funzionamento del programma nazionale italiano di donazione di CSE da donatore non familiare (standard IBMDR) in vigore la tipizzazione dei geni KIR può essere richiesta dal Programma Trapianto anche durante il percorso della selezione dei donatori non correlati. Queste indicazioni vanno aggiornate in relazione alla revisione annuale degli standard IBMDR. È stato infatti osservato che alcune categorie di pazienti che ricevono il trapianto da donatori caratterizzati da particolari genotipi KIR (B/X) e da un alto valore di B content (≥ 2) hanno un miglior decorso clinico (*Cooley S et al, Blood 2010; Cooley S et al, J Immunol 2014; Bachanova V et al, Biol Blood Marrow Transplant 2016*).*

3.3 Tipizzazione estesa per unità di cordone ombelicale

Il trapianto di CSE da cordone ombelicale è una opzione terapeutica consolidata sia per pazienti pediatrici che adulti (*Ballen KK et al, BBMT 2019*). Fattori indipendenti che influenzano significativamente l'esito del trapianto sono la dose di cellule criopreservate nell'unità ($TNC \geq 3.0 \times 10^7 / kg$ o $CD34^+ \geq 1.5 \times 10^5 / kg$) e il grado di matching HLA, motivo per cui attualmente la selezione delle unità di cordone ombelicale per il trapianto prevede la tipizzazione ad alta risoluzione almeno dei loci HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 (*Eapen M et al, Blood 2014*). **(1A)** Una volta individuata una unità candidabile, prima dell'inizio del regime di condizionamento del paziente, deve (*must*) essere eseguita una tipizzazione di verifica almeno dei loci HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 ad alta risoluzione e altri loci se richiesti dal PT, utilizzando un segmento associato (*attached*) all'unità cordonale. Nel caso non fossero disponibili segmenti *attached*, in accordo con il PT, la tipizzazione può essere eseguita su un campione satellite. In questo caso, la tipizzazione deve (*must*) ripetuta dal laboratorio di istocompatibilità di riferimento del PT su un campione prelevato direttamente dall'unità immediatamente dopo lo scongelamento, completando la tipizzazione almeno per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 a bassa risoluzione il più velocemente possibile. **(1A)**

*Nota: È riportato in letteratura che l'influenza sull'esito del trapianto di CSE della condivisione o meno tra donatore e ricevente di antigeni NIMAs (Non Inherited Maternal Antigens) e IPAs (Inherited Paternal Antigens), nota già per i trapianti d'organo (*Jankowska-Gan E et al, Transpl 2011*) è*

particolarmente evidente nel caso di trapianto di sangue cordonale (van Rood JJ et al, PNAS 2009; Van der Zanden HG et al, BBMT 2014). (2C)

3.4 Tipizzazione di verifica

Prima del trapianto la tipizzazione di verifica del paziente deve (*must*) essere eseguita su un secondo campione per verificare la tipizzazione precedente, almeno per i loci HLA-A, -B a bassa risoluzione, discriminando gli equivalenti split sierologici, e HLA-DRB1 ad alta risoluzione. Per il donatore, i dati genetici inseriti nel registro possono essere considerati come prima tipizzazione. (1A)

4.1 Ricerca anticorpi anti-HLA donatore specifici

Nel ricevente di CSE non può essere esclusa la presenza di anticorpi anti-HLA nel paziente, in particolare quelli specificamente diretti nei confronti del donatore (DSA), a causa di immunizzazioni pregresse. In presenza di mismatch nella coppia donatore-ricevente si deve pertanto eseguire (*must*) lo screening degli anticorpi anti-HLA, in particolare nel trapianto aploidentico caratterizzato dalla presenza di numerosi mismatch tra donatore e ricevente per la presenza di un intero alotipo HLA non condiviso.

Un recente studio multicentrico indica che, in una analisi multivariata, fattori indipendenti di rischio di formazione di anticorpi nel ricevente in attesa trapianto di CSE siano, oltre che il numero delle gravidanze e delle trasfusioni, anche il sesso femminile e la patologia di base (sindrome mielodisplastica) (Huo MR et al, Hum Imm 2018). È pertanto rilevante eseguire nel caso di trapianto aploidentico la ricerca di anticorpi anti-HLA nel ricevente, per permettere al clinico una scelta tra i possibili donatori aploidentici e ripetere la ricerca al momento del work up per una definizione del rischio clinico e l'eventuale desensibilizzazione. La ricerca deve essere estesa ad anticorpi diretti contro tutte le specificità HLA di I e II classe.

La tecnica di riferimento per la ricerca degli anticorpi è la Beads Based Immunoassay (Luminex) che permette di identificare le singole specificità HLA e l'ampiezza o spettro di immunizzazione (PRA), eventualmente integrata con altre tecniche (CDC, C1q/C3d, CDC-XM, FCXM). La ricerca degli anticorpi anti-HLA dovrebbe essere effettuata anche in altre tipologie di trapianto da donatore non HLA identico (CSE da cordone ombelicale, Mismatched Unrelated Donor - M-MUD) (Dehn J et al, Blood 2019) ed è preferibile eseguirla nelle fasi iniziali della ricerca del donatore, in virtù dell'opportunità, laddove possibile, di cambiare il donatore in caso di presenza di DSA; inoltre, se nel ricevente fossero presenti anticorpi diretti contro epitopi espressi da loci che non sono stati tipizzati nel donatore (per es. DQA1, DPA1), sarebbe indicata la tipizzazione di questi loci per discriminare tra DSA o non DSA (vedi allegato A).

4.2 Tipizzazione KIR

L'attività anti-leucemica esercitata dalle cellule NK del donatore è in gran parte determinata dall'interazione tra i recettori KIR (espressi sulle cellule NK) e le molecole HLA di classe I (esprese sulle cellule leucemiche). Il locus KIR comprende numerosi geni (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1/S1, KIR3DL2,

KIR3DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5) e due pseudogeni (KIR2DP1 e KIR3DP1) ed è caratterizzato da un elevato grado di polimorfismo sia aplotipico che allelico. Di conseguenza l'analisi dei geni KIR è necessaria perché individui differenti sono spesso caratterizzati da repertori KIR diversi.

Numerosi studi hanno suggerito l'analisi dei geni KIR come criterio aggiuntivo nella selezione del donatore aploidentico. Varie evidenze scientifiche hanno spinto la Società Europea EBMT ad includere l'analisi dei geni KIR nelle raccomandazioni per l'analisi dei donatori aploidentici (*Ciurea SO et.al, Bone Marrow Transplantation 2019*). È importante però ricordare che l'eterogeneità delle patologie (malattie ematologiche maligne o patologie non neoplastiche, ALL o AML, dell'adulto o del bambino), lo stato di malattia (remissione completa o parziale, CR o PR), l'eterogeneità dei protocolli trapiantologici (purificazione di precursori del sistema ematopoietico, deplezione ex-vivo di cellule T α/β e di cellule B, deplezione in-vivo di cellule T alloreattive), di condizionamento e del trattamento farmacologico post-trapianto rendono, al momento, difficile definire un algoritmo univoco da applicare allo studio dei geni KIR nel contesto del trapianto aploidentico (*Kongtim P et al, Seminars in Hematology 2019; Wright PA et al, HLA 2020*) (vedi allegato B).

Bibliografia

Bachanova V, Weisdorf DJ, Wang T, Marsh SGE, Trachtenberg E, Haagenson MD, Spellman SR, Ladner M, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Cooley SA. Donor KIR B Genotype Improves Progression-Free Survival of Non-Hodgkin Lymphoma Patients Receiving Unrelated Donor Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Sep;22(9):1602-1607. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.05.016.

Ballen KK, Logan BR, Kuxhausen M, et al. Use of unlicensed unrelated umbilical cord blood expands access to underserved patients: report of 2466 transplants in a racially/ethnically diverse population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(3):S221-S222.

Ciurea SO. Considerations for haploidentical versus unrelated donor transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Aug;54(Suppl 2):738-742, doi: 10.1038/s41409-019-0613-2. Review

Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Fuchs EJ, Luznik L, Huang XJ, Ciceri F, Locatelli F, Aversa F, Castagna L, Bacigalupo A, Martelli M, Blaise D, Ben Soussan P, Arnault Y, Handgretinger R, Roy DC, O'Donnell PV, Bashey A, Solomon S, Romee R, Gayoso J, Lazarus HM, Ballen K, Savani BN, Mohty M, Nagler A. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jan;55(1):12-24. doi: 10.1038/s41409-019-0499-z. Review.

Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SG, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2411-9. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051.

Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SG, Spellman S, Haagenson MD, Saetern K, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P, Miller JS. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4592-600. doi: 10.4049/jimmunol.1302517.

Dehn J, Spellman S, Hurley CK, Shaw BE, Barker JN, Burns LJ, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Hartzman R, Maiers M, Marino SR, Mueller C, Perales MA, Rajalingam R, Pidala J *Blood* 2019 Sep 19;134(12):924-934. doi: 10.1182/blood.2019001212

Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, et al. ; Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Netcord, Eurocord, and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2014;123(1):133-140. [PMCID: PMC3879902] [PubMed: 24141369]

Elmariah H, Kasamon YL, Zahurak M, Macfarlane KW, Tucker N, Rosner GL, Bolaños-Meade J, Fuchs EJ, Wagner-Johnston N, Swinnen LJ, Huff CA, Matsui WH, Gladstone DE, McCurdy SR, Borrello I, Gocke CB, Shanbhag S, Cooke KR, Ali SA, Brodsky RA, DeZern AE, Luznik L, Jones RJ, Ambinder RF. Haploidentical Bone Marrow Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide Using Non-First-Degree Related Donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018 May;24(5):1099-1102. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.02.005.

Fleischhauer K, Shaw BE, Gooley T, Malkki M, Bardy P, Bignon JD, Dubois V, Horowitz MM, Madrigal JA, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, Spellman S, Velardi A, Zino E, Petersdorf EW. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haemopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. Lancet Oncol.* 2012 Apr;13(4):366-74. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22340965.

Fleischhauer K, Shaw BE. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood.* 2017 Aug 31;130(9):1089-1096. doi: 10.1182/blood-2017-03-742346. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28667011.

Ghobadi A, Milton DR, Gowda L, Rondon G, Chemaly RF, Hamdi A, Alousi A, Afrough A, Oran B, Ciurea S, Kebriaei P, Popat UR, Qazilbash MH, Shpall EJ, Champlin RE, Bashir Q. HLA-DP mismatch and CMV reactivation increase risk of aGVHD independently in recipients of allogeneic stem cell transplant. *Curr Res Transl Med.* 2019 May;67(2):51-55. doi: 10.1016/j.retram.2019.01.001. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30683577.

Graczyk-Pol E, Rogatko-Koros M, Nestorowicz K, Gwozdowicz S, Mika-Witkowska R, Pawliczak D, Zubala M, Szlendak U, Witkowska A, Tomaszewska A, Nasilowska-Adamska B, Szczepinski A, Wojcik M, Halaburda K, Nowak J. Role of donor HLA class I mismatch, KIR-ligand mismatch and HLA:KIR pairings in hematological malignancy relapse after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *HLA.* 2018 Dec;92 Suppl 2:42-46. doi: 10.1111/tan.13386. PMID: 30168290.

Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, Hartzman R, Rizzo JD, Horowitz M, Confer D, Maiers M. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med.* 2014 Jul 24;371(4):339-48. doi:10.1056/NEJMsa1311707.

Huo MR, Xu YJ, Zhai SZ, Lv M, Wang Y, Cao LQ, Xu LP, Zhang XH, Chen H, Chen YH, Wang FR, Han W, Sun YQ, Yan CH, Tang FF, Mo XD, Zhao MF, Liu KY, Huang XJ, Chang YJ. Prevalence and risk factors of antibodies to human leukocyte antigens in haploidentical stem cell transplantation candidates: A multi-center study. *Hum Immunol.* 2018 Sep;79(9):672-677. doi: 10.1016/j.humimm.2018.06.003. Epub 2018 Jun 8. PMID: 29890181.

Hurley, C.K., Woolfrey, A., Wang, T., Haagenson, M., Umejiego, J., Aljurf, M. et al. The impact of HLA unidirectional mismatches on the outcome of myeloablative hematopoietic stem cell transplantation with unrelated donors. *Blood* 2013, 121, 4800.

Ido K, Koh H, Hirose A, Okamura H, Koh S, Nanno S, Nishimoto M, Nakamae M, Nakashima Y, Nakane T, Hino M, Nakamae H. Donor KIR2DS1-mediated Decreased Relapse and Improved Survival, Depending on Remission Status at HLA-Haploidentical Transplantation with Post-transplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Dec 31. pii: S1083-8791(19)31733-1. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.12.765.

Jankowska-Gan E et al. Pretransplant immune regulation predicts allograft outcome: Birectional regulation correlates with excellent renal transplant function in living-related donor-recipient pairs. *Transplantation* 2011, 10:1097

Kekre N, Mak KS, Stopsack KH, Binder M, Ishii K, Brånvall E et al. 2016. Impact of HLA-Mismatch in Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Meta-Analysis. *Am J Hematol*. 91(6):551-5. doi: 10.1002/ajh.24342. Epub 2016 Apr 13. Review.

Kongtim P, Ciurea SO. Who is the best donor for haploidentical stem cell transplantation? *Semin Hematol*. 2019 Jul;56(3):194-200. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.003.

Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. 2007. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 15;110(13):4576-83. Epub 2007 Sep 4.

Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, Niethammer D, Handgretinger R. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):644-50.

Little AM, Green A, Harvey J, Hemmatpour S, Latham K, Marsh SG, Poulton K, Sage D. BSHI Guideline: HLA matching and donorselection for haematopoietic progenitor cell transplantation. *Int J Immunogenet*. 2016 Oct;43(5):263-86. doi: 10.1111/iji.12282.

Lorentino F, Sacchi N, Oldani E, Miotti V, Picardi A, Gallina AM, Crivello P, Bernasconi P, Saccardi R, Farina L, Benedetti F, Cerno M, Grassi A, Bruno B, Patriarca F, Ciceri F, Fleischhauer K, Vago L, Bonifazi F. Comparative evaluation of biological human leukocyte antigen DPB1 mismatch models for survival and graft-versus-host disease prediction after unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Haematologica*. 2020 Apr;105(4):e186-e189. doi: 10.3324/haematol.2019.225177. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31471374; PMCID: PMC7109721.

Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, Gooley TA, Piantadosi S, Kaup M, Ambinder RF, Huff CA, Matsui W, Bolaños-Meade J, Borrello I, Powell JD, Harrington E, Warnock S, Flowers M, Brodsky RA, Sandmaier BM, Storb RF, Jones RJ, Fuchs EJ. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic

malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jun;14(6):641-50. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.03.005. PMID: 18489989; PMCID: PMC2633246.

Mancusi A, Ruggeri L, Urbani E, Pierini A, Massei MS, Carotti A, Terenzi A, Falzetti F, Tosti A, Topini F, Bozza S, Romani L, Tognellini R, Stern M, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood.* 2015 May 14;125(20):3173-82. doi: 10.1182/blood-2014-09-599993.

Mariano L, Zhang BM, Osoegawa K, Lowsky R, Fernandez-Vina M. Assessment by Extended-Coverage Next-Generation Sequencing Typing of DPA1 and DPB1 Mismatches in Siblings Matching at HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQ Loci. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Dec;25(12):2507-2509. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.07.033. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31381995.

Michaelis SU, Mezger M, Bornhäuser M, Trenschele R, Stuhler G, Federmann B, Oevermann L, Kanz L, Handgretinger R, Bethge WA. KIR haplotype B donors but not KIR-ligand mismatch result in a reduced incidence of relapse after haploidentical transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19-depleted grafts. *Ann Hematol.* 2014 Sep;93(9):1579-86. doi: 10.1007/s00277-014-2084-2.

Morishima S, Shiina T, Suzuki S, Ogawa S, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Azuma F, Yabe T, Satake M, Kato S, Kodaera Y, Sasazuki T, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Evolutionary basis of HLA-DPB1 alleles affects acute GVHD in unrelated donor stem cell transplantation. *Blood.* 2018. PMID: 29246901

Neuchel C, Fürst D, Niederwieser D, Bunjes D, Tsamadou C, Wulf G, Pfreundschuh M, Wagner E, Stuhler G, Einsele H, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Impact of Donor Activating KIR Genes on HSCT Outcome in C1-Ligand Negative Myeloid Disease Patients Transplanted with Unrelated Donors-A Retrospective Study. *PLoS One.* 2017 Jan 20;12(1):e0169512. doi: 10.1371/journal.pone.0169512. eCollection 2017. PMID: 28107369

Oevermann L, Michaelis SU, Mezger M, Lang P, Toporski J, Bertaina A, Zecca M, Moretta L, Locatelli F, Handgretinger R. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood.* 2014 Oct 23;124(17):2744-7. doi: 10.1182/blood-2014-03-565069.

Oran B, Saliba RM, Carmazzi Y, de Lima M, Rondon G, Ahmed S, Alousi A, Andersson BS, Anderlini P, Alvarez M, Bashir Q, Ciurea S, Fernandez-Vina M, Hosing C, Kebriaei P, Korbling M, Cano P, Khouri I, Marin D, Nieto Y, Olson A, Popat U, Rezvani K, Qazilbash M, Shpall EJ, Champlin RE, Cao K. Effect of nonpermissive HLA-DPB1 mismatches after unrelated allogeneic transplantation with in vivo T-cell depletion. *Blood.* 2018. PMID: 29386198. *Clinical Trial.*

Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2976-80. doi: 10.1182/blood-2004-04-1674. Epub 2004 Jul 13. PMID: 15251989.

Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2004 Nov;11(6):386-91. Review.

Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, et al. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2001;112(4):988-994.

Picardi A, Arcese W, Pollichieni S, Di Piazza F, Mangione I, Gallina AM, Cerretti R, Cudillo L, De Angelis G, Mengarelli A, Dentamaro T, Tirindelli MC, Chierichini A, Ferrari A, Marciano R, Andreani M, Bonifazi F, Sacchi N. The Rome Transplant Network model compared to the Italian Bone Marrow Donor Registry activity for unrelated donor search process and transplant efficiency for hematologic malignancy. *Transfusion*. 2017 Jul;57(7):1734-1743. doi: 10.1111/trf.14131. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28608367.

Picardi A., Sacchi N., Miotti V., Lorentino F., Oldani E., Rambaldi A., Sessa M, –Bruno B., Cerno M., Vago L., Bernasconi P, Arcese W, Benedetti F., Pioltelli P., Russo D., Farina L., Fagioli F., Guidi S., Saporiti G., Zallio F., Chiusolo P., Borghero C., Papalinetti G., La Rocca U., Milone G., Lamparelli G., Carella A.M., Luppi M., Olivieri A., Martino M., Carluccio P., Celeghini I., Andreani M., Gallina A.M., Patriarca F., Pollichieni S., Mammoliti S., Miccichè S., Mangione I., Ciceri F., Bonifazi F., Allelic HLA Matching and Pair Origin Are Favorable Prognostic Factors for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Neoplastic Hematologic Diseases: An Italian Analysis by the Gruppo Italiano Trapianto di Cellule Staminali e Terapie Cellulari, Italian Bone Marrow Donor Registry, and Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti. *Transplant Cell Ther*. 2021 May;27(5):406.e1-406.e11. doi: 10.1016/j.jtct.2020.11.021. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33965179.

Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, Askar M, Dehn J, Fernandez Viña M, Gratwohl A, Gupta V, Hanna R, Horowitz MM, Hurley CK, Inamoto Y, Kassim AA, Nishihori T, Mueller C, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Prasad V, Robinson J, Saber W, Schultz KR, Shaw B, Storek J, Wood WA, Woolfrey AE, Anasetti C. Non permissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014 Oct 16;124(16):2596-606. doi: 10.1182/blood-2014-05-576041. Epub 2014 Aug 26. PMID: 25161269

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-100.

Sacchi N. Presentazione Congresso AIBT 2019

Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S, Haagenson M, Klein J, Flesch S, Vierra-Green C, Anasetti C. The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2704-8. doi: 10.1182/blood-2009-09-244525. Epub 2010 Jan 20. PMID: 20089963; PMCID: PMC2852369.

Stachel D, Strahm B, Wössmann W, Escherich G, Zimmermann M, Schrappe M, Borkhardt A, Eckert C, Bader P, Uhrberg M, Meisel R. Presence of centromeric but absence of telomeric group B KIR haplotypes in stem cell donors improve leukaemia control after HSCT for childhood ALL. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Nov;54(11):1847-1858. doi: 10.1038/s41409-019-0543-z.

Van der Zanden HG, Van Rood JJ, Oudshoorn M, Bakker JN, Melis A, Brand A, Scaradavou A, Rubinstein P. Noninherited maternal antigens identify acceptable HLA mismatches: benefit to patients and cost-effectiveness for cord blood banks. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Nov;20(11):1791-5. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.07.011. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25042738.

van Rood JJ, Stevens CE, Smits J, Carrier C, Carpenter C, Scaradavou A. Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):19952-7. doi: 10.1073/pnas.0910310106. Epub 2009 Nov 9. PMID: 19901324; PMCID: PMC2775036.

Willem C, Makanga DR, Guillaume T, Maniangou B, Legrand N, Gagne K, Peterlin P, Garnier A, Béné MC, Cesbron A, Le Bourgeois A, Chevallier P, Retière C. Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J Immunol*. 2019 Apr 1;202(7):2141-2152. doi: 10.4049/jimmunol.1801489. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30787107.

Wright PA. Killer-cell immunoglobulin-like receptor assessment algorithms in haemopoietic progenitor cell transplantation: current perspectives and future opportunities. *HLA* 2020 Jan 30. doi: 10.1111/tan.13817. [Epub ahead of print] Review.

ALLEGATO A

Anticorpi anti HLA e DSA nel trapianto di cellule staminali emopoietiche

Le presenti raccomandazione fanno riferimento alle linee guida EBMT (*European Bone Marrow Transplant*) per la ricerca e identificazione degli anticorpi anti HLA nel trapianto di CSE aploidentico (1).

Il rigetto è raro nel trapianto da donatore HLA identico, *sibling* o *MUD* (<3%), è frequente nel trapianto da donatore alternativo, aploidentico o cordone (>10%) a causa dei *mismatch* HLA e la ridotta competenza immunologica del *graft* (2). Studi clinici (3) indicano che gli anticorpi anti HLA specifici verso il donatore (*DSA, Donor Specific Antibodies*) sono il fattore di rischio più importante per il rigetto. Il rigetto si manifesta clinicamente come mancato o ritardato attecchimento (*graft failure*) o insufficiente funzione midollare (*poor graft function*). Entrambe le condizioni impattano in maniera fortemente negativa sulla mortalità trapiantologica (*transplant related mortality*) e la sopravvivenza (*overall survival*) (4). Gli anticorpi anti HLA sono frequenti nei candidati al trapianto cellule staminali emopoietiche (CSE). Uno studio multicentrico riconosce il sesso femminile, la mielodisplasia, le gravidanze e le trasfusioni come fattori di rischio per la presenza di anticorpi (5). Oltre il 40% delle donne con precedenti gravidanze presenta DSA, spesso a titolo alto, anche per l'effetto sinergico delle trasfusioni sulla immunizzazione da gravidanza (6).

Si **raccomanda** di effettuare lo screening degli anticorpi anti HLA all'inizio della ricerca, quando la probabilità di reperire un donatore HLA identico è bassa. (1A).

Per una corretta definizione dei DSA, si **raccomanda** che la ricerca degli anticorpi nel ricevente e la tipizzazione dei candidati donatori sia estesa a tutti i loci HLA. (1B)

Si **raccomanda** di inserire la presenza di DSA nell'algoritmo di selezione del donatore mismatched sia familiare che da registro, in quest'ultimo caso come già previsto dagli standard IBMDR per il donatore MUD (16). (1A)

Si **raccomanda**, se presenti più donatori ugualmente compatibili e similmente eleggibili, di escludere i donatori verso cui sono presenti DSA, soprattutto se ad alto titolo (vedi dopo Luminex MFI). (1B)

Nel trapianto MUD 10/10 si **consiglia** di escludere i donatori se sono presenti DSA anti- DP ad alto titolo. (2C) Nel trapianto MUD 7/8 o 9/10, si **consiglia** di escludere donatori se presenti DSA contro l'allele mismatch (7). (2B)

Nel trapianto da cordone, si **raccomanda** di escludere i cordoni solo per pazienti affetti da patologie non maligne con DSA ad alto titolo. (1A) Per le patologie maligne, poiché il dato è più controverso, si **consiglia** di escludere i donatori qualora i pazienti presentino DSA a titolo alto (o desensibilizzare, vedi dopo) (8). (2B)

Nei candidati al trapianto aploidentico, i DSA sono particolarmente frequenti e ad alto titolo, soprattutto nei riceventi di sesso femminile verso l'aplotipo non trasmesso dei figli (*child-to-mother*) (6). Si **raccomanda**, per questi pazienti, di escludere donatori qualora fossero presenti DSA ad alto titolo, soprattutto in caso di *child-to-mother* (1A) (in alternativa si suggerisce di desensibilizzare) (9).

Si **raccomanda** di utilizzare la tecnica citometrica/Luminex in screening e identificazione di anticorpi HLA.(1A)

Si **consiglia** di usare il valore di fluorescenza MFI (*Mean Fluorescence Index*) come riferimento per la definizione del rischio immunologico dei DSA. Il valore MFI >1000 è normalmente indicato come cut-off di positività (1). (2B)

Si **consiglia** di definire il rischio immunologico caso per caso (*on case-by-case basis*) in rapporto allo studio immunologico e alla tipologia del trapianto, al donatore e all'urgenza clinica. (2B)

Lo studio da cui sono derivate le Linee Guida EBMT indica una percentuale di graft failure del 9% e del 54% rispettivamente per MFI<5000 e MFI>5000 (10). Si **consiglia** di considerare il valore di MFI>5000 come cut-off di rischio immunologico, in particolare per alleli ad alta espressione, mentre livelli di MFI bassi (<3000) non sono probabilmente fattori di rischio per il trapianto (11). (2B)

Per una corretta stratificazione del rischio immunologico, si **consiglia** di integrare il test Luminex standard con test cellulari (crossmatch citometrico -FCXM, o citotossico - CDC XM) e funzionali (*Luminex C1q/C3d*). La positività del FCXM e del test C1q/C3d sono fattori di rischio per il trapianto. (2B) Si **raccomanda** di escludere donatori qualora il test CDC XM fosse positivo (12). (1B)

Si **raccomanda** di ripetere lo studio degli anticorpi, in particolare se presenti DSA, al work-up del donatore per la definizione del rischio immunologico e l'indicazione alla eventuale desensibilizzazione. (1B)

In presenza di DSA, si **raccomanda** di valutare la desensibilizzazione caso per caso, in particolare viene raccomandata per MFI>5000 o FCXM positivo (12). (1B) Se CDC XM è positiva o se DSA Luminex con MFI>20.000, la desensibilizzazione potrebbe non avere successo (13).

Si **raccomanda** il monitoraggio DSA in desensibilizzazione (target MFI<5000 o FCXM neg) (14). (1B)

Si **consiglia** di continuare il monitoraggio DSA post trapianto, fino a attecchimento completo (15). (2B)

Referenze

1. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M, Kongtim P, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus guidelines for the detection and treatment of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2018;53(5):521–34
2. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, eds. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. EBMT 2019 ISBN 978-3-030-02277-8
3. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, et al. Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(4):508–15.
4. Chang Y-J, Zhao X-Y, Xu L-P, Z, et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: a prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol Oncol* 2015;8:84.

5. Huo, MR, Xu YJ, Zhai SZ, et al. Prevalence and risk factors of antibodies to human leukocyte antigens in haploidentical stem cell transplantation candidates: A multi-center study. *Hum. Immunol.* 2018 **79**, 672–677,
6. Gladstone DE, Zachary AA, Fuchs EJ, et al. Partially mismatched transplantation and human leukocyte antigen donor-specific antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013; 19(4):647-652.
7. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood.* 2019 Sep 19;134(12):924-934
8. Politikos I, Davis E, Nhaissi M, et al on behalf of the American Society for Transplantation and Cellular Therapy Cord Blood Special Interest Group. Guidelines for Cord Blood Unit Selection *Biol Blood Marrow Transplant* 000 (2020) 1-7
9. Ciurea SO, AlMalki MM, Kongtim P, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2020 Jan;55(1):12-24.
10. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, et al. Complement-binding donor-specific anti-HLA antibodies and risk of primary graft failure in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(8):1392–8.
11. Bramanti S, Calafiore V, Longhi E, et al. Donor specific anti-HLA antibodies in haploidentical stem cell transplantation with post transplantation cyclophosphamide: risk of graft failure, poor graft function, and impact on outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.*2019;25(7):1395-1406.
12. McCurdy SR, Luznik L How we perform haploidentical stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide *Blood* 2019;134(21):1802-1810
13. Ciurea SO, Al Malki M, Kongtim P et al Treatment of allosensitized patients receiving allogeneic transplantation. *Blood Adv* 2021; 5:4031-4043
14. Zachary AA, Leffell MS. Desensitization for solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Rev.*2014;258:183–207.
15. Fasano RM, Mamcarz E, Adams S, et al. Persistence of recipient human leukocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation *British Journal of Haematology*, 2014, 166, 425–434
16. Standard IBMDR v.24/2021. <https://ibmdr.galliera.it/standard-ibmdr>

ALLEGATO B

ANALISI DEI GENI KIR NEL DONATORE CSE

Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di particolari genotipi *KIR* (B/X e analisi del valore del B content)¹⁻³, di una popolazione NK alloreattiva⁴⁻⁷ o di determinati geni *KIR* attivatori nel donatore sono associati a un miglior decorso clinico del paziente^{6, 8}. Se l'analisi dei geni *KIR* è richiesta si **raccomanda** di effettuare l'analisi del genotipo *KIR*, di calcolare il valore del B content e di valutare la presenza/assenza di una popolazione NK alloreattiva.

1. Genotipo *KIR*

I geni *KIR* sono ereditati in aplotipi e, sulla base della presenza/assenza (P/A) dei diversi geni *KIR*, è possibile identificare due differenti gruppi di aplotipi denominati "A" e "B". Gli aplotipi di tipo A includono i seguenti geni: *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR3DL2*. Gli aplotipi di tipo B sono positivi per almeno uno dei seguenti geni: *KIR2DL2*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*. Sulla base della P/A dei vari geni *KIR* è quindi possibile l'assegnazione di due differenti genotipi: A/A (ovvero genotipi che includono due aplotipi di tipo A) e B/X (dove X include la presenza di un aplotipo A o di un aplotipo B)⁹⁻¹¹.

In diversi setting trapiantologici (trapianto MUD, sia HLA matched che HLA mismatched, e aploidentico) è stato riscontrato un miglior outcome in pazienti che hanno ricevuto il trapianto da donatori con genotipo di tipo B/X¹⁻³.

2. B content

Gli aplotipi *KIR* possono essere suddivisi in due regioni, denominate centromerica e telomerica, delimitate dalla presenza di due geni cornice, e dalla presenza di un sito ad alta frequenza di ricombinazione^{9,11}. Le principali regioni centromeriche sono Cen-A, Cen-B1 e Cen-B2. Le regioni Cen-A includono, oltre ai geni cornice, i geni *KIR2DL3*, *KIR2DP1* e *KIR2DL1*. Le regioni Cen-B sono caratterizzate dalla presenza di *KIR2DS2* e *KIR2DL2* e si suddividono in due sottogruppi. Cen-B1 include oltre ai geni cornice e a *KIR2DS2* e *KIR2DL2*, i geni *KIR2DL5B*, *KIR2DS3* (o *KIR2DS5* in donatori provenienti dall'Africa sub sahariana), *KIR2DP1* e *KIR2DL1*. Cen-B2 è più corto e manca dei geni *KIR2DL5B*, *KIR2DS3* (o *KIR 2DS5*), *KIR2DP1*, *KIR2DL1*. Le principali regioni telomeriche sono denominate Tel-A e Tel-B. Le regioni Tel-A includono, oltre ai geni cornice, i geni *KIR3DL1* e *KIR2DS4*, mentre le regioni Tel-B sono caratterizzate dalla presenza di *KIR3DS1*, *KIR2DL5A*, *KIR2DS3* (o *KIR2DS5*) e *KIR2DS1*. Sulla base dell'analisi delle regioni centromeriche e telomeriche è possibile assegnare il valore del B content². Il valore del B content, un numero compreso tra 0 e 4, deriva dal numero di regioni di tipo B presenti nel genotipo del donatore in esame (vedi Tabella 1).

Tabella 1

	Cen-A/Cen-A	Cen-A/Cen-B	Cen-B/Cen-B
Tel-A/Tel-A	0	1	2
Tel-A/Tel-B	1	2	3
Tel-B/Tel-B	2	3	4

Un valore di B content ≥ 2 è stato descritto come fattore positivo nella scelta del donatore MUD per la cura di pazienti adulti affetti da LAM ² ed è stato considerato un criterio di selezione per la scelta di donatori per trapianto aploidentico a pazienti di età pediatrica affetti da malattie emato-oncologiche ^{12, 13}.

Per l'analisi del valore del B content può essere utilizzato il sito "Donor KIR B-content group calculator" (https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html). In questo caso i genotipi dei possibili donatori saranno classificati come "Neutral, Better e Best". Come indicato nel sito, questa analisi **deve** essere compiuta nel caso di trapianti MUD e pazienti adulti affetti da leucemia mieloide acuta.

4 Alloreattività NK secondo il modello KIR/KIR-L mismatch in GvH direction

Sulla base di questo modello il donatore sarà caratterizzato dalla presenza di una popolazione NK alloreattiva quando avrà cellule NK che esprimono solamente un recettore KIR inibitorio in grado di riconoscere un KIR ligando "self" (e permettere così l'educazione della cellula NK) assente nel genotipo del ricevente (e permettere così l'eliminazione delle cellule leucemiche residue, effetto GvL) ^{5, 14-16}. La presenza di alloreattività NK può quindi essere predetta analizzando la tipizzazione HLA di Classe I sia del donatore che del ricevente e il genotipo *KIR* del donatore.

3.1 Analisi degli alleli HLA di classe I/KIR ligandi

Nella Tabella 2 sono riportati i principali KIR inibitori ed i loro KIR ligandi (KIR-L).

Tabella 2.

KIR	Allotipi HLA riconosciuti	KIR-L
KIR2DL1	HLA-C Lys80	C2
KIR2DL2/L3	HLA-C Asn80 HLA-B*46:01, HLA-B*73:01	C1
KIR3DL1	HLA-B e HLA-A Bw4	Bw4

Per "convertire" gli alleli HLA di classe I in KIR-L si può utilizzare il sito KIR ligandcalculator (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>) ed integrare i risultati ottenuti con le informazioni di alcune rilevanti pubblicazioni. In particolare è da notare che il programma: i) non rileva la presenza dell'epitopo C1 negli alleli HLA-B*46:01 e -B*73:01 ¹⁷, ii) considera HLA-B*13:01 e -B*13:02 ligandi di KIR3DL1 (mentre è stato dimostrato che questi due alleli non sono riconosciuti da questo KIR) ¹⁸, ii) non analizza il locus HLA-A e sarà quindi necessario assegnare "manualmente" la presenza dell'epitopo Bw4 qualora donatore e/o ricevente siano HLA-A*23, -A*24 o -A*32 positivi ^{18, 19}.

3.2 Analisi della presenza/assenza di alloreattività NK

I principali tipi di alloreattività (riassunti nella Tabella 3) sono indicati con il nome del KIR-ligando presente nel donatore e assente nel ricevente.

Tabella 3.

Tipo di alloreattività	KIR ligandi del donatore	KIR ligandi del ricevente	KIR del donatore “utile”
C1	C1 ^{pos}	C1 ^{neg}	KIR2DL2/L3
C2	C2 ^{pos}	C2 ^{neg}	KIR2DL1
Bw4	Bw4 ^{pos}	Bw4 ^{neg}	KIR3DL1
C1 + Bw4	C1 ^{pos} e Bw4 ^{pos}	C1 ^{neg} e Bw4 ^{neg}	KIR2DL2/L3 e KIR3DL1
C2 + Bw4	C2 ^{pos} e Bw4 ^{pos}	C2 ^{neg} e Bw4 ^{neg}	KIR2DL1 e KIR3DL1

L'analisi dell'alloreattività di tipo Bw4 **deve** tener conto del polimorfismo allelico del locus *KIR3DL1*. Alcuni alleli *KIR3DL1* codificano per recettori trattenuti nel citoplasma (*KIR3DL1*004*, **019*, **021*, **036*, **037*, **039*, **056*, **072*)^{20, 21}. Se l'analisi effettuata non permette di identificare alleli codificanti recettori di membrana, quindi funzionali, tale informazione **deve** essere inclusa nel referto.

4.3 Alloreattività non classica KIR2DS1 mediata

È stata dimostrato che le cellule NK KIR2DS1^{pos} possono riconoscere ed eliminare cellule leucemiche che esprimono molecole HLA-C con epitopo C2^{5, 8, 22}. Questa sottopopolazione NK è funzionale solamente in individui HLA-C1/C1 e HLA-C1/C2²². Per la presenza di alloreattività KIR2DS1 mediata il donatore **deve** essere KIR2DS1^{pos}, HLA-C1/x e il paziente **deve** avere almeno un allele HLA-C2^{pos}.

Pubblicazioni correlate

1. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. Jan 15 2009;113(3):726-32. doi:10.1182/blood-2008-07-171926
2. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. Oct 7 2010;116(14):2411-9. doi:10.1182/blood-2010-05-283051
3. Oevermann L, Michaelis SU, Mezger M, et al. KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood*. Oct 23 2014;124(17):2744-7. doi:10.1182/blood-2014-03-565069
4. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol*. Mar 2007;19(2):142-7. doi:10.1097/CCO.0b013e3280148a1a
5. Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the

- functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. Mar 26 2009;113(13):3119-29. doi:10.1182/blood-2008-06-164103
6. Mancusi A, Ruggeri L, Urbani E, et al. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood*. May 14 2015;125(20):3173-82. doi:10.1182/blood-2014-09-599993
 7. Ruggeri L, Parisi S, Urbani E, Curti A. Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:479. doi:10.3389/fimmu.2015.00479
 8. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med*. Aug 30 2012;367(9):805-16. doi:10.1056/NEJMoa1200503
 9. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. *The Journal of Immunology*. 2002;169(9):5118-5129. doi:10.4049/jimmunol.169.9.5118
 10. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene*. Jun 23 2004;335:121-31. doi:10.1016/j.gene.2004.03.018
 11. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, et al. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res*. Oct 2012;22(10):1845-54. doi:10.1101/gr.137976.112
 12. Locatelli F, Merli P, Pagliara D, et al. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood*. 2017;130(5):677-685. doi:10.1182/blood-2017-04-779769
 13. Locatelli F, Pende D, Falco M, Della Chiesa M, Moretta A, Moretta L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute leukemia. *Trends Immunol*. May 21 2018;doi:10.1016/j.it.2018.04.009
 14. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. Jul 1 1999;94(1):333-9.
 15. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Martelli MF, Velardi A. The impact of donor natural killer cell alloreactivity on allogeneic hematopoietic transplantation. *Transpl Immunol*. Aug 2005;14(3-4):203-6. doi:10.1016/j.trim.2005.03.008
 16. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. Jul 1 2007;110(1):433-40. doi:10.1182/blood-2006-07-038687
 17. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-Binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C Than KIR2DL3. *The Journal of Immunology*. 2008;180(6):3969-3979. doi:10.4049/jimmunol.180.6.3969
 18. Foley BA, De Santis D, Van Beelen E, Lathbury LJ, Christiansen FT, Witt CS. The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood*. Jul 15 2008;112(2):435-43. doi:10.1182/blood-2008-01-132902
 19. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. Aug 1 2008;112(3):708-10. doi:10.1182/blood-2008-02-137521
 20. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*. Dec 15 2003;171(12):6640-9. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6640

21. Alicata C, Pende D, Meazza R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: Improving alloreactive Bw4 donor selection by genotyping codon 86 of KIR3DL1/S1. *Eur J Immunol.* Jun 2016;46(6):1511-7. doi:10.1002/eji.201546236
22. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood.* Feb 11 2010;115(6):1166-74. doi:10.1182/blood-2009-09-245746