

con il patrocinio di:



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI CAGLIARI



ASL Cagliari  
Azienda socio-sanitaria locale

**XXXI**  
**Congresso**  
**Nazionale**

**AIBT**  
Associazione Italiana  
di Immunogenetica  
e Biologia dei Trapianti

**abstract book 2025**



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

**Cagliari, 2-4 ottobre 2025**

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24395-67</b>	NanoTYPE su piattaforma ONT: una nuova frontiera nella tipizzazione HLA	Pisapia Davide	D. Pisapia <sup>{1}</sup> , S. Capelli <sup>{1}</sup> , R. Masi <sup>{1}</sup> , S. Mattarozzi <sup>{1}</sup> , E. Matteucci <sup>{1}</sup> , A. Pallotti <sup>{1}</sup> , L. Pravisano <sup>{1}</sup> , M. Comiotto <sup>{1}</sup> , <S. Manfroi> <sup>{1}</sup>	1.Immunogenetica e biologia dei trapianti – IRCCS AOU Bologna – Policlinico di S.Orsola, Bologna	13
<b>AIB24423-59</b>	Identificazione di anticorpi anti-HLA donatore-specifici fissanti il complemento (C1q+DSA) mediante saggio in fase solida: convalida analitica per l'implementazione clinica	Sandron Ilaria	<I. Sandron> <sup>{1}</sup> , C. Sindici <sup>{1}</sup> , C. Cervellin <sup>{1}</sup> , E. Cecchini <sup>{1}</sup> , E. Testa <sup>{1}</sup> , A. Coletto <sup>{2}</sup> , G. Barillari <sup>{2}</sup> , D. Londero <sup>{1}</sup>	1.Laboratorio di Immunematologia e Immunogenetica, Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Az. San. Univ. Friuli Centrale - Udine 2.Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Az. San. Univ. Friuli Centrale - Udine	14
<b>AIB24435-62</b>	Validazione di un protocollo per l'analisi di dd-cfDNA su pazienti trapiantati di cuore	Pecoraro Alice	<A. Pecoraro> <sup>{1}</sup> , R. Bavetta <sup>{1}</sup> , I. Aiello <sup>{1}</sup> , S. Mistretta <sup>{1}</sup> , M. Blando <sup>{1}</sup> , F. Bruno <sup>{1}</sup> , F. Di Paola <sup>{1}</sup> , G. Davi <sup>{1}</sup> , C. Spinuzza <sup>{1}</sup> , A. Fontana <sup>{2}</sup> , R. Fedele <sup>{1}</sup> , V. Cappuzzo <sup>{1}</sup>	1.UOS HLA Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.C. Medicina Trasfusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello, Palermo 2.Divisione di Cardiologia, Istituto Specializzato del Mediterraneo per i Trapianti (ISMETT-IRCCS), Palermo	15
<b>AIB24436-63</b>	Perdita di eterozigotità dell'HLA (LOH) nelle recidive leucemiche post-trapianto in pazienti adulti	Galluccio Tiziana	<T. Galluccio> <sup>{1}</sup> , A. Novelli <sup>{2}</sup> , F. Frenza <sup>{3}</sup> , R. Cerretti <sup>{4}</sup> , G. De Angelis <sup>{4}</sup> , E. Santinelli <sup>{5}</sup> , V. Alesi <sup>{2}</sup> , G. Testa <sup>{1}</sup> , A. Di Luzio <sup>{1}</sup> , M. Andreani <sup>{1}</sup>	1.Laboratory of Immunogenetics and Transplant, Department of Oncohematology and cell and Gene Therapy, IRCCS Bambin Gesù Pediatric Hospital, Rome, Italy 2.Translational Cytogenomics Research Unit, Laboratory of Medical Genetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 3.Department of Biomedicine and Prevention, University Tor Vergata, Rome, Italy 4.Unità di Trapianto di Cellule Staminali, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Rome Transplant Network, Rome, Italy 5.Fondazione Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Via Alvaro del Portillo, 200, 00128 Roma, Italy	16

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24437-64</b>	Ruolo prognostico del CMV Antigen load nel trapianto aploidentico di CSE: analisi stratificata per stato sierologico donatore/ricevente	Milano Antonio	<A. Milano>^1, R. Crocchiolo^2, C. Scollo^1	1.Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza 2.Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano	17
<b>AIB24438-65</b>	Impiego di cellule CAR-T anti-CD19 per desensibilizzare un paziente iperimmune	Guzzo Isabella	I. Guzzo^1, M. Becilli^2, A. Cappoli^1, P. Merli^2, R. Labbadia^1, F. Del Bufalo^2, N. Tomas^3, M. Colucci^4, T. Huber^3, M. Algeri^2, <A. Bianculli>^5, M. Andreani^5, F. Emma^6, F. Locatelli^7	1.Division of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 2.Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 3.Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; Hamburg Center for Kidney Health (HCKH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf; 4.Laboratory of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 5.Laboratory of Transplant Immunogenetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 6.Division of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy; Laboratory of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy 7.Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy; Department of Pediatrics, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy	18
<b>AIB24439-66</b>	Un caso di HLA-Loss Pre-Trapianto in paziente con LLA-T, limiti della metodica NGS.	Toscano Sebastiana	<S. Toscano>^1, S. Leotta^2, E. Mauro^2, M. Azzaro^1	1.Laboratorio di Istocompatibilità-HLA - UOC di Ematologia con Trapianto di Midollo Osseo A.O.U. Policlinico-G.Rodolico - Catania 2.UOC di Ematologia con Trapianto di Midollo Osseo A.O.U. Policlinico-G.Rodolico - Catania	19

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24440-58</b>	HLA e identità genetica sarda: un viaggio lungo trent'anni	Murgia Michela	<M. Murgia>{1}, C. Sanna^{1}, S. Mocci^{2}, E. Zedda^{1}, C. Zonchedu^{1}, C. Mereu^{1}, M. Lorrain^{1}, G. Tosone^{1}, F. Cannas^{2}, A. Mascia^{3}, F. Marongiu^{1}, G. Nutile^{1}, S. Lai^{4}, E. Giuretti^{4}, S. Rassu^{4}, M. Floris^{5}, A. Perra^{3}, R. Littera^{4}, S. Giglio^{2}	1.Unità di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari 2.Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca (CeSAR), Università degli Studi di Cagliari, Cagliari 3.Sezione di Patologia, Unità di Oncologia e Patologia molecolare, Dipartimento di Scienze biomediche, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari 4.Unità di Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, Azienda Socio-Sanitaria Locale (ASSL) di Cagliari 5.Dipartimento di scienze biomediche, Università di Sassari, Sassari	20
<b>AIB24441-59</b>	Divergenza Evolutiva HLA e potenziale ruolo predisponente nello sviluppo di malattie oncoematologiche pediatriche	Madalese Donato	<D. Madalese>^{1}, L. Auriemma^{1}, M. Esposito^{1}, R. Colucci^{2}, F. Tambaro^{3}, R. Penta de Vera d'Aragona^{1}	1.UOSD BaSCO, manipolazione cellulare e Immunogenetica, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli 2.Servizio Immunotrasfusionale, Ospedale Madonna delle Grazie - ASM Matera, Matera 3.UOC TCE e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli	21
<b>AIB24442-60</b>	Case report: nuovo allele HLA A*03 Null identificato nel Registro dei Donatori CN01	Longa Lucia Assunta	L. Longa^{1}, <L. Perotti>^{1}, M. Prucca^{1}, R. Bavetta^{2}, S. Mistretta^{2}, R. Bruggiafreda^{1}, L. Calcagno^{1}, F. Piovano^{1}, I. Avonto^{1}, R. Balbo^{1}, L. Comba^{1}, L. Maddalena^{1}, P. Manzini^{1}	1.SCI Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - AO S. Croce e Carle, Cuneo 2.Laboratorio di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti, UOS HLA, AOOR Villa Sofia - Cervello, Palermo	22
<b>AIB24443-61</b>	Correlazione tra Eplet mismatch, AA mismatch, DSA e rigetto in pazienti pediatriche talassemiche con aplo-HSCT	Giustiniani Paola	<P. Giustiniani>^{1}, F. Galaverna^{2}, P. Merli^{2}, A. Bianculli^{1}, F. Quagliarella^{2}, M. Becilli^{2}, R. Carta^{2}, E. Boccieri^{2}, M. Troiano^{1}, R. Pinto^{2}, M. Battarra^{1}, M. Andreani^{1}, F. Locatelli^{3}	1.Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma 2.Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma 3.Dipartimento di Oncologia, Ematologia, Trapianto e Terapia Cellulare e Genica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma	23

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24444-62</b>	HLA e rischio di tossicità farmacologica: evidenze dalla popolazione sarda	Sanna Celeste	<C. Sanna>^1, M. Murgia^1, S. Mocci^2, E. Zedda^1, C. Zoncheddu^1, C. Mereu^1, M. Lorrai^1, L. Serventi^1, C. Cocco^1, F. Canas^2, A. Mascia^3, F. Marongiu^1, S. Lai^4, E. Giuressi^4, S. Rassu^4, M. Floris^5, A. Perra^6, S. Giglio^1	1. Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy 2. Centre for Research University Services (CeSAR, Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca), University of Cagliari, Monserrato, Italy 3. Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy 4. Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Italy 5. Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy 6. Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy	24
<b>AIB24445-63</b>	Tipizzazione ad alta risoluzione di donatori di cellule staminali ematopoietiche, dalle metodiche manuali all'automazione: l'esperienza del nostro centro.	Catalano Manuela	<M. Catalano>^1, F. Consoli^1, L. Florean^1, L. Fenici^1, P. Grammatico^1, A. Moscetti^1	1. U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica - A.O. San Camillo-Forlanini-Sapienza Università di Roma, Roma	25
<b>AIB24446-64</b>	Sequenziamento di nuova generazione e automazione: introduzione e validazione del sistema Hamilton Microlab STAR	Catalano Manuela	<M. Catalano>^1, F. Consoli^1, L. Florean^1, L. Fenici^1, P. Grammatico^1, A. Moscetti^1	1. U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica - A.O. San Camillo-Forlanini-Sapienza Università di Roma, Roma	26
<b>AIB24447-65</b>	Identificazione di nuovi alleli HLA mediante piattaforme NGS: Illumina vs Oxford Nanopore	Perotti Laura	<L. Perotti>^1, L. Longa^1, M. Prucca^1, B. Bruno^1, D. Pasio^1, F. Piovano^1, I. Avonto^1, R. Balbo^1, G. Bondielli^1, L. Maddalena^1, P. Manzini^1	1. SCI Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - AO S. Croce e Carle, Cuneo	27

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24448-66</b>	Follow-up nei riceventi trapianto di rene da donatore a cuore fermo (DCD): l'esperienza del NITp	TAGLIA-MACCO AUGUSTO	<A. Tagliamacco>^1, C. Radaelli^1, V. Caporale^1, A. Comino^1, F. Drago^1, A. Espadas De Arias^1, M. Guarene^1, E. Longhi^1, M. Ramondetta^1, V. Sioli^1, C. Brambilla^1, N. Cagni^1, S. Capogreco^1, S. Covotta^1, A. Innocente^1, M. Macchiagodena^1, B. Speringo^1, N. Suvajac^1, M. Tivelli^1, M. Cardillo^1	1.Laboratorio di Immunologia dei Trapianti - S.C. Trapianti Lombardia – NITp - IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Milano	28
<b>AIB24449-67</b>	Associazione tra profilo KIR/HLA e poliabortività: analisi in un gruppo di 61 donne italiane	Troiano Maria	<M. Troiano>^1, M. Falco^2, E. Vaquero^3, A. Guagnano^1, F. Besi^1, M. Andreani^1	1.Laboratory of Transplant Immunogenetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy. 2.Clinical and Experimental Immunology Lab, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy 3.IVIRMA Global Research Alliance, IVI Roma, Rome, Italy.	29
<b>AIB24450-59</b>	MICA-Met129Val e antifibrotici: il DNA come bussola terapeutica nell'IPF	Mereu Caterina	<C. Mereu>^1, S. Mocchi^2, R. Littera^3, S. Deidda^4, F. Cannas^2, C. Cocco^1, M. Lorrain^1, M. Murgia^1, G. Nutile^1, C. Sanna^1, L. Serventi^1, G. Tosone^1, E. Zedda^1, E. Giuressi^3, S. Lai^3, A. Perra^5, M. Floris^6, S. Giglio^1	1.Medical Genetics, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy 2.Centre for Research University Services (CeSAR, Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca), University of Cagliari, Italy 3.Medical Genetics, R. Binaghi Hospital, Cagliari, Italy 4.Pneumology Unit, R. Binaghi Hospital, Cagliari, Italy 5.Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Italy 6.Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, I-07100 Sardinia, Italy.	30

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24451-60</b>	HLA e nintedanib: il genoma svela la predisposizione agli effetti gastroenterostinali nella fibrosi polmonare	Lorrai Michela	<M. Lorrai> <sup>{1}</sup> , S. Mocchi <sup>{2}</sup> , R. Littera <sup>{3}</sup> , S. Deidda <sup>{4}</sup> , F. Cannas <sup>{2}</sup> , C. Cocco <sup>{1}</sup> , N. Marongiu <sup>{1}</sup> , C. Mereu <sup>{1}</sup> , M. Murgia <sup>{1}</sup> , G. Nutile <sup>{1}</sup> , C. Sanna <sup>{1}</sup> , L. Serventi <sup>{1}</sup> , V. Tedde <sup>{1}</sup> , G. Tosone <sup>{1}</sup> , E. Zedda <sup>{1}</sup> , E. Giuressi <sup>{3}</sup> , S. Lai <sup>{3}</sup> , A. Perra <sup>{5}</sup> , M. Floris <sup>{6}</sup> , S. Giglio <sup>{1}</sup>	1.Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Italia 2.Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca (CeSAR), Università degli Studi di Cagliari, Italia 3.Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, Cagliari, Italia 4.Unità Operativa di Pneumologia, Ospedale R. Binaghi, Cagliari, Italia 5.Unità di Oncologia e Patologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari, Italia 6.Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sardegna, Italia	31
<b>AIB24452-61</b>	L'HLA non classico non sembra essere associato alla risposta umorale al vaccino anti-COVID	Baudet Jean Baptiste	J. Baudet <sup>{1}</sup> , <R. Crocchiolo> <sup>{2}</sup> , C. Frassati <sup>{1}</sup> , A. Basire <sup>{1}</sup> , A. Gallina <sup>{3}</sup> , L. Veronese <sup>{2}</sup> , A. Pani <sup>{2}</sup> , F. Scaglione <sup>{2}</sup> , F. D'Amico <sup>{2}</sup> , L. Crucitti <sup>{4}</sup> , N. Sacchi <sup>{3}</sup> , E. Volpato <sup>{2}</sup> , P. Pedini <sup>{1}</sup> , C. Picard <sup>{1}</sup>	1.HLA laboratory, Etablissement Français du Sang, Marseille, France 2.Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy 3.Italian Bone Marrow Donor Registry, E. O. Ospedali Galliera Genova, Genova, Italy 4.Hematology Department, Azienda Sanitaria Provinciale di Trapani, Castelvetro, Italy	32
<b>AIB24453-62</b>	Analisi di associazione tra HLA Evolutionary Divergence e status sierologico CMV in una coorte di oltre 600 soggetti adulti	Garanzini Cristina	C. Garanzini <sup>{1}</sup> , J. Villemonteix <sup>{2}</sup> , D. Jorge-Cordeiro <sup>{2}</sup> , G. Grillo <sup>{1}</sup> , R. Cairoli <sup>{1}</sup> , G. Di Maggio <sup>{1}</sup> , G. Cornacchini <sup>{3}</sup> , G. Lando <sup>{3}</sup> , A. Sulejmani <sup>{3}</sup> , L. Toullec <sup>{2}</sup> , S. Caillat-Zucman <sup>{2}</sup> , V. Allain <sup>{2}</sup> , A. Milano <sup>{4}</sup> , E. Volpato <sup>{3}</sup> , <R. Crocchiolo> <sup>{3}</sup>	1.Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano 2.Laboratorio HLA, Hopital Saint-Louis, APHP Parigi 3.Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy 4.IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza	33
<b>AIB24454-63</b>	Anticorpi non-HLA e rischio immunologico: nuove prospettive nel trapianto di rene	LAMANNA ROBERTA	<R. Lamanna> <sup>{1}</sup> , S. Fornaciari <sup>{1}</sup> , E. Kauffmann <sup>{2}</sup> , V. De Gregorio <sup>{1}</sup> , N. Napoli <sup>{2}</sup> , C. Biagini <sup>{1}</sup> , M. Ginesini <sup>{2}</sup> , L. Felet <sup>{1}</sup> , D. Gonnella <sup>{1}</sup> , U. Boggi <sup>{2}</sup> , M. Curcio <sup>{1}</sup>	1.SOD Immunogenetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa 2.U.O. Chirurgia Generale e dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa	34



Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24455-64</b>	Singoli epitopi vs più epitopi: sensibilità e limiti del Crossmatch Citofluorimetrico.	DE GRE- GORIO VERONICA	<V. De Gregorio>^1, S. Fornaciari^1, R. Laman- na^1, C. Biagini^1, S. Di Beo^1, F. Salvadori^1, M. Curcio^1	1.SOD Immunogenetica, Azien- da Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa	35-36
<b>AIB24456-65</b>	HLAMatchmaker come strumento predittivo per lo sviluppo di de novo DSA nei trapianti di rene	Biagini Chiara	C. Biagini^1, G. Sca- tena^2, V. De Grego- rio^1, S. Fornaciari^1, R. Laman- na^1, E. Kauffmann^3, N. Napo- li^3, M. Ginesini^3, D. Mandarino^1, F. Gala- ti^1, U. Boggi^3, <M. Curcio>^1	1.SOD Immunogenetica, Azien- da Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italia 2.Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma, Italia 3.U.O. Chirurgia Generale e dei Trapianti, Azien- da Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italia	37
<b>AIB24457-66</b>	Predizione e diagnosi di rigetto nei pazienti sottoposti a trapianto di rene mediante utilizzo del DNA libe- ro da cellule derivate dal donatore (donor derived cell free DNA, dd-cfDNA)	Panarese Alessan- dra	<A. Panarese>^1, C. Cer- velli^2, I. Abruscio^1, G. Celenza^1, M. Tupo- ne^2, O. Valdez^2, S. Scipione^2, A. Canos- si^3, F. Vistoli^1, F. Papola^2	1.Dipartimento di Scienze Clini- che Applicate e Biotecnologi- che (DISCAB), Università degli Studi dell'Aquila, Via Vetoio, Coppito 2 – 67100 L'Aquila, Italia 2.UOC "Centro Regio- nale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - CRITT" - P.O. di L'Aquila 3.Istituto di Farmacologia Traslazionale - IFT - Sede Secondaria L'Aquila, Via Carducci, 32C. L'Aquila	38
<b>AIB24458-67</b>	Valutazione in Luminex dell'impat- to di un pannello di anticorpi non anti-HLA de novo in una popolazione di pazienti sottoposti a trapianto di polmone	Longhi Elena	<E. Longhi>^1, A. Innocente^1, V. Sio- li^1, N. Caponio^1, A. Comino^1, F. Drago^1, A. Espadas de Arias^1, S. Grando^1, M. Gua- rene^1, M. Ramondet- ta^1, C. Radaelli^1, A. Tagliamacco^1, C. Brambilla^1, N. Ca- gni^1, S. Capogreco^1, M. Macchiagodena^1, B. Speringo^1, M. Tivel- li^1, R. Torelli^1, M. Cardillo^1	1.Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lom- bardia NITp, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico di Milano	39



Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24459-68</b>	Cross-match citofuorimetrico pretrapianto nei pazienti in trattamento con RITUXIMAB: utilizzo di Pronase e anti-CD20.	Elena Longhi	<L. Elena>{1}, V. Sioli{1}, M. Ramondetta{1}, V. Caporale{1}, A. Comino{1}, F. Drago{1}, A. Espadas de Arias{1}, M. Guarene{1}, C. Radaelli{1}, A. Tagliamacco{1}, N. Caponio{1}, S. Dolzattelli{1}, S. Grando{1}, C. Brambilla{1}, N. Cagni{1}, S. Covotta{1}, A. Innocente{1}, M. Macchiagodena{1}, B. Speringo{1}, M. Cardillo{1}	1.Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lombardia NITP, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano	40
<b>AIB24460-60</b>	ddcfDNA nel follow up del trapianto di polmone: uno studio prospettico monocentrico	Longhi Elena	<E. Longhi>{1}, V. Sioli{1}, V. Caporale{1}, A. Comino{1}, S. Dolzattelli{1}, F. Drago{1}, A. Espadas de Arias{1}, M. Guarene{1}, M. Ramondetta{1}, A. Tagliamacco{1}, B. Alessia{1}, B. Denise{1}, L. Chidichimo{1}, M. Grassi{1}, N. Suvajac{1}, L. Morlacchi{2}, V. Rossetti{2}, P. Mendogni{3}, M. Nosotti{3}, M. Cardillo{1}	1.Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lombardia NITp, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano 2.S.C. Pneumologia e Fibrosi cistica, Dipartimento di Area Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano 3.Chirurgia Toracica E Trapianti Di Polmone, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano	41
<b>AIB24461-61</b>	Effetto prozona nei pazienti altamente sensibilizzati: il trattamento del siero con EDTA è efficace nel prevenirlo?	Cervelli Carla	<C. Cervelli>{1}, M. Tupone{1}, O. Valdez{1}, A. Lizzi{1}, M. Scimitarra{1}, R. Azzarone{1}, C. Battistoni{1}, S. Scacchi{1}, B. Spaziani{1}, S. Scipione{1}, D. Pulcinelli{1}, V. Torrelli{1}, A. Costanzi{1}, F. Papola{1}	1.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale - Ospedale Civile S.Salvatore, L'Aquila	42
<b>AIB24462-62</b>	Impatto del fattore "alloreattività" sulla sopravvivenza post trapianto di CSE da aploidentico con PTCy	Torrelli Vittoriano	V. Torrelli{1}, G. Celenza{2}, C. Cervelli{3}, D. Vaddinelli{4}, C. Bigazzi{5}, S. Santarone{4}, A. Natale{4}, O. Valdez{3}, M. Tupone{3}, R. Azzarone{3}, M. Scimitarra{3}, A. Lizzi{3}, C. Battistoni{3}, D. Pulcinelli{3}, A. Costanzi{3}, S. Scacchi{3}, B. Spaziani{3}, M. Falco{6}, <F. Papola>{3}	1.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale – Ospedale S.Salvatore, L'Aquila 2.Dipartimento scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche - Università degli Studi dell'Aquila 3.Centro Regionale di Immunematologia e Tipizzazione Tissutale - Ospedale Civile S.Salvatore, L'Aquila 4.Terapia Intensiva Ematologica-Ospedale Civile Pescara 5.UOC Ematologia e Terapia Cellulare AST Ascoli Piceno 6.4) Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale IRCCS Giannina Gaslini - Genova	43

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24463-63</b>	Inusuale associazione DRB1*08-DRB3*02 in un donatore d'organi	Giuliodori Silvia	<S. Giuliodori>{1}, C. Forroni{1}, S. Capriglia{1}, E. Gravagno{1}, S. Bardini{1}, G. Rombolà{1}	1.SDD Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria (AOU) di Parma	44
<b>AIB24464-64</b>	Presenza di comorbidità di varianti patologiche dell'HFE legate all'emocromatosi in pazienti sardi con fenotipo HLA associato alla celiachia.	Stradoni Roberta Daniela	<R. Stradoni>{1}, G. Cualbu{1}, P. Carta{2}, R. Meleddu{1}, A. Cosusu{1}, B. Onali{1}, R. Stradoni{3}	1.ASL Nuoro- P.O. San Francesco 2.ASL-Sassari P.O. Antonio Segni 3.Nuoro	45
<b>AIB24465-65</b>	Risoluzione di pattern reattivi atipici in test di valutazione anticorpi anti-HLA con piattaforma Luminox One Lambda mediante studio degli Epitopi	GIORGIO FLORIANA	<F. Giorgio>{1}, F. Viggiani{1}, P. Castellaneta{1}, A. Mellone{1}, M. Monteleone{1}, F. Bellini{1}, A. Latorre{1}, G. Mongelli{1}	1.LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI	46
<b>AIB24466-66</b>	Ottimizzazione dell'estrazione automatizzata del DNA salivare per la tipizzazione HLA: risultati in un contesto di crescente adesione di donatori al Registro	Castellaneta Patrizia Grazia	<P. Castellaneta>{1}, F. Viggiani{1}, F. Giorgio{1}, A. Spinelli{1}, F. Bellini{1}, A. Marinelli{1}, F. Matera{1}, G. Mongelli{1}	1.Laboratorio Tipizzazione Tessutale e Immunologia dei trapianti A.O.U.C. Policlinico Bari	47
<b>AIB24467-67</b>	Tipizzazione HLA e variabilità genetica: il caso di un allele non assegnabile	Castellaneta Patrizia Grazia	<P. Castellaneta>{1}, F. Viggiani{1}, F. Giorgio{1}, M. Monteleone{1}, A. Mellone{1}, A. Latorre{1}, G. Mongelli{1}	1.Laboratorio Tipizzazione Tessutale e Immunologia dei trapianti A.O.U.C. Policlinico Bari	48

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24468-68</b>	Analisi del polimorfismo del gene KLRC2: un nuovo biomarcatore nella selezione del donatore CSE aploidentico?	Falco Michela	<M. Falco> <sup>{1}</sup> , N. Zarefeizabadi <sup>{2}</sup> , P. Merli <sup>{3}</sup> , M. Di Duca <sup>{4}</sup> , M. Della Chiesa <sup>{5}</sup> , S. Sivori <sup>{5}</sup> , F. Locatelli <sup>{6}</sup> , C. Bottino <sup>{2}</sup>	1.Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova 2.Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale, IRCCS G. Gaslini, Genova; Dipartimento di Medicina Sperimentale, DIMES, Università degli Studi di Genova, Genova 3.Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica e di Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma 4.Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS G. Gaslini, Genova 5.Dipartimento di Medicina Sperimentale, DIMES, Università degli Studi di Genova, Genova 6.Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica e di Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; Dipartimento di Scienze della Vita e della Salute Pubblica, Università	49-50
<b>AIB24469-69</b>	Analisi degli epitopi HLA-DPB1 e valutazione del rischio immunologico in una paziente candidata a trapianto di CSE	VIGGIANI FABIO	F. Viggiani <sup>{1}</sup> , <F. Giorgio> <sup>{1}</sup> , P. Castellanea <sup>{1}</sup> , A. Mellone <sup>{1}</sup> , M. Monteleone <sup>{1}</sup> , F. Bellini <sup>{1}</sup> , A. Latorre <sup>{1}</sup> , F. Matera <sup>{1}</sup> , A. Spinelli <sup>{1}</sup> , P. Carluccio <sup>{2}</sup> , I. Attolico <sup>{2}</sup> , A. Marinelli <sup>{1}</sup> , G. Mongelli <sup>{1}</sup>	1.LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI 2.EMATOLOGIA CON TRAPIANTO A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI	51
<b>AIB24470-61</b>	Analisi avanzata degli epitopi in un campione: implicazioni diagnostiche e ottimizzazione dei pannelli antigenici	GIORGIO FLORIANA	<F. Giorgio> <sup>{1}</sup> , F. Viggiani <sup>{1}</sup> , P. Castellanea <sup>{1}</sup> , A. Mellone <sup>{1}</sup> , M. Monteleone <sup>{1}</sup> , F. Bellini <sup>{1}</sup> , A. Latorre <sup>{1}</sup> , F. Matera <sup>{1}</sup> , A. Spinelli <sup>{1}</sup> , A. Marinelli <sup>{1}</sup> , G. Mongelli <sup>{1}</sup>	1.LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI	52
<b>AIB24471-62</b>	PRIMUM NON DISCERNERE: come il BIAS di sesso e genere influenza il trapianto: la casistica in area NITp. Dati preliminari.	Ramondetta Miriam	<M. Ramondetta> <sup>{1}</sup> , R. Torelli <sup>{1}</sup> , V. Caporale <sup>{1}</sup> , A. Comino <sup>{1}</sup> , F. Drago <sup>{1}</sup> , A. Espadas <sup>{1}</sup> , E. Longhi <sup>{1}</sup> , V. Sioli <sup>{1}</sup> , A. Tagliamacco <sup>{1}</sup> , D. Bertola <sup>{1}</sup> , C. Brambilla <sup>{1}</sup> , N. Cagni <sup>{1}</sup> , M. Grassi <sup>{1}</sup> , A. Innocente <sup>{1}</sup> , M. Macchiagodena <sup>{1}</sup> , B. Speringo <sup>{1}</sup> , E. Soccio <sup>{1}</sup> , N. Suvajac <sup>{1}</sup> , M. Tivelli <sup>{1}</sup> , M. Cardillo <sup>{1}</sup>	1.Laboratorio di Immunologia dei Trapianti - S.C. Trapianti Lombardia-NITp, IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano	53

Codice	Titolo	Primo autore	Autori con apici	Affiliazioni numerate	Pag.
<b>AIB24472-63</b>	HLA-G 14 bp ins/del e gravità della celiachia: analisi allelica e genotipica in una coorte italiana	Prezioso Carmen Tania	<C. Prezioso> <sup>{1}</sup> , A. Pasi <sup>{1}</sup> , A. De Silvestri <sup>{2}</sup> , I. Sbarsi <sup>{1}</sup> , M. Torchio <sup>{1}</sup> , P. Bergamaschi <sup>{1}</sup> , C. Bottazzi <sup>{1}</sup> , M. Monti <sup>{1}</sup> , S. Caimmi <sup>{3}</sup>	1.Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 2.SSD Biostatistica e Clinical Trial Center -Direzione Scientifica, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia 3.Dipartimento di Pediatria, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia	54
<b>AIB24473-64</b>	Cellule NK e COVID-19: possibile ruolo delle interazioni KIR-HLA nella gravità clinica	Prezioso Carmen Tania	<C. Prezioso> <sup>{1}</sup> , A. Pasi <sup>{1}</sup> , C. Fornara <sup>{2}</sup> , R. Cacciatore <sup>{1}</sup> , I. Sbarsi <sup>{1}</sup> , M. Torchio <sup>{1}</sup> , P. Bergamaschi <sup>{1}</sup> , C. Bottazzi <sup>{1}</sup> , M. Monti <sup>{1}</sup> , M. Furione <sup>{3}</sup> , P. D'Angelo <sup>{3}</sup> , D. Lillieri <sup>{3}</sup> , F. Baldanti <sup>{4}</sup> , C. Perotti <sup>{5}</sup>	1.Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia 2.Servizio di Medicina di Laboratorio, ICS Mauge-ri, Pavia 3.Microbiologia e Virologia, IRCCS Foundation, Policlinico San Matteo, Pavia 4.Microbiologia e Virologia, IRCCS Foundation, Policlinico San Matteo;Dipartimento di Scienze Clinico Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Università di Pavia, Pavia 5.Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia	55
<b>AIB24474-65</b>	Incremento degli anticorpi anti-recettore dell'endotelina-1 di tipo A (ETAR) e correlazione con esiti clinici e istologici nel trapianto di rene pediatrico	Demirkilic Ezgi	<E. Demirkilic> <sup>{1}</sup> , M. Vadori <sup>{1}</sup> , S. Negrisol <sup>{2}</sup> , B. Antoniello <sup>{2}</sup> , E. Vianello <sup>{3}</sup> , J. Igeno San Miguel <sup>{3}</sup> , E. Benetti <sup>{3}</sup> , E. Cozzi <sup>{1}</sup>	1.Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova, Padova 2.Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale-Università di Padova, Padova 3.UOC Nefrologia Pediatrica, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale-Università di Padova, Padova	56

**Abstract Code: AIB24395-67**

## **NanoTYPE su piattaforma ONT: una nuova frontiera nella tipizzazione HLA**

D. Pisapia 1, S. Capelli 1, R. Masi 1, S. Mattarozzi 1, E. Matteucci 1, A. Pallotti 1, L. Pravisano 1, M. Comiotto 1, S. Manfroi 1

(1) Immunogenetica e biologia dei trapianti – IRCCS AOU Bologna – Policlinico di S.Orsola, Bologna

*Introduzione:* La tipizzazione HLA ad alta risoluzione (HR) è fondamentale nella pratica clinica dei trapianti per identificare la migliore compatibilità donatore-ricevente ai fini dell'outcome a lungo termine. L'avvento delle nuove tecnologie per il sequenziamento di terza generazione, noto come Long Reads Sequencing, utilizza nanopori in grado di analizzare frammenti di DNA di diverse Kb.

*Obiettivi:* Lo scopo del progetto è l'utilizzo di kit commerciali, IVDR approved, di Omixon (Werfen) per eseguire la tipizzazione molecolare HLA di 11 loci (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1,3,4,5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1), e verificare i tempi di esecuzione (DNA to results) e la correlazione con la tipizzazione nota eseguita con altra metodologia NGS in uso presso il nostro laboratorio.

*Risultati e discussione:* Sono stati selezionati 7 DNA di donatori e pazienti, estratti da materiale biologico differente (sangue periferico, saliva) e precedentemente tipizzati mediante tecnologia NGS Illumina con il kit ALL-Type NGS - Thermofisher OneLambda. È stato introdotto un controllo negativo (acqua distillata DNase/RNase free). Sono stati utilizzati i kit commerciali di Omixon (NanoTYPE) per eseguire la tipizzazione molecolare HLA per gli 11 loci target. Escluso il tempo di estrazione del DNA, il tempo complessivo per ottenere il risultato è stato inferiore alle 20 ore.

L'allestimento della PCR prevede 200 ng complessivi di DNA per campione. La durata della PCR è di 2,5 ore. La fase successiva prevede un solo step di quantificazione, uno di normalizzazione e il successivo legame ai barcode (ONT Rapid Barcoding Kit 96 - Q-SQK-RBK110.96). La reazione di barcoding ha una durata di 2 minuti. La fase di preparazione della libreria finale si completa mediante un solo step di lavaggi con biglie. Per la fase di sequenziamento è stato utilizzato MinION MK1b e il software MinKNOW (vs 22.05.5). Il tempo di sequenziamento è stato di 12 ore, in accordo con le istruzioni all'uso del produttore (Omixon – Werfen). Tuttavia è possibile fermare il sequenziamento ogni 20 minuti e analizzare i Fastq file generati. I file Fastq generati sono stati elaborati ed interpretati con il software NanoTYPER ver 2.2 e allele IMGT database 3.58, con un tempo di analisi inferiore a 2 min per campione. Il livello di concordanza con la precedente tipizzazione NGS è stato del 100% con risoluzione P-Group limitata al locus HLA-DRB1. Inoltre, è stata identificata una tipizzazione rara a livello del locus DPB1, non precedentemente rilevata con metodi convenzionali, e una omozigosi a livello del locus DRB5.

*Conclusioni:* La tecnologia ONT con il kit NanoTYPE si è dimostrata efficace ed affidabile per la tipizzazione HLA ad alta risoluzione. Il workflow rapido, la flessibilità nel modulare il numero dei campioni da analizzare ed i risultati di qualità rendono questa tecnologia applicabile nella pratica diagnostica e nella ricerca clinica per una gestione personalizzata dei pazienti.

Abstract Code: AIB24423-59

## Identificazione di anticorpi anti-HLA donatore-specifici fissanti il complemento (C1q+DSA) mediante saggio in fase solida: convalida analitica per l'implementazione clinica

I. Sandron <sup>1</sup>, C. Sindici <sup>1</sup>, C. Cervellin <sup>1</sup>, E. Cecchini <sup>1</sup>, E. Testa <sup>1</sup>, A. Coletto <sup>2</sup>, G. Barillari <sup>2</sup>, D. Londero <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunoematologia e Immunogenetica, Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Az. San. Univ. Friuli Centrale - Udine, (2) Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Az. San. Univ. Friuli Centrale - Udine

**INTRODUZIONE** Negli ultimi 15 anni, gli anticorpi anti-HLA donatore-specifici capaci di legare il complemento (C1q+DSA) hanno ricevuto crescente attenzione per il loro ruolo nel rigetto d'organo anticorpo mediato (AMR). Circa il 50% degli anticorpi IgG, in particolare IgG1 e IgG3, è in grado di legare la subunità C1q e attivare la cascata del complemento, sebbene con efficacia variabile. Gli studi finora si sono concentrati prevalentemente su trapianti renali in adulti e su trapianti renali e cardiaci in età pediatrica. Tuttavia, anche nel trapianto di CSE (HSCT), il rilevamento dei C1q+DSA si sta affermando nella pratica clinica, sia in fase di selezione del donatore che nel monitoraggio post-trapianto. Poiché l'introduzione di un test in ambito diagnostico richiede una convalida analitica prima dell'uso, sono state condotte prove di accuratezza e precisione, mediante test di diluizione e ripetibilità/riproducibilità, ed è stata valutata la concordanza dei risultati con un laboratorio esterno, in assenza di programmi di controllo di qualità esterni o metodi di riferimento condivisi.

**MATERIALI E METODI** C1q+DSA sono stati rilevati mediante il kit *C1qScreen* (One Lambda), su sistema *LabScan 3D* (Luminex). I campioni utilizzati nelle prove sono 6 sieri da paziente post-HSCT e 3 campioni di VEQ forniti dall'ISS. Tutti i sieri sono stati pretrattati mediante incubazione a 56°C per 30 minuti. L'accuratezza diagnostica in termini di sensibilità analitica è stata valutata mediante diluizione 1:10 su campioni ad alto MFI, sia in classe I che in classe II. La precisione diagnostica è stata valutata mediante test di riproducibilità inter-dosaggio tra due sessioni analitiche con 8 campioni ciascuna e inter-laboratorio tramite il confronto dei risultati ottenuti da un laboratorio esterno su un campione di controllo di qualità fornito dall'ISS; e test di ripetibilità intra-dosaggio, mediante test in duplicato di 3 campioni selezionati casualmente nella stessa sessione. I risultati sono stati espressi come coefficiente di variazione medio (CV%) per i test di precisione. Le MFI grezze sono state normalizzate rispetto al controllo negativo.

**RISULTATI** I risultati evidenziano ottimi livelli di precisione, con un CV=0,96% per la ripetibilità intra-dosaggio, un CV=4,22% per la riproducibilità inter-dosaggio ed un CV=5,99% per la riproducibilità inter-laboratorio. Le prove di diluizione eseguite sia con siero negativo che con fisiologica hanno confermato la sensibilità del metodo, con effetto differenziale sulle diverse specificità anticorpali.

### CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno consentito di convalidare il metodo di identificazione dei C1q+DSA al fine della sua introduzione nella pratica clinica. I dati raccolti confermano l'affidabilità e la robustezza del test ma, ai fini della sua standardizzazione e di garantire una corretta interpretazione dei risultati sarà necessario incrementare il numero dei campioni testati inter-laboratorio, in attesa di VEQ dedicate.

**Abstract Code: AIB24435-62**

## **Validazione di un protocollo per l'analisi di dd-cfDNA su pazienti trapiantati di cuore**

A. Pecoraro <sup>1</sup>, R. Bavetta <sup>1</sup>, I. Aiello <sup>1</sup>, S. Mistretta <sup>1</sup>, M. Blando <sup>1</sup>, F. Bruno <sup>1</sup>, F. Di Paola <sup>1</sup>, G. Davì <sup>1</sup>, C.E. Spinuzza <sup>1</sup>, A. Fontana <sup>2</sup>, R. Fedele <sup>1</sup>, V. Cappuzzo <sup>1</sup>

(1) UOS HLA Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti - U.O.C. Medicina Trasfusionale e dei Trapianti - A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello, Palermo, (2) Divisione di Cardiologia, Istituto Specializzato del Mediterraneo per i Trapianti (ISMETT-IRCCS), Palermo

Il DNA libero circolante (cf-DNA) è rappresentato da frammenti di DNA di 150-180 bp per lo più di derivazione nucleare rilasciato nel sangue per apoptosi. Dopo trapianto di organo solido, le cellule del donatore possono rilasciare cf-DNA, detto cf-DNA derivante dal donatore (dd-cfDNA), come conseguenza di danno tissutale dovuto a rigetto o altre complicanze post-trapianto. C'è un notevole interesse tra i clinici per l'utilizzo del dd-cfDNA come biomarcatore non invasivo per il monitoraggio dei pazienti trapiantati così da poter diminuire il numero di biopsie di sorveglianza e promuovere una terapia personalizzata ottimizzando i livelli di farmaci immunosoppressori. Studi clinici hanno evidenziato che il dd-cfDNA potrebbe rivelare precocemente un danno emergente del trapianto ancora prima che gli altri parametri funzionali si allontanino dai valori normali. Esistono diverse metodiche che riguardano soprattutto il processo di raccolta, conservazione, estrazione e analisi del cfDNA. Inoltre, la soglia di positività per il rigetto, o danno d'organo è variabile a seconda dell'organo trapiantato e della metodica utilizzata. Non è possibile quindi stabilire un'unica percentuale di dd-cfDNA valida per tutti i tipi di trapianto e per tutti i metodi. Per questi motivi, abbiamo deciso di quantificare il dd-cfDNA nel plasma di un paziente sottoposto a trapianto di cuore. Il metodo di analisi è basato su NGS e il dd-cfDNA è discriminato sfruttando brevi inserzioni e delezioni come marcatori genetici, che sono selezionate all'interno di regioni polimorfiche per essere donatore-specifiche o ricevente-specifiche. Il paziente selezionato, D.G.M di 54 anni affetto da insufficienza cardiaca avanzata su base ischemica sottoposto ad impianto di LVAD in data 08/06/23 complicato da infezione della driveline. In data 11/01/25 è stato sottoposto a trapianto cardiaco con donatore tipizzato nel nostro Laboratorio ed è stato indotto con metilprednisone e basiliximab. Il decorso clinico è stato complicato da numerosi episodi di rigetto alle biopsie endomiocardiche. Sul siero studiato dopo 15 gg dal trapianto abbiamo evidenziato la comparsa del DSA anti-A1 con un valore di 3.882 MFI e dei seguenti anticorpi (MFI): Cw14(3575), Cw7(3175), A69(2455), Cw4(2449), Cw6(2223), B8(2030). In data 06/06/2025 è stato eseguito un prelievo utilizzando provette specifiche per l'isolamento del cfDNA, e il plasma è stato separato immediatamente secondo il protocollo di doppia centrifugazione. Il valore di dd-cfDNA ottenuto è stato dello 0.57%, superiore rispetto al cut-off di riferimento per il cuore di 0.15%. Sul siero prelevato contestualmente sono stati rilevati i seguenti anticorpi: A69(4286), A\*33:03(3128), A68(2341), A\*34:02(2321), B8(2099), A1(2099). I dati qui descritti suggeriscono l'utilità di monitorare i livelli di dd-cfDNA per questo paziente e di estendere le analisi per valutare i risultati di dd-cfDNA anche per pazienti di cui non abbiamo a disposizione il typing del donatore.



Abstract Code: AIB24436-63

## Perdita di eterozigotità dell'HLA (LOH) nelle recidive leucemiche post-trapianto in pazienti adulti

T. Galluccio <sup>1</sup>, A. Novelli <sup>2</sup>, F. Frenza <sup>3</sup>, R. Cerretti <sup>4</sup>, G. De Angelis <sup>4</sup>, E. Santinelli <sup>5</sup>, V. Alesi <sup>2</sup>, G. Testa <sup>1</sup>, A. Di Luzio <sup>1</sup>, M. Andreani <sup>1</sup>

(1) Laboratory of Immunogenetics and Transplant, Department of Oncohematology and cell and Gene Therapy, IRCCS Bambin Gesù Pediatric Hospital, Rome, Italy, (2) Translational Cytogenomics Research Unit, Laboratory of Medical Genetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (3) Department of Biomedicine and Prevention, University Tor Vergata, Rome, Italy, (4) Unità di Trapianto di Cellule Staminali, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Rome Transplant Network, Rome, Italy, (5) Fondazione Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Via Alvaro del Portillo, 200, 00128 Roma, Italy

**La perdita di eterozigotità dell'HLA (Loss of Heterozygosity, LOH)** rappresenta un meccanismo di evasione immunitaria osservato nelle recidive leucemiche dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) nei pazienti affetti da neoplasie ematologiche. Questo fenomeno biologico si verifica quando le cellule tumorali perdono selettivamente l'aplotipo HLA responsabile del mismatch immunologico, duplicando invece l'aplotipo condiviso con il donatore. Tale processo porta a un'omozigosi per l'HLA comune tra donatore e ricevente, permettendo così alle cellule leucemiche di eludere il controllo immunitario del donatore, ovvero la graft-versus-host leukemia. Studi clinici riportano una frequenza di LOH pari a circa il 30% nelle recidive post-HSCT da donatori aploidentici e fino al 10% nei trapianti da donatori non consanguinei. Dal 2014 al 2025 presso il programma trapianto metropolitano Rome Transplant Network sono stati sottoposti a trapianto allogenico **216 pazienti adulti affetti da Leucemia Acuta Mieloide**. Di questi **93, 39 hanno ricevuto il trapianto di midollo non manipolato con profilassi della GVHD ATG-based**. Di tutti i pazienti sono stati analizzati campioni biologici per lo studio del chimerismo. **In 4 dei 39 pazienti in recidiva dopo trapianto**, è stata studiata e confermata **l'LOH dopo trapianto**. Questo meccanismo di evasione immunitaria si è manifestato nei pazienti in un momento specifico della recidiva, ovvero, quando la condizione di chimerismo misto (MC) è apparso evidente con una quota di cellule del donatore nel midollo osseo compresa tra il 14-26%. I pazienti analizzati hanno mostrato la presenza di MC, valutata mediante il monitoraggio routinario dell'attecchimento tramite analisi dei polimorfismi Short Tandem Repeat (STR). La condizione di LOH è stata identificata utilizzando l'NGS (Next-Generation Sequencing), e confermata tramite SNP-array. In tre di questi pazienti con LAM, la recidiva è stata associata alla presenza del 14%-26% di cellule del donatore nel midollo osseo post-HSCT. L'analisi SNP-array ha evidenziato una LOH con un profilo misto localizzato nella regione cromosomica 6pter→6p12.2. La regione 6p24.3→6p21.33 (coordinate hg38: 10 Mb-31.6 Mb) ha mostrato una perdita selettiva di alleli non condivisi, confermando una fuga immunologica dei blasti leucemici tramite LOH dei geni HLA di I e II classe. La tipizzazione HLA eseguita sul DNA pre-trapianto dei 4 casi era discordante rispetto a quella ottenuta post-trapianto a conferma della perdita selettiva dell'aplotipo non condiviso. Il monitoraggio dei pazienti per la rilevazione della LOH con metodica affidabile è fondamentale, al fine di considerare tempestivamente strategie terapeutiche, tra cui un secondo trapianto da un donatore diverso o l'impiego di terapie cellulari innovative. L'uso combinato dell'NGS e degli SNP-array rappresenta un valido supporto nel monitoraggio dell'LOH e nella gestione delle recidive post-HSCT.

**Abstract Code: AIB24437-64**

## **Ruolo prognostico del CMV Antigen load nel trapianto aploidentico di CSE: analisi stratificata per stato sierologico donatore/ricevente**

A. Milano <sup>1</sup>, R. Crocchiolo <sup>2</sup>, C.M. Scollo <sup>1</sup>

(1) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza, (2) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

### **Introduzione**

Il Cytomegalovirus antigen load (CMV Ag load) rappresenta una stima bioinformatica della capacità delle molecole HLA di un individuo di presentare peptidi del CMV come quelli derivati dalle proteine immunodominanti IE1 e pp65, al sistema immunitario. Studi precedenti, hanno suggerito un'associazione tra elevato valore di Ag load e migliore outcome post-trapianto, interpretando tale dato come indice di una risposta immunitaria T-mediata più efficace. Questo studio estende l'analisi utilizzando un dataset reso disponibile dal CIBMTR, con l'obiettivo di esplorare l'associazione tra Ag load e mortalità, stratificando per stato sierologico CMV donatore/ricevente (D/R) e quartili di Ag load.

### **Metodi**

Sono stati inclusi 385 pazienti sottoposti a trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche (HSCT), L'Ag load è stato suddiviso in quartili. Sono stati inclusi il secondo (Q2) e il quarto (Q4) quartile, per favorire un confronto metodologicamente solido tra una stimolazione "mediana" e una "elevata" in termini di carico antigenico. I pazienti sono stati stratificati in quattro gruppi sierologici: D+/R+ (CMV0), D+/R- (CMV1), D-/R+ (CMV2), D-/R- (CMV3). Sono state effettuate analisi di regressione logistica (OR), Poisson (IRR) e Cox (HR).

### **Risultati**

In nessun sottogruppo è stata raggiunta significatività statistica, probabilmente per limitata numerosità campionaria. Tuttavia, in CMV0, CMV1 e CMV2, la mortalità è risultata sistematicamente più alta nel Q2 rispetto al Q4 (50% vs 43%, 62% vs 41%, 49% vs 45%). I boxplot mostrano mediane di Ag load più alte nei pazienti vivi rispetto ai deceduti (differenza >20 unità), in tutte le categorie sieropositive. In CMV3 (D-/R-), invece, le mediane erano sovrapponibili e i tassi di mortalità praticamente identici (Q2: 46%, Q4: 44%).

### **Discussione**

I risultati rafforzano l'ipotesi che il valore prognostico dell'Ag load sia fortemente dipendente dalla presenza di memoria immunologica anti-CMV. Nei soggetti naive (CMV3), anche un Ag load elevato non è in grado di indurre una risposta protettiva in tempo utile. Le curve di Kaplan-Meier mostrano tendenze coerenti, in particolare per CMV1, dove la sopravvivenza in Q2 è peggiore rispetto a Q4. L'assenza di significatività statistica ( $p \geq 0.2$ ) riflette la necessità di coorti più ampie per validare i trend osservati.

### **Conclusioni**

Lo studio conferma e approfondisce l'ipotesi secondo cui l'Ag load HLA-specifico per CMV rappresenta un potenziale biomarcatore prognostico, ma solo in soggetti con preesistente immunità. Nei pazienti D-/R-, lo stato naive è il determinante principale dell'outcome. L'Ag load potrebbe diventare un utile strumento di stratificazione immunologica in ambito post-trapianto, soprattutto se validato in studi multicentrici prospettici.

Abstract Code: AIB24438-65

## Impiego di cellule CAR-T anti-CD19 per desensibilizzare un paziente iperimmune

I. Guzzo <sup>1</sup>, M. Becilli <sup>2</sup>, A. Cappoli <sup>1</sup>, P. Merli <sup>2</sup>, R. Labbadia <sup>1</sup>, F. Del Bufalo <sup>2</sup>, N.M. Tomas <sup>3</sup>, M. Colucci <sup>4</sup>, T.B. Huber <sup>3</sup>, M. Algeri <sup>2</sup>, A.G. Bianculli <sup>5</sup>, M. Andreani <sup>5</sup>, F. Emma <sup>6</sup>, F. Locatelli <sup>7</sup>

(1) Division of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (2) Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (3) Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; Hamburg Center for Kidney Health (HCKH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, (4) Laboratory of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (5) Laboratory of Transplant Immunogenetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (6) Division of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy; Laboratory of Nephrology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy, (7) Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy; Department of Pediatrics, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

La presenza di anticorpi anti-HLA in pazienti altamente sensibilizzati rappresenta un ostacolo nella ricerca di un potenziale donatore per il trapianto di rene. Le convenzionali strategie di desensibilizzazione, come ad esempio l'utilizzo di plasmaferesi o Rituximab mostrano un'efficacia limitata nei casi più complessi, mentre, l'Imlifidase, rappresenta un'opzione promettente la cui efficacia a lungo termine resta ancora da dimostrare. In questo studio descriviamo il trattamento con cellule CAR-T anti-CD19 infuse in un paziente in attesa di ritrapianto di rene, per eradicare i linfociti B memoria e le plasmacellule precoci, responsabili della produzione di Ab-anti-HLA.

Un paziente pediatrico, inserito nuovamente in lista di attesa dopo recidiva di FSGS (Glomerulosclerosi focale e segmentale) sul primo trapianto di rene, presentava un D-PRA del 92% (MFI max anti HLA-A\*01:01 di 28.500) in cl. I e 89% in cl. II (MFI max anti HLA-DRB1\*11:04 di 10.000), con Ab-anti-HLA ad alto titolo diretti in particolare nei confronti degli antigeni HLA mismatched del primo donatore. Considerata la refrattarietà alle terapie convenzionali è stato deciso, dopo approvazione del Comitato Etico, di trattare il paziente con cellule CAR-T. Al terzo mese successivo al trattamento abbiamo osservato una lieve riduzione del D-PRA in classe I (85%), ma con valori di MFI che mostravano una significativa riduzione solo verso antigeni HLA non appartenenti al primo donatore. La presenza di Ab-anti-HLA è stata poi monitorata attraverso sette diverse determinazioni sui sieri ai giorni +78, +86, +114, +142, +168, +213 +224 successivamente al trattamento con CAR-T, riscontrando una graduale diminuzione del valore di MFI nel tempo. L'ultima determinazione, prima del secondo trapianto da cadavere, mostrava un D-PRA del 76% in cl. I (MFI max anti HLA-A\*01:01 15.800) e 66% in cl. II (MFI max anti HLA-DRB1\*11:04 2.800). Interessante è stato osservare la completa scomparsa della sensibilizzazione anti-HLA del paziente, con un PRA Classe I e II= 0%, nelle quattro diverse indagini sui sieri del paziente dopo 12, 15, 18 e 26 mesi dal trattamento con CAR-T, ovvero a 4, 7, 10 e 18 mesi dal secondo trapianto.

Una progressiva riduzione dei livelli anticorpali anti-HLA è stata osservata in un paziente pediatrico iperimmune dopo trattamento con cellule CAR-T, a seguito di sviluppo di condizione di iperimmunità dopo fallimento di primo trapianto di rene. Questo trattamento sembra offrire un beneficio duraturo, agendo sulla fonte cellulare della risposta umorale, rispetto all'azione rapida ma transitoria dell'Imlifidase, che degrada le IgG preformate con un rischio di "rebound" anticorpale. Tuttavia, l'utilizzo delle CAR-T, teso alla desensibilizzazione di Ab-anti-HLA, resta una opzione per ora in fase sperimentale, che andrà consolidata attraverso l'osservazione della sua potenzialità in un gruppo ampio di pazienti, tenendo presente, tra gli altri aspetti, anche gli elevati costi del trattamento.

Abstract Code: AIB24439-66

## Un caso di HLA-Loss Pre-Trapianto in paziente con LLA-T, limiti della metodica NGS.

S. Toscano <sup>1</sup>, S. Leotta <sup>2</sup>, E. Mauro <sup>2</sup>, M. Azzaro <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Istocompatibilità-HLA - UOC di Ematologia con Trapianto di Midollo Osseo A.O.U. Policlinico-G. Rodolico - Catania, (2) UOC di Ematologia con Trapianto di Midollo Osseo A.O.U. Policlinico-G. Rodolico - Catania

La leucemia è una malattia complessa in cui mutazioni e altre anomalie genomiche ed epigenomiche giocano un ruolo sia nel suo inizio che nella sua progressione. Raramente sono stati descritti pazienti affetti da LLA con perdita di eterozigotità nella regione HLA prima del trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE).

Riportiamo un caso di una paziente femmina, 50 anni, affetta da LLA-T per la quale, ad esordio di malattia, era stato richiesto lo studio HLA familiare.

Nella prima tipizzazione HLA, la paziente è risultata **omozigote per i loci di prima e seconda classe**, HLA aploidentica con le due sorelle, HLA diversa dal fratello. Il DNA era stato estratto da sangue intero con metodica automatica e tipizzato come di routine con sequenziamento di nuova generazione (NGS).

In assenza di donatore familiare HLA identico è stata avviata l'attivazione di ricerca di donatore da registri internazionali ed erano stati proposti n. 2 donatori MUD per invio campione.

Un secondo campione di sangue della paziente prelevato per Test di Conferma e tipizzato con la stessa tecnica ha rivelato, in contrasto col precedente, **eterozigosi sui loci di prima e seconda classe**, e conseguentemente la paziente risulta HLA fenotipicamente identica alle 2 sorelle ed HLA aploidentica al fratello.

Si è deciso quindi di testare il primo campione con altre metodiche: la PCR-SSP ha evidenziato combinazione allelica eterozigote sui loci di prima classe, con un segnale di amplificazione debole per gli alleli dell'aplotipo LOSS, mentre l'NGS aveva dato omozigosi.

Il primo campione era stato prelevato dalla paziente in crisi blastica. La discrepanza dei risultati di tipizzazione e l'individuazione di 3 aplotipi della famiglia, sebbene non sia stato possibile eseguire ulteriori indagini, consente di ipotizzare la mancata espressione di un aplotipo di classe I e II in un elevato numero di blasti circolanti.

I risultati ottenuti sul primo campione con NGS, dimostrano che un'amplificazione locus specifica non permette di individuare una combinazione eterozigote qualora uno dei due alleli sia presente in una bassa percentuale di cellule. L'utilizzo dell'amplificazione allele specifica con SSP è stata decisiva per verificare la corretta tipizzazione. Sebbene NGS sia oggi la metodica di elezione per la tipizzazione del candidato a trapianto di CSE, il nostro caso ribadisce la necessità di conferma con SSP in caso di omozigosi.

La mancata espressione degli antigeni HLA di classe I e II, *HLA loss*, consente alle cellule tumorali di sfuggire all'immunosorveglianza. E' frequente nei tumori solidi e nelle leucemie dopo trapianto di cellule staminali ma poco osservata nelle leucemie prima del trapianto. Nel trapianto di CSE, *HLA loss* può determinare errori nella tipizzazione per ricerca di un donatore compatibile.

Abstract Code: AIB24440-58

## HLA e identità genetica sarda: un viaggio lungo trent'anni

M. Murgia <sup>1</sup>, C. Sanna <sup>1</sup>, S. Mocci <sup>2</sup>, E. Zedda <sup>1</sup>, C. Zoncheddu <sup>1</sup>, C. Mereu <sup>1</sup>, M. Lorrari <sup>1</sup>, G.M. Tosone <sup>1</sup>, F. Cannas <sup>2</sup>, A. Mascia <sup>3</sup>, F. Marongiu <sup>1</sup>, G. Nutile <sup>1</sup>, S. Lai <sup>4</sup>, E. Giuressi <sup>4</sup>, S. Rassu <sup>4</sup>, M. Floris <sup>5</sup>, A. Perra <sup>3</sup>, R. Littera <sup>4</sup>, S. Giglio <sup>2</sup>

(1) Unità di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, (2) Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca (CeSAR), Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, (3) Sezione di Patologia, Unità di Oncologia e Patologia molecolare, Dipartimento di Scienze biomediche, Università degli Studi di Cagliari, Cagliari, (4) Unità di Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, Azienda Socio-Sanitaria Locale (ASSL) di Cagliari, (5) Dipartimento di scienze biomediche, Università di Sassari, Sassari

**Introduzione** I geni HLA, localizzati nel complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul cromosoma 6, rappresentano la regione più polimorfica del genoma umano. La loro straordinaria variabilità allelica e aplo-tipica è cruciale nella regolazione della risposta immunitaria e mostra profonde differenze tra popolazioni, modellate da pressioni selettive ed eventi demografici. La tipizzazione HLA ad alta risoluzione si conferma quindi uno strumento essenziale per lo studio della struttura genetica delle popolazioni, della suscettibilità a malattie immuno-mediate e della compatibilità trapiantologica. In questo lavoro presentiamo i risultati relativi a una coorte di individui sardi sani, appartenenti a una popolazione geneticamente distinta e storicamente isolata, con nuove evidenze sulla variabilità HLA e sulle sue implicazioni cliniche ed evolutive.

**Obiettivo** Caratterizzare in dettaglio la struttura aplo-tipica della popolazione sarda mediante tipizzazione ad alta risoluzione di 17 loci HLA con tecnologia NGS, confrontando i risultati con quelli riportati da L. Contu et al. nel 1992, per aggiornare le conoscenze a trent'anni di distanza.

**Materiali e Metodi** È stata analizzata una coorte di 1.625 individui sardi sani mediante tipizzazione HLA ad alta risoluzione su 17 loci (AlloSeq™ Tx17, CareDx). Ai fini dell'analisi aplo-tipica (condotta con il pacchetto R *haplo.em*), i loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1 e -DPB1 sono stati considerati fino al terzo campo; HLA-E, -F, -G, -H fino al quarto; MICA e MICB fino al secondo.

**Risultati** L'analisi delle frequenze aplo-tipiche ha evidenziato che l'aplotipo esteso più rappresentativo nella popolazione sarda è HLA-A\*02:05:01~HLA-B\*58:01:01~HLA-C\*07:18:01~DRB1\*16:01:01~DQA1\*01:02:02~DQB1\*05:02:01~DPA1\*01:03:01~DPB1\*02:01P~HLA-E\*01:03:01~HLA-F\*01:01:02:07~HLA-G\*01:03:01:02~HLA-H\*01:03:01:02~MICA\*002:01~MICB\*008:01, con una frequenza del 3%. Sono stati inoltre identificati altri tre aplotipi estesi con frequenze comprese tra **1% e 2%**, mentre **2.255 aplotipi** risultano al di sotto dell'1%. Questi dati confermano una distribuzione fortemente sbilanciata, caratterizzata da pochi aplotipi comuni e da un'elevata numerosità di combinazioni rare.

**Conclusioni** L'analisi HLA ad alta risoluzione nella popolazione sarda conferma l'esistenza di una struttura genetica unica e sorprendentemente conservata nel tempo. La caratterizzazione dei soli loci classici (A, B, C e DRB1) ha riprodotto i principali blocchi storici già noti, mentre l'estensione a 17 loci ha permesso di **raffinare la definizione degli aplotipi tradizionali e di svelare nuove combinazioni finora non descritte**. L'impiego della tecnologia NGS, superando i limiti della tipizzazione sierologica, apre nuove prospettive per la **ricerca immunogenetica, la medicina di precisione e la compatibilità trapiantologica**, consolidando la Sardegna come un modello privilegiato per lo studio delle dinamiche evolutive e cliniche del sistema HLA.

Abstract Code: AIB24441-59

## Divergenza Evolutiva HLA e potenziale ruolo predisponente nello sviluppo di malattie oncoematologiche pediatriche

D. Madalese <sup>1</sup>, L. Auriemma <sup>1</sup>, M. Esposito <sup>1</sup>, R. Colucci <sup>2</sup>, F.P. Tambaro <sup>3</sup>, R. Penta De Vera D'aragona <sup>1</sup>

(1) UOSD BaSCO, manipolazione cellulare e Immunogenetica, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, (2) Servizio Immunotrasfusionale, Ospedale Madonna delle Grazie - ASM Matera, Matera, (3) UOC TCE e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

**Divergenza Evolutiva HLA e potenziale ruolo predisponente nello sviluppo di malattie oncoematologiche pediatriche**

**Donato Madalese <sup>1</sup>, Laura Auriemma <sup>1</sup>, Martina Esposito <sup>1</sup>, Rosa Colucci <sup>2</sup>, Francesco Paolo Tambaro <sup>3</sup> and Roberta Penta de Vera d'Aragona <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UOSD Ba.S.C.O., Manipolazione Cellulare ed Immunogenetica - Department of Oncology Haematology and Cell Therapies, AORN Santobono-Pausilipon, Naples, Italy

<sup>2</sup> Servizio Immunotrasfusionale, Ospedale Madonna delle Grazie - ASM Matera, Matera, Italy

<sup>3</sup> Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Unit, Department of Oncology Haematology and Cell Therapies, AORN Santobono-Pausilipon, Naples, Italy

I geni HLA nella popolazione umana sono caratterizzati da un'elevata variabilità e sono tra i più polimorfici dell'intero genoma. Questo studio si focalizza sull'analisi della Divergenza Evolutiva HLA (HED), una metrica innovativa che quantifica la distanza evolutiva tra gli alleli HLA, classificandoli come "altamente divergenti" (H) o "meno divergenti" (L) rispetto a un valore soglia rappresentato dalla mediana. Lo studio ha coinvolto una coorte di 120 pazienti oncologici affetti da diverse neoplasie ematologiche, poi diminuiti a 101 per focalizzare l'analisi specificamente sulla popolazione pediatrica, escludendo i pazienti di età superiore ai 20 anni al momento della diagnosi.

Per tutti i pazienti è stata eseguita la tipizzazione HLA ad alta risoluzione e calcolato il punteggio HED per i loci HLA di Classe I: HLA-A, HLA-B e HLA-C. I valori mediani osservati sono stati  $1.249 \times 10^{14}$  per HLA-A,  $6.575 \times 10^{14}$  per HLA-B e  $3.392 \times 10^{14}$  per HLA-C. Sulla base della combinazione H/L dei tre loci, sono stati definiti otto profili HED (es. HHH, HHL, HLH, ecc.).

L'analisi statistica mediante il test di Fisher ha evidenziato un'associazione significativa ( $p\text{-value}=0.0192$ ) tra specifici profili HED ed il tipo di neoplasia, suggerendo un ruolo importante della diversità HLA nella patogenesi di queste condizioni. I risultati hanno evidenziato che i profili HED ad alta divergenza "HHH" e "LHH" sono più prevalenti nei pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL), suggerendo un loro potenziale ruolo predisponente a tale malattia. Al contrario, il profilo "LLL" (bassa divergenza per tutti e tre i loci) è stato associato in modo significativo alla Leucemia Mieloide Acuta (AML), indicando che, una ridotta HED potrebbe rappresentare un fattore di rischio associato alle mieloidi. Tali dati preliminari potrebbero supportare l'ipotesi che la divergenza evolutiva HLA influenzi la sorveglianza e la risposta immunitaria. Lo step successivo prevede la comparazione con un gruppo di controllo.

La comprensione dell'impatto della HED ha potenziali implicazioni cliniche rilevanti: nella selezione dei donatori per trapianto allogenico, nella gestione del rischio di recidiva e nell'ottimizzazione delle immunoterapie, dove i profili HED potrebbero influenzare sia l'efficacia terapeutica sia il rischio di effetti collaterali immuno-correlati.



**Abstract Code: AIB24442-60**

## **Case report: nuovo allele HLA A\*03 Null identificato nel Registro dei Donatori CN01**

L.A. Longa <sup>1</sup>, L. Perotti <sup>1</sup>, M. Prucca <sup>1</sup>, R. Bavetta <sup>2</sup>, S. Mistretta <sup>2</sup>, R. Bruggiafreddo <sup>1</sup>, L. Calcagno <sup>1</sup>, F. Piovano <sup>1</sup>, I. Avonto <sup>1</sup>, R. Balbo <sup>1</sup>, L. Comba <sup>1</sup>, L. Maddalena <sup>1</sup>, P.M. Manzini <sup>1</sup>

(1) SCI Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - AO S. Croce e Carle, Cuneo, (2) Laboratorio di Tipizzazione Tessutale ed Immunologia dei Trapianti, UOS HLA, AOOR Villa Sofia - Cervello, Palermo

**Premessa:** L'introduzione della metodica NGS per la tipizzazione HLA in alta risoluzione dei donatori di midollo osseo ha permesso l'identificazione di nuovi alleli al momento dell'iscrizione al Registro dei Donatori di Midollo Osseo IBMDR.

**Case report:** presentiamo il caso di una donatrice di 25 anni iscritta al Registro IBMDR e tipizzata inizialmente con metodica NGS utilizzando il kit NGSgo-MX6-1 (GenDx), su piattaforma Illumina MiSeqDx. La tipizzazione HLA al locus A presentava un'anomalia nell'esone 1 con sospetto di un nuovo allele, probabilmente un allele Null. La tipizzazione è stata quindi ripetuta con il kit a 11 loci NGS-Pronto (GenDx) con tecnologia Oxford Nanopore e con il sequenziamento diretto dei singoli alleli al locus A mediante l'uso del kit HLAsecure SE SBT (TBG Corp.). Entrambe le metodiche hanno confermato il nuovo allele.

Dall'analisi della variante è emersa una duplicazione di 4 nucleotidi (52\_55dupGCCC) che genera un frameshift dal codone -6 dell'esone 1 al codone 75 dell'esone 2 dove si forma un codone di stop TGA. La sequenza del nuovo allele è stata confrontata con quella dell'allele più simile A\*03:01:01:01.

La tipizzazione completa della donatrice è risultata: A\*03:new,\*32:01:01; B\*14:02:01,-; C\*08:02:01,-; DRB1\*08:01:01,-; DQB1\*04:02:01,-; DPB1\*03:01:01,\*04:01:01. Data la presenza di omozigosi ai loci B, C, DRB1 e DQB1 in concomitanza con l'allele nuovo al locus A, la tipizzazione HLA è stata estesa ai genitori. L'analisi della segregazione degli aplotipi nella famiglia ha permesso di definire l'origine paterna del nuovo allele e di confermare l'omozigosi ai loci sopra citati. I due aplotipi della donatrice sono quindi risultati: A\*03:new; B\*14:02:01; C\*08:02:01; DRB1\*08:01; DQB1\*04:02P; DPB1\*03:01:01 e A\*32:01:01; B\*14:02:01; C\*08:02:01; DRB1\*08:01; DQB1\*04:02P; DPB1\*04:01P. Grazie alla tipizzazione HLA in sierologia mediante il test di microlinfocitossicità complemento dipendente (CDC) con piastre Lambda Monoclonal Typing Tray Set, Class I (OneLambda), si è potuta dimostrare la mancata espressione dell'antigene A3 sulla superficie delle cellule della donatrice, confermando l'allele null. Per verificare se l'assenza della proteina A3 sia dovuta alla perdita dei domini essenziali o alla degradazione dell'RNA contenente il codone di STOP prematuro a seguito di Nonsense Mediated Decay (NMD), si è deciso di approfondire l'analisi del cDNA. Il NMD è infatti un processo di turnover dell'RNA altamente conservato che degrada selettivamente gli RNA che portano mutazioni troncanti che interrompono prematuramente la traduzione, come le mutazioni nonsense, i frameshift e alcune mutazioni del sito di splicing. E' tutt'ora in corso la preparazione dei primers necessari per l'amplificazione selettiva del trascritto ed il suo sequenziamento.

La sequenza dell'allele A\*03var è stata inserita in GenBank col numero di accesso PV626823. Siamo in attesa dell'assegnazione ufficiale del nome dell'allele da parte della WHO Nomenclature Committee.



Abstract Code: AIB24443-61

## Correlazione tra Eplet mismatch, AA mismatch, DSA e rigetto in pazienti pediatrici talassemici con aplo-HSCT

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

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

La presenza di Donor Specific Antigen (DSA) è uno dei fattori di rischio più importanti nel rigetto, in particolare nel contesto del trapianto aploidentico (h-HSCT). In questo studio abbiamo cercato una correlazione tra presenza di DSA, eplet mismatch, mismatch aminoacidici e rigetto in 20 pazienti pediatrici affetti da emoglobinopatie e trattati con h-HSCT e con un follow up minimo di circa 1 anno.

Il rigetto è stato osservato in 7 pazienti (35%). Tra questi, 5 (71,4%) hanno mostrato la presenza di DSA con un valore di MFI > 1000, 3 dei quali con valori superiori a 5000. Al contrario, tra i 13 pazienti caratterizzati da un attecchimento completo, soltanto 3 (23,1%) hanno mostrato valori di MFI compresi tra 1000 e 5000. L'analisi statistica eseguita nel confronto tra i pazienti con e senza rigetto in correlazione alla presenza di DSA ha riportato un indice di  $p=0.035$  ( $p=0.1$  con correzione di Yates). I DSA identificati erano diretti contro entrambe le classi HLA I e II.

Nei pazienti con rigetto l'analisi con il software MatchMaker ha approfondito il ruolo potenziale dei mismatch a livello degli eplets, noti per rappresentare la componente funzionale degli epitopi HLA riconosciuti dagli anticorpi; inoltre, attraverso il software EMMA abbiamo analizzato il confronto dei mismatch aminoacidici in questi pazienti.

Lo studio degli eplet mismatch attraverso il software MatchMaker ha permesso di confrontare i dati delle tipizzazioni HLA ad alta risoluzione degli 11 loci di pazienti e donatori eseguiti in NGS stabilendo un valore medio di 10.7 per gli eplets verificati di classe I e 7.5 per quelli di classe II. Non è stata osservata una differenza statisticamente significativa correlando la presenza di rigetto in base al numero di eplet mismatch, in relazione al valore medio complessivo per ogni singolo locus. Tuttavia, abbiamo riscontrato che 5 dei 7 pazienti con rigetto (71.4%) possedevano un numero di eplet mismatch verificati per la classe II superiore alla media, mentre un tale valore era presente solo su 4 dei 13 pazienti senza rigetto (30,7%). Tra i 5 pazienti con rigetto, 3 presentavano DSA verso antigeni di classe II e in tutti i pazienti il valore di eplet mismatch nel locus verso cui erano stati prodotti DSA è risultato superiore alla media.

L'analisi relativa al numero di mismatch aminoacidici, sia totali che accessibili, presenti nel gruppo di pazienti con rigetto e nel gruppo senza rigetto è stata eseguita attraverso il software EMMA. Tale analisi non ha mostrato una differenza significativa nel numero di mismatch aminoacidici, neanche nei singoli loci.

Un valore di  $p=0.057$  è stato osservato nel confronto relativo al locus DQB1, in cui i pazienti con rigetto hanno presentato un valore di mismatches aminoacidici molto più basso della media; questo trend è confermato sia nei mismatches aminoacidici totali che in quelli accessibili.

Abstract Code: AIB24444-62

## HLA e rischio di tossicità farmacologica: evidenze dalla popolazione sarda

C. Sanna<sup>1</sup>, M. Murgia<sup>1</sup>, S. Mocci<sup>2</sup>, E. Zedda<sup>1</sup>, C. Zoncheddu<sup>1</sup>, C. Mereu<sup>1</sup>, M. Lorrà<sup>1</sup>, L. Serventi<sup>1</sup>, C. Cocco<sup>1</sup>, F. Cannas<sup>2</sup>, A. Mascia<sup>3</sup>, F. Marongiu<sup>1</sup>, S. Lai<sup>4</sup>, E. Giuressi<sup>4</sup>, S. Rassu<sup>4</sup>, M. Floris<sup>5</sup>, A. Perra<sup>6</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

(1) Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy, (2) Centre for Research University Services (CeSAR, Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca), University of Cagliari, Monserrato, Italy, (3) Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy, (4) Medical Genetics Unit, R. Binaghi Hospital, Local Public Health and Social Care Unit (ASSL) of Cagliari, Italy, (5) Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy, (6) Section of Pathology, Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy

**Introduzione.** Le varianti alleliche del complesso HLA sono strettamente associate allo sviluppo di reazioni avverse a farmaci (ADRs), spesso severe e immuno-mediate. Esempi noti includono il rischio elevato di ipersensibilità all'abacavir nei portatori di **HLA-B\*57:01** e le gravi reazioni cutanee da allopurinolo nei portatori di **HLA-B\*58:01**. Queste interazioni derivano dalla capacità di alcuni farmaci di alterare la presentazione antigenica mediata da HLA, innescando una risposta immunitaria anomala. Conoscere la distribuzione delle varianti HLA rilevanti in specifici contesti genetici e geografici è cruciale per stimare la quota di popolazione a rischio e pianificare strategie di prevenzione mirate.

**Metodi.** Abbiamo analizzato una coorte di **1.625 individui sardi sani** mediante tipizzazione HLA con NGS (AlloSeq™ Tx17, CareDx), caratterizzando **17 loci**. Sono stati esaminati in particolare gli alleli con evidenza di associazione a ADRs secondo il database PharmGKB (livello  $\geq 2B$ ). Le frequenze osservate nei loci **HLA-A, -B, -C e -DRB1** sono state confrontate con i dati disponibili per la popolazione italiana generale.

**Risultati.** Sono state caratterizzate le frequenze di **10 alleli HLA associati a reazioni da 7 farmaci**. Nei sardi, **HLA-B\*58:01** (allopurinolo) ha mostrato una frequenza del **10,1% vs 1,6% in Italia** ( $\Delta = +8,5\%$ ; fold enrichment = 6,3 $\times$ ). Altri alleli sono risultati meno rappresentati: **HLA-C\*04:01** (nevirapina) 11,87% vs 16,5%; **HLA-DRB1\*01:01** (nevirapina) 4,8% vs 6–6,4%; **HLA-A\*31:01** (carbamazepina) 1,16% vs 2,6%; **HLA-B\*57:01** (abacavir, flucloxacillina) 1,04% vs 2,4%. Altri alleli hanno mostrato frequenze simili: **HLA-C\*01:02** (metazolamide) 3,05% vs 3,3%, **HLA-B\*40:01** 0,21% vs 1,7%, **HLA-C\*03:02** 0,65% vs 0,5%, **HLA-A\*33:03** 0,37% vs 0%. Infine, **HLA-B\*13:01** (dapsons) è risultato estremamente raro (0,03%).

**Conclusioni.** La popolazione sarda presenta un **profilo HLA peculiare**, con significative divergenze rispetto alla popolazione italiana. In particolare, l'elevata prevalenza di **HLA-B\*58:01**, associato a reazioni cutanee gravi e potenzialmente letali da allopurinolo (inclusa **SJS-TEN**), sottolinea l'urgenza di introdurre **screening farmacogenetici mirati** nella pratica clinica regionale, a supporto di una medicina di precisione più sicura e adeguata al contesto locale.

**Parole chiave:** HLA, Farmacogenetica, Popolazione sarda.

**Abstract Code: AIB24445-63**

## **Tipizzazione ad alta risoluzione di donatori di cellule staminali ematopoietiche, dalle metodiche manuali all'automazione: l'esperienza del nostro centro.**

M. Catalano <sup>1</sup>, F. Consoli <sup>1</sup>, L. Florean <sup>1</sup>, L. Fenici <sup>1</sup>, P. Grammatico <sup>1</sup>, A. Moschetti <sup>1</sup>

(1) U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica - A.O. San Camillo-Forlanini-Sapienza Università di Roma, Roma

Dal Gennaio 2012 il Registro Nazionale dei Donatori di Midollo Osseo (IBMDR) ha richiesto a tutti i Laboratori di Tipizzazione HLA afferenti, l'inserimento dei nuovi donatori di CSE in alta risoluzione e il nostro Centro, sede del Registro Regionale Donatori di Midollo Osseo del Lazio, ha introdotto la metodica PCR-SSO Luminex ad alta risoluzione.

Tale tecnologia, se da un lato ha permesso di raggiungere risultati soddisfacenti in merito alla tipizzazione HLA, ha presentato il limite di processare un numero di campioni troppo basso con la necessità di dover integrare spesso l'analisi utilizzando metodiche supplementari, nel caso di risultati ambigui, dovuti agli esoni non analizzati e alle posizioni eterozigoti.

Dal 2017 ad oggi l'ADMO Lazio (Associazione Donatori di Midollo Osseo), con una efficace strategia di informazione, ha incrementato notevolmente l'attività di reclutamento di nuovi donatori volontari.

Di conseguenza, al fine di poter garantire l'inserimento nel Registro IBMDR nei tempi richiesti dell'elevato numero di donatori tipizzati, si è resa necessaria l'adozione di una metodologia ad alta risoluzione, e ad elevato grado di processazione.

Nell'anno 2019 è stato, quindi, introdotto il sequenziamento di nuova generazione (NGS) che ha superato i limiti della tecnica di PCR-SSO permettendo di analizzare in ogni seduta 96 campioni contro i 18 eseguiti fino ad allora.

Nonostante i buoni risultati raggiunti, l'esecuzione manuale della metodica, richiedeva, da parte dell'operatore, un notevole impegno di tempo nell'esecuzione del flusso di lavoro.

Nel Giugno del 2025, allo scopo di rendere più fluido l'intero processo, è stata validata e avviata l'automazione della metodica per la preparazione delle librerie e dei rispettivi pool che ha determinato, un notevole miglioramento del processo lavorativo e del livello di risoluzione della tipizzazione, riducendo i tempi di esecuzione della metodica, con la conseguente possibilità di studiare settimanalmente fino a 192 nuovi donatori.

Il nuovo flusso di lavoro adottato nel nostro Laboratorio, permette, dunque, di affermare che la migliore strategia di Tipizzazione HLA ad alta risoluzione sia la Tecnologia NGS con l'automazione della metodica, permettendo un abbattimento dei costi, una riduzione del rischio di errore, una diminuzione dei tempi di lavoro e una rapida refertazione con conseguente beneficio per il Registro, grazie all'inserimento in tempi rapidi di nuovi donatori con tipizzazione HLA completa.

Abstract Code: AIB24446-64

## Sequenziamento di nuova generazione e automazione: introduzione e validazione del sistema Hamilton Microlab STAR

M. Catalano <sup>1</sup>, F. Consoli <sup>1</sup>, L. Florean <sup>1</sup>, L. Fenici <sup>1</sup>, P. Grammatico <sup>1</sup>, A. Moschetti <sup>1</sup>

(1) U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica - A.O. San Camillo-Forlanini-Sapienza Università di Roma, Roma

**Introduzione:** Dal 2019 il nostro laboratorio si avvale del sequenziamento di nuova generazione per lo studio del Sistema HLA a fini trapiantologici e per l'inserimento di nuovi donatori nel registro IBMDR. Nel gennaio 2022 è stata introdotta la tipizzazione basata sulla tecnologia *a cattura ibrida* e, da Giugno 2025, la preparazione delle librerie è stata automatizzata con l'introduzione del sistema Hamilton Microlab STAR CO-RE II technology.

**Scopo del lavoro:** descrizione della validazione del sistema di automazione Hamilton Microlab STAR per le fasi di tagmentazione, indicizzazione, cattura ibrida e arricchimento nella preparazione dei pool di librerie con utilizzo del kit AlloSeq Tx9 (CareDx, Inc.).

**Materiali e metodi:** Per la validazione sono stati processati 30 campioni di DNA genomico, 20 estratti da sangue periferico e 10 da campione salivare, di pazienti oncoematologici e individui sani, le cui librerie erano state precedentemente allestite con metodica manuale. I pool ottenuti sono stati quantificati tramite il fluorimetro Qubit (ThermoFisher Scientific), sequenziati con sequenziatore MiSeq Illumina e i dati analizzati con il software AlloSeq Assign (CareDx, Inc.).

**Risultati:** durante le prove sono stati testati e confrontati i due protocolli previsti per l'esecuzione della metodica. Il protocollo standard, ha mostrato una criticità nella fase di purificazione e selezione dimensionale dei frammenti risultando poco efficace e raggiungendo una concentrazione finale dei pool troppo vicina al limite inferiore di accettabilità con conseguente fallimento di un numero consistente di tipizzazioni.

Il protocollo *Early pooling*, è risultato più efficiente per l'automazione, in quanto per la sua impostazione, ha permesso di eseguire la fase critica fuori dallo strumento, senza provocare rischi di errore, incremento del tempo di esecuzione e maggiore impiego dell'operatore.

I pool ottenuti con l'automazione e manualmente presentano una concentrazione sovrapponibile senza sostanziali differenze dovute alla natura dei campioni, mostrando tipizzazioni concordanti al 100%.

**Conclusioni:** l'automazione nei processi del laboratorio di immunogenetica offre numerosi vantaggi, sia in termini di efficienza operativa che di qualità dei risultati, maggiore tracciabilità e comparabilità dei dati. I principali benefici quali accuratezza e riproducibilità, garantiscono una riduzione del rischio di errore soprattutto nelle fasi ripetitive e complesse della metodica. È inoltre assicurata la standardizzazione delle procedure con un miglioramento della qualità e della comparabilità dei dati e, poiché lo strumento non richiede una supervisione diretta dell'operatore, la maggiore disponibilità di tempo del personale che può quindi svolgere altre funzioni. Infine sono garantiti, sia un aumento nella produttività, sia una diminuzione nei costi operativi per un minor consumo di reagenti conseguente alla standardizzazione dei dosaggi.

Abstract Code: AIB24447-65

## Identificazione di nuovi alleli HLA mediante piattaforme NGS: Illumina vs Oxford Nanopore

L. Perotti <sup>1</sup>, L.A. Longa <sup>1</sup>, M. Prucca <sup>1</sup>, B. Bruno <sup>1</sup>, D. Pasio <sup>1</sup>, F. Piovano <sup>1</sup>, I. Avonto <sup>1</sup>, R. Balbo <sup>1</sup>, G. Bondielli <sup>1</sup>, L. Maddalena <sup>1</sup>, P.M. Manzini <sup>1</sup>

(1) SCI Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - AO S. Croce e Carle, Cuneo

**Introduzione:** presso il SIMT di Cuneo la tipizzazione HLA in NGS dei donatori di cellule staminali emopoietiche (CSE), dei pazienti ematologici e dei Controlli di Qualità è eseguita con metodica NGS su piattaforma Illumina. Tale metodica è **ad alta produttività in quanto permette di sequenziare contemporaneamente molti geni per molti campioni e ad alta efficienza poiché consente** di ottenere subito una risoluzione ottimale senza dover utilizzare altre metodiche per discriminare le ambiguità. Poiché il mercato dispone della nuova tecnologia Nanopore, abbiamo avuto la possibilità di testarla su una piccola campionatura, confrontando poi i risultati ottenuti.

**Materiali e metodi:** nell'anno 2024, sono stati tipizzati circa 1200 donatori ed identificati alcuni nuovi alleli HLA. Per la tipizzazione è stata utilizzata la metodica di sequenziamento di seconda generazione NGS, in dotazione presso il laboratorio, utilizzando i kit NGSgo-MX6-1 o MX11-3 (GenDx), su piattaforma Illumina MiSeqDx e con software di analisi GenDx-NGSEngine. Successivamente, 6 di questi campioni (nuovi alleli), 1 paziente ematologico e 1 familiare, sono stati tipizzati con la metodica di sequenziamento di terza generazione, la tecnologia Nanopore. A questo scopo si è utilizzato il kit NGS-Pronto (GenDx) che include NGSgo-ProntoAmp per l'amplificazione di 11 loci HLA e NGS-ProntoPrep per la preparazione della libreria. Il sequenziamento è avvenuto su dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies) e i dati analizzati con il software GenDx-NGSEngine-Turbo.

**Risultati:** su circa 1200 campioni tipizzati con NGS-Illumina sono stati identificati 6 nuovi alleli, tutti riconfermati con NGS-Nanopore e in corso di sottomissione. In due casi si tratta di sostituzioni silenziose nell'esone (ex) 4: A\*01:new (GenBank PV854685) e A\*68:new (GenBank PV982371) e in un caso nell'ex 5: B\*44:new. L'allele A\*03:new (GenBank PV626823) è un allele null dovuto alla duplicazione di 4 basi nell'ex 1 ed è stato identificato in due soggetti appartenenti alla stessa famiglia. Due sono varianti introniche in regioni conservate: l'allele DPB1\*04:new presenta un mismatch MM nel sito di splicing, mentre l'allele A\*03:new (GeneBank PV854686) presenta un MM nell'introne 2. Le due piattaforme NGS hanno dato gli stessi risultati per l'HLA di classe I, mentre Nanopore, grazie alle sue specifiche caratteristiche, si è rivelata migliore per la risoluzione delle ambiguità per la classe II.

**Conclusioni:** tutti i risultati ottenuti con la metodica Nanopore hanno confermato la tipizzazione precedente ottenuta con Illumina. Dall'esperienza qui descritta si può concludere che la tecnologia Nanopore è riproducibile rispetto ad Illumina, che rappresentava il nostro gold standard, è più rapida e necessita di spazi ridotti grazie a dispositivi di sequenziamento tascabili e portatili. Inoltre, non richiedendo la frammentazione, consente sempre la ricostruzione della fase, anche in presenza di pochissimi punti di eterozigosi lungo il gene.

**Abstract Code: AIB24448-66**

## **Follow-up nei riceventi trapianto di rene da donatore a cuore fermo (DCD): l'esperienza del NITp**

A. Tagliamacco<sup>1</sup>, C. Radaelli<sup>1</sup>, V. Caporale<sup>1</sup>, A. Comino<sup>1</sup>, F. Drago<sup>1</sup>, A. Espadas De Arias<sup>1</sup>, M. Guarene<sup>1</sup>, E. Longhi<sup>1</sup>, M. Ramondetta<sup>1</sup>, V. Sioli<sup>1</sup>, C. Brambilla<sup>1</sup>, N. Cagni<sup>1</sup>, S. Capogreco<sup>1</sup>, S. Covotta<sup>1</sup>, A. Innocente<sup>1</sup>, M. Macchiagodena<sup>1</sup>, B. Speringo<sup>1</sup>, N. Suvajac<sup>1</sup>, M. Tivelli<sup>1</sup>, M. Cardillo<sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia dei Trapianti - S.C. Trapianti Lombardia – NITp - IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Milano

Negli ultimi anni, per ridurre la forbice tra organi disponibili e numero di pazienti che si potrebbero giovare di un trapianto, sono stati introdotti nuovi programmi tra cui il prelievo da “donatore a cuore fermo” (DCD). In ambito NITp tale programma, iniziato in via sperimentale nel 2008, dal 2016 ha iniziato a rivestire una sempre maggiore rilevanza fino a rappresentare nel 2024 il 20 % delle donazioni.

In questo studio abbiamo valutato la comparsa degli anticorpi anti-HLA De Novo nei riceventi di trapianto di rene da donatore DCD.

Sono stati selezionati i 379 pazienti trapiantati con almeno un anno di follow-up: di questi, 288 al primo trapianto presentavano un PRA=0, 62 al primo trapianto un PRA≠0, mentre i pazienti al secondo o successivo trapianto sono risultati 29. Per quanto concerne la tipologia di trapianto sono stati trapiantati 358 pazienti con rene singolo e 21 per doppio rene.

Per la valutazione dello sviluppo degli anticorpi anti-HLA De Novo si è considerata la sola categoria al primo trapianto con PRA=0 e con almeno un monitoraggio post-trapianto per un totale di 105 pazienti.

I pazienti che hanno sviluppato anticorpi anti-HLA De Novo sono 28 (27%) di cui 16 hanno sviluppato DSA (Anticorpi Donatore Specifico) e 12 NDSA (Anticorpi NON Donatore Specifico).

Gli anticorpi anti-HLA DSA sono comparsi entro l'anno in 8 pazienti (50% del totale dei pazienti con DSA) e la classe di anticorpi anti-HLA più rappresentata è la Classe II con il Locus DQ, mentre il Locus C è il più rappresentato in Classe I.

Nei pazienti con NDSA la classe di anticorpi anti-HLA più rappresentata è la Classe I rispetto alla Classe II.

Da questa prima analisi dei dati, limitata ai centri trapianto NITp che aderiscono al programma di trapianto rene da donatore DCD, il dato più rilevante sembra essere che gli anticorpi DSA si sviluppino entro l'anno dal trapianto e siano prevalentemente rivolti contro gli antigeni di Classe II.

Questi dati dovranno essere verificati nel corso dei prossimi anni con una casistica più ampia e confrontati con una analoga casistica di trapianti da donatore DBD.

Abstract Code: AIB24449-67

## Associazione tra profilo KIR/HLA e poliabortività: analisi in un gruppo di 61 donne italiane

M. Troiano <sup>1</sup>, M. Falco <sup>2</sup>, E. Vaquero <sup>3</sup>, A. Guagnano <sup>1</sup>, F. Besi <sup>1</sup>, M. Andreani <sup>1</sup>

(1) Laboratory of Transplant Immunogenetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy., (2) Clinical and Experimental Immunology Lab, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy, (3) IVIRMA Global Research Alliance, IVI Roma, Rome, Italy.

Le interazioni tra i recettori KIR delle cellule uNK materne e le molecole HLA-C del trofoblasto fetale regolano l'impianto e lo sviluppo placentare. La combinazione tra genotipo materno KIR A/A e fetale HLA-C2 paterno è associata a un maggior rischio di aborto spontaneo. Questa correlazione si basa sull'interazione tra KIR2DL1 e l'epitopo C2: gli allotipi KIR2DL1 codificati da alleli presenti nella regione centromerica di tipo A sono recettori ad alta affinità per il loro ligando e possono determinare un'eccessiva inibizione delle cellule uNK, compromettendo la funzione immunoregolatoria necessaria per l'impianto e la placentazione. Abbiamo analizzato 61 coppie italiane con storia di poliabortività (età media materna  $37 \pm 3$  anni) per indagare l'associazione tra i genotipi materni KIR e gli antigeni HLA fetali. Come gruppo di controllo, la frequenza degli epitopi HLA-C è stata valutata in un campione di 61 individui italiani, mentre la distribuzione degli aplotipi KIR è stata confrontata con i dati presenti nel database internazionale [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net). La tipizzazione KIR è stata effettuata con kit commerciali (SSP-PCR e SSO), e la tipizzazione HLA-C tramite metodica NGS. Nella coorte di 61 coppie con poliabortività, il 24,6% delle madri presentava il genotipo KIR A/A, il 41% A/B e il 19,7% B/B; nel 14,7% dei casi non è stato possibile risolvere il genotipo B/X. La distribuzione degli aplotipi KIR non differiva significativamente da quella di una popolazione italiana di riferimento pubblicata nel database [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net) (A/A 26%, B/X 72%). L'analisi della tipizzazione HLA-C ha mostrato che 39,3% donne erano C1/C1, mentre il 60,7% possedeva almeno un allele C2 (37,7% C1/C2, 23% C2/C2). Tra i partner maschili, il 27,9% era C1/C1 e il 72,1% portatore di almeno un allele C2 (45,9% C1/C2, 26,2% C2/C2). Nei controlli italiani, la frequenza del genotipo C1/C1 era del 18%, mentre C1/C2 e C2/C2 erano presenti nell'82%. La frequenza del genotipo C1/C1 nelle donne con poliabortività era significativamente più alta rispetto ai controlli (39% vs 18%;  $p = 0,0156$ , test esatto di Fisher  $p < 0.05$ ), suggerendo un'aumentata probabilità che il feto erediti un allele HLA-C C2 di origine paterna, configurando un profilo immunogenetico potenzialmente sfavorevole nelle donne con genotipo KIR A/A. L'analisi ha evidenziato che nel 72% delle coppie il feto presentava una probabilità di ereditare un allele HLA-C2 di origine paterna. Il 24,6% delle donne ha genotipo KIR A/A e, in questo sottogruppo, nel 73% dei casi il feto poteva ereditare un allele C2 dal padre, configurando una combinazione KIR/HLA materno-fetale associata a un aumentato rischio di aborto ricorrente. Al fine di validare la significatività delle osservazioni emerse, sarà fondamentale includere un gruppo di controllo composto da donne con gravidanze fisiologiche, così da poter analizzare con maggiore accuratezza le eventuali associazioni tra i genotipi KIR e HLA-C.



Abstract Code: AIB24450-59

## MICA-Met129Val e antifibrotici: il DNA come bussola terapeutica nell'IPF

C. Mereu<sup>1</sup>, S. Mocci<sup>2</sup>, R. Littera<sup>3</sup>, S. Deidda<sup>4</sup>, F. Cannas<sup>2</sup>, C. Cocco<sup>1</sup>, M. Lorrain<sup>1</sup>, M. Murgia<sup>1</sup>, G. Natile<sup>1</sup>, C. Sanna<sup>1</sup>, L. Serventi<sup>1</sup>, G. Tosone<sup>1</sup>, E. Zedda<sup>1</sup>, E. Giuressi<sup>3</sup>, S. Lai<sup>3</sup>, A. Perra<sup>5</sup>, M. Floris<sup>6</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

(1) Medical Genetics, Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Italy, (2) Centre for Research University Services (CeSAR, Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca), University of Cagliari, Italy, (3) Medical Genetics, R. Binaghi Hospital, Cagliari, Italy, (4) Pneumology Unit, R. Binaghi Hospital, Cagliari, Italy, (5) Oncology and Molecular Pathology Unit, Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Italy, (6) Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, I-07100 Sardinia, Italy.

**BACKGROUND.** La Fibrosi Polmonare Idiopatica (IPF) è una malattia interstiziale cronica e progressiva, caratterizzata da fibrosi irreversibile del tessuto polmonare e progressivo declino respiratorio. Sebbene gli antifibrotici *nintedanib* e *pirfenidone* abbiano migliorato la prognosi rallentando la progressione, la risposta clinica mostra un'elevata variabilità interindividuale, ancora non del tutto spiegata. Evidenze recenti indicano che il processo fibrotico coinvolge le cellule Natural Killer (NK) attraverso il recettore NKG2D, la cui attivazione è modulata dal legame con le molecole MICA, appartenenti al sistema HLA non classico. In particolare, la forza dell'interazione MICA-NKG2D è influenzata dal polimorfismo funzionale Met129Val, suggerendo un potenziale ruolo nella suscettibilità all'IPF e nella risposta alla terapia antifibrotica.

**METODI.** Abbiamo analizzato una coorte di 129 pazienti sardi con diagnosi di IPF, genotipizzati per MICA e stratificati in base al trattamento antifibrotico ricevuto e al loro profilo clinico. I genotipi MICA-129 sono stati correlati con la funzionalità polmonare longitudinale, la sopravvivenza globale (OS) e gli outcome di risposta alla terapia. L'analisi statistica è stata condotta mediante modelli di regressione multivariata di Cox, aggiustati per variabili demografiche e immunogenetiche.

**RISULTATI.** L'analisi delle frequenze del genotipo MICA-129 nei diversi gruppi di trattamento non ha mostrato differenze rilevanti. Tuttavia, nei pazienti trattati con *nintedanib*, i portatori del genotipo MICA-129 Val/Val hanno evidenziato una OS a 48 mesi significativamente ridotta rispetto ai soggetti portatori dell'allele Met129 (Met/Met e Met/Val) ( $p = 0,0056$ ). Questa associazione non è stata riscontrata nei pazienti trattati con *pirfenidone*. Nei modelli multivariati, il genotipo Val/Val si è confermato indipendentemente associato a un rischio di mortalità più elevato (HR = 5,28; IC 95%: 1,28–21,69;  $p = 0,021$ ), anche dopo aggiustamento per gli aplotipi HLA.

**CONCLUSIONI.** Questi risultati preliminari suggeriscono che il genotipo MICA-129 Val/Val potrebbe rappresentare un potenziale biomarcatore di ridotta efficacia del trattamento con *nintedanib* nella IPF, a differenza del *pirfenidone*. Lo studio sottolinea l'importanza di considerare il background genetico nella scelta terapeutica, aprendo la strada a strategie di medicina di precisione volte a ottimizzare la risposta clinica e migliorare la prognosi dei pazienti affetti da IPF.

Abstract Code: AIB24451-60

## HLA e nintedanib: il genoma svela la predisposizione agli effetti gastrointestinali nella fibrosi polmonare

M. Lorrai <sup>1</sup>, S. Mocci <sup>2</sup>, R. Littera <sup>3</sup>, S. Deidda <sup>4</sup>, F. Cannas <sup>2</sup>, C. Cocco <sup>1</sup>, N. Marongiu <sup>1</sup>, C. Mereu <sup>1</sup>, M. Murgia <sup>1</sup>, G. Nutile <sup>1</sup>, C. Sanna <sup>1</sup>, L. Serventi <sup>1</sup>, V. Tedde <sup>1</sup>, G.M. Tosone <sup>1</sup>, E. Zedda <sup>1</sup>, E. Giuressi <sup>3</sup>, S. Lai <sup>3</sup>, A. Perra <sup>5</sup>, M. Floris <sup>6</sup>, S. Giglio <sup>1</sup>

(1) Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Cagliari, Italia, (2) Centro Servizi di Ateneo per la Ricerca (CeSAR), Università degli Studi di Cagliari, Italia, (3) Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, Cagliari, Italia, (4) Unità Operativa di Pneumologia, Ospedale R. Binaghi, Cagliari, Italia, (5) Unità di Oncologia e Patologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari, Italia, (6) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sardegna, Italia

**Introduzione.** La Fibrosi Polmonare Idiopatica (IPF) è una malattia polmonare interstiziale cronica e progressiva, caratterizzata da rimodellamento fibrotico e declino respiratorio irreversibile. Sebbene non esista una cura definitiva, due antifibrotici approvati da FDA ed EMA, *nintedanib* e *pirfenidone*, hanno dimostrato efficacia nel rallentare la progressione. Tuttavia, la tollerabilità rappresenta un limite clinico rilevante: il *pirfenidone* è frequentemente associato a fototossicità e sintomi sistemici, mentre il *nintedanib* è noto per indurre disturbi gastrointestinali, in particolare diarrea.

**Obiettivo.** Valutare l'associazione tra specifici alleli HLA e la comparsa di eventi avversi (AE) indotti dai due antifibrotici, con l'obiettivo di esplorare il ruolo della genetica nella modulazione della tossicità farmacologica.

**Materiali e metodi.** È stata analizzata una coorte di 122 pazienti italiani con IPF, di cui 78 (63,93%) trattati con *nintedanib*, 30 (24,59%) con *pirfenidone* e 14 (11,48%) non sottoposti a terapia antifibrotica. La tossicità è stata monitorata integrando valutazioni cliniche e parametri biochimici. Per tutti i pazienti erano disponibili dati di genotipizzazione HLA ottenuti mediante NGS ad alta risoluzione su 17 loci. L'associazione tra alleli HLA e insorgenza di AE è stata analizzata con modelli di regressione logistica standard implementati nel pacchetto PyHLA.

**Risultati.** L'analisi ha evidenziato che l'allele *HLA-C\*06:02* rappresenta un potenziale fattore di rischio significativo, aumentando di oltre sei volte la probabilità di eventi avversi (AE) nei pazienti trattati con *nintedanib* ( $p = 0,0043$ ; OR = 6,54; 95% C.I. 1,80–23,75). In particolare, la tossicità gastrointestinale, l'AE più frequente, è risultata fortemente associata a questo allele ( $p = 0,0005$ ; OR = 11,85; 95% C.I. 2,94–47,71). Altri alleli, quali *HLA-G\*01:06*, *-A\*01:01*, *C\*06:02* e *A\*11:01*, si associano a un rischio aumentato di AE, con un incremento da circa 3 fino a 5 volte (OR: 5,17; 4,07; 3,71; 2,87, rispettivamente). Al contrario, l'allele *HLA-G\*01:01* è stato osservato con maggiore frequenza nei pazienti che non hanno sviluppato tossicità, suggerendo un possibile effetto protettivo (OR = 0,49).

**Conclusioni.** I nostri dati indicano che specifici alleli HLA, in particolare *HLA-C\*06:02*, possono modulare il rischio di tossicità da *nintedanib*, suggerendo un possibile meccanismo immuno-mediato che richiama i pathway infiammatori guidati da IL-23, già noti in patologie come il Morbo di Crohn. Questi risultati rafforzano la necessità di integrare approcci farmacogenetici nella gestione dell'IPF, con l'obiettivo di ridurre gli eventi avversi e ottimizzare l'efficacia delle terapie antifibrotiche. L'adozione di programmi di screening genetico mirato potrebbe rappresentare un passo concreto verso una medicina di precisione più sicura e personalizzata. Studi multicentrici su coorti più ampie saranno fondamentali per validare queste associazioni e tradurle in pratica clinica.

Abstract Code: AIB24452-61

## L'HLA non classico non sembra essere associato alla risposta umorale al vaccino anti-COVID

J.B. Baudet <sup>1</sup>, R. Crocchiolo <sup>2</sup>, C. Frassati <sup>1</sup>, A. Basire <sup>1</sup>, A.M. Gallina <sup>3</sup>, L. Veronese <sup>2</sup>, A. Pani <sup>2</sup>, F. Scaglione <sup>2</sup>, F. D'amico <sup>2</sup>, L. Crucitti <sup>4</sup>, N. Sacchi <sup>3</sup>, E. Volpato <sup>2</sup>, P. Pedini <sup>1</sup>, C. Picard <sup>1</sup>

(1) HLA laboratory, Etablissement Français du Sang, Marseille, France, (2) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy, (3) Italian Bone Marrow Donor Registry, E. O. Ospedali Galliera Genova, Genova, Italy, (4) Hematology Department, Azienda Sanitaria Provinciale di Trapani, Castelvetro, Italy

Gli Antigeni Leucocitari Umani non classici (HLA), in particolare HLA-G, HLA-E e HLA-F, sono noti per le loro funzioni tolerogeniche. I virus spesso sfruttano queste funzioni per eludere le risposte immunitarie dell'ospite. Ad esempio, la loro espressione o presentazione di peptidi può influenzare la suscettibilità, la gravità e la mortalità da COVID-19. Queste molecole probabilmente svolgono anche un ruolo nella risposta immunitaria alla vaccinazione. Recentemente, i nostri gruppi hanno dimostrato un'associazione tra alcuni alleli HLA e la risposta umorale al vaccino BNT162b2 contro il COVID-19 in una coorte di 2.569 operatori sanitari di un unico centro. In particolare, l'allele HLA-A\*03:01 è stato identificato come predittore indipendente di una forte risposta umorale, mentre HLA-A\*24:02 ha predetto una risposta debole. Tuttavia, la rilevanza dei polimorfismi HLA non classici all'interno di questa coorte non era ancora stata investigata. Pertanto, il nostro obiettivo è quello di valutare l'associazione tra la risposta anticorpale alla vaccinazione BNT162b2 e il polimorfismo HLA non classico.

La tipizzazione ad alta risoluzione dei geni HLA non classici è stata eseguita su campioni di DNA provenienti da 96 *high responders* e 82 *weak responders*. Sono stati anche indagati i polimorfismi nelle regioni non tradotte (UTR) del gene HLA-G, in particolare il polimorfismo di inserzione/delezione (indel) di 14 bp nella regione 3'-non tradotta, che influisce sull'espressione di HLA-G. Sono state condotte analisi di associazione utilizzando il test esatto di Fisher, e i valori p significativi sono stati corretti per confronti multipli utilizzando il metodo di Bonferroni.

Nel gruppo degli *high responders*, 38 individui possedevano l'allele HLA-G\*01:01:01:05-UTR4 – HLA-F\*01:03 – HLA-E\*01:01, che è in disequilibrio di linkage con HLA-A\*03:01. Quando questo sottogruppo è stato escluso dall'analisi statistica, non sono state osservate differenze significative negli alleli HLA-E\*01:01/01:03, HLA-F\*01:01/01:03, genotipi e fenotipi UTR HLA-G, o polimorfismi indel tra le due popolazioni di *responders* alla vaccinazione. Inoltre, gli espressor alti, intermedi e bassi di HLA-G UTR mostravano distribuzioni simili in entrambi i gruppi.

Di conseguenza, questo studio non supporta un ruolo predominante degli HLA non classici nella risposta immunitaria al vaccino BNT162b2. Tuttavia, non si può escludere che la forte risposta vaccinale collegata all'allele HLA-A\*03:01 possa essere indotta o rinforzata dalla sua associazione allelica preferenziale con HLA-G\*01:01:01:05-UTR4.

**Abstract Code: AIB24453-62**

## **Analisi di associazione tra HLA Evolutionary Divergence e status sierologico CMV in una coorte di oltre 600 soggetti adulti**

C. Garanzini <sup>1</sup>, J. Villemonteix <sup>2</sup>, D. Jorge-Cordeiro <sup>2</sup>, G. Grillo <sup>1</sup>, R. Cairolì <sup>1</sup>, G. Di Maggio <sup>1</sup>, G. Cornacchini <sup>3</sup>, G. Lando <sup>3</sup>, A. Sulejmani <sup>3</sup>, L. Toullec <sup>2</sup>, S. Caillat-Zucman <sup>2</sup>, V. Allain <sup>2</sup>, A. Milano <sup>4</sup>, E. Volpato <sup>3</sup>, R. Crocchiolo <sup>3</sup>

(1) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, (2) Laboratorio HLA, Hopital Saint-Louis, APHP Parigi, (3) Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy, (4) IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza

L'HLA Evolutionary Divergence (HED) appare in numerosi studi un predittore di prognosi clinica di pazienti trapiantati, sia di CSE che d'organo solido. Il suo ruolo nell'infezione da Cytomegalovirus (CMV) è meno studiato, in particolare non è noto se l'HED abbia una qualche influenza sulla suscettibilità alla primoinfezione da CMV, espresso come status sierologico.

Per rispondere a questa domanda, abbiamo correlato l'HED ai loci A, B, C, DRB1, DQB1 e DPB1 con la sieropositività o meno al CMV (IgG+/-) nei pazienti allotrapiantati di CSE e nei loro rispettivi donatori provenienti da un unico ospedale nell'intero arco della sua attività. La tipizzazione HLA così come il dato sulle CMV IgG erano già disponibili, essendo necessarie per la realizzazione del trapianto (pazienti) e della donazione (rispettivi donatori).

I dati su un totale di 617 soggetti adulti (pazienti allotrapiantati e rispettivi donatori, consanguinei e da registro) sono stati analizzati. I trapianti della presente analisi sono stati eseguiti dal 1987 fino al 2023. Il test di Mann-Whitney è stato impiegato per confrontare le mediane degli HED ai singoli loci nei gruppi CMV IgG+ e IgG-.

Nessuna significatività è emersa dallo studio dei singoli loci e neppure raggruppando per classe I e II (p-values compresi tra 0.27 e 0.88), mostrando pertanto un'assenza di correlazione tra l'HED e lo status sierologico CMV in questa cospicua coorte di soggetti adulti tipizzati. Tale irrilevanza della divergenza evolutiva dei due alplotipi HLA di un singolo individuo nella suscettibilità all'infezione da CMV può essere spiegata dall'importanza di altri fattori quali il contatto con il virus, il contagio e la carica virale, predominanti ed antecedenti rispetto a qualsiasi ruolo del polimorfismo HLA che invece interviene successivamente durante l'avvenuta infezione. Futuri studi, possibilmente più ampi e multicentrici, potranno permettere di approfondire questo tema e fornire ulteriori risposte in merito.

Abstract Code: AIB24454-63

## Anticorpi non-HLA e rischio immunologico: nuove prospettive nel trapianto di rene

R. Lamanna <sup>1</sup>, S. Fornaciari <sup>1</sup>, E.F. Kauffmann <sup>2</sup>, V. De Gregorio <sup>1</sup>, N. Napoli <sup>2</sup>, C. Biagini <sup>1</sup>, M. Ginesini <sup>2</sup>, L. Felet <sup>1</sup>, D. Gonnella <sup>1</sup>, U. Boggi <sup>2</sup>, M. Curcio <sup>1</sup>

(1) SOD Immunogenetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, (2) U.O. Chirurgia Generale e dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

Il rigetto anticorpo-mediato (AMR) costituisce una barriera immunologica nei trapianti. Fino al 30% dei casi di rigetto si verifica in assenza di anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA), suggerendo un ruolo patogenetico degli Anticorpi (Ab) non-HLA. Scopo dello studio è valutarne l'impatto in pazienti (pz) sottoposti a trapianto renale da donatore deceduto.

L'analisi qualitativa (Broadness) e semiquantitativa (Strength) degli Ab non-HLA è stata condotta utilizzando la piattaforma Luminex (*LIFECODES Non-HLA Antibody, Werfen*). La distribuzione degli Ab non-HLA è stata condotta in 3 gruppi di pz: 24 "Delayed Graft Function" (DGF), 25 "Reject" (R) e 30 "Normal Function" (NF). Tutti i pazienti al momento del trapianto non presentavano DSA verso i loci HLA-A\*, B\*, C\*, DRB1,3,4,5\*, DPB1\*, DQB1\*, DQA1\*. Per la normalizzazione dei dati è stata utilizzata una popolazione di riferimento (LA) di 32 pz in lista per trapianto renale, stratificata sulla base dello stato di presensibilizzazione (PRA, Panel Reactive Antibodies) verso gli antigeni (Ag) HLA in due gruppi: PRA>20% e PRA<20%. La ricerca degli Ab anti-HLA è stata eseguita utilizzando la piattaforma Luminex (*LIFECODES® Single Antigen Assays (LSA), Werfen*; positività: >750 MFI).

Abbiamo rilevato una forte correlazione (Pearson 0.85) tra i gruppi DGF e R, pertanto nei test successivi sono stati considerati in forma aggregata (DGF-R). In DGF-R la presenza di Ab non-HLA è risultata significativamente più elevata (media 5.06,  $p < 0.01$ ) rispetto a LA (2.94) e NR (2.41). Gli Ab non anti-HLA maggiormente presenti in DGF-R sono risultati: ENO1 (49%), PRKCZ (25%), NCL (16%), IFNG (14%). L'analisi degli Ab non-HLA nella popolazione LA ha evidenziato un'elevata immunizzazione verso alcuni di questi Ag: PRKCZ (28%), ENO1 (22%), GSTT1 (22%), SNRPN (19%), IL8 (19%), Thyroglobulin (19%). Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata fra il PRA (>20% e <20%) e la presenza di Ab non-HLA: (Broadness 4.5 vs 4.6; Strength 3.5 vs 5;  $p=ns$ ).

Gli Ab anti-ENO1 risultano associati ad un maggiore rischio di ripresa di funzionalità o rigetto del graft (circa il 50% dei pazienti DGF-R), ma la loro presenza anche negli altri gruppi (23% nei LA e 19% nei NR) ed il basso indice di specificità (IS=1.16) ne limitano il valore diagnostico. Al contrario, gli Ab anti-LGALS8 mostrano il più alto indice di specificità per il rigetto (IS=1.45), essendo molto più frequenti nei pazienti DGF-R (18%) rispetto a NR (9%) e LA (3%).

Infine, i nostri dati indicano che non esiste alcuna correlazione tra lo stato di presensibilizzazione verso gli Ag HLA (PRA>20% o PRA<20%) e la presenza di Ab non-HLA, che appaiono quindi come fenomeno biologico indipendente, ponendosi come un possibile fattore additivo di rischio immunologico. L'analisi di altri fattori genetici considerati ad oggi avere un impatto minoritario sul "graft" risulta pertanto necessaria per una visione olistica dell'immunologia dei trapianti.

Abstract Code: AIB24455-64

## Singoli epitopi vs più epitopi: sensibilità e limiti del Crossmatch Citofluorimetrico.

V. De Gregorio <sup>1</sup>, S. Fornaciari <sup>1</sup>, R. Lamanna <sup>1</sup>, C. Biagini <sup>1</sup>, S. Di Beo <sup>1</sup>, F. Salvadori <sup>1</sup>, M. Curcio <sup>1</sup>

(1) SOD Immunogenetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

Il crossmatch citofluorimetrico (FC-XM) si è rilevato uno strumento efficace per la valutazione della compatibilità della coppia donatore-ricevente da avviare al trapianto di organo solido. Tale metodica si integra in maniera ottimale con l'analisi xMAP (*Luminex*) e l'analisi degli epitopi.

- In questo studio abbiamo valutato:
- la capacità dell'FC-XM di rilevare singoli anticorpi donatore specifici (DSA) anti HLA-A;
- l'eventuale presenza di un effetto sinergico tra epitopi;

la capacità dell'FC-XM di rilevare DSA anti-DPB1.

Sono state selezionate quattro coppie donatore/ricevente (I-IV), sottoposte ad analisi *Luminex*, FC-XM e tipizzazione epitopica; si riportano in tabella i risultati ottenuti.

	FC-XM T	FC-XM B	DSA I CLASSE (MFI)	DSA II CLASSE (MFI)
<b>COPPIA I</b>	POSITIVO (POS)	POS	A66(7370)	DR13(13406) DR1(8902) DQ5(4539) DQ6(6359) DQA1*01(2519) DP14(2497)
<b>COPPIA II</b>	NEGATIVO (NEG)	NEG	A66(6334) Cw7(5156)	DP13(3460) DP14(3352)
<b>COPPIA III</b>	NEG	NEG	A66(2801) A3(4894)	NEG
<b>COPPIA IV</b>	NEG	NEG	NO DSA	DP13(16128) DP14(9596)

La coppia I è risultata positiva all'FC-XM sui linfociti T e B; la positività sui T sembrerebbe riconducibile al singolo DSA anti-A66 con MFI=7370. La coppia II è risultata negativa all'FC-XM sui T e B nonostante la presenza di DSA anti- A66, Cw7, DP13 e DP14.

L'epitopo riconosciuto dal DSA anti-A66 della coppia I, 163RW, è differente da quello riconosciuto dal DSA anti-A66 della coppia II, 253Q. Entrambi gli epitopi risultano confermati e ad elevata esposizione, ma presentano diversa localizzazione. In particolare, il 163RW è localizzato in prossimità della tasca di legame degli anticorpi (*HLA Eplet Registry*). Al contrario, il 253Q risulta distante dalla tasca, in direzione della membrana citoplasmatica; quest'ultimo è riconosciuto anche dal DSA anti-Cw7. La presenza di DSA anti-A66 e Cw7 non mostra un effetto sinergico rilevabile all'FC-XM.

La coppia III, risultata negativa all'FC-XM, presenta DSA anti-A66 (epitopi 76VDT+71QS, entrambi non confermati) ed anti-A3 (epitopi 76VDT+71QS non confermati+161D confermato). Anche per la coppia III non è stato evidenziato alcun effetto sinergico.

Infine, la coppia IV nonostante la presenza di DSA anti-DP13 e DP14 con MFI>9000 è risultata negativa all' FC-XM (n. 4 epitopi identificati).

Sebbene per le coppie I e II non si possa escludere la presenza di anticorpi non-HLA che potrebbero positivizzare l'FC-XM, i nostri risultati suggeriscono quanto segue:

- il tipo e la localizzazione dell'epitopo sembrerebbero influenzare in maniera determinante l'esito dell'FC-XM, indipendentemente dai valori dell'MFI;
- un singolo epitopo reattivo per il locus HLA-A può essere sufficiente a determinare la positività in FC-XM, ma non tutti gli epitopi lo sono, in quanto diversamente immunogeni;
- l'effetto sinergico tra epitopi non è costante e potrebbe dipendere da altre caratteristiche, quali ad esempio variabili biochimiche e spaziali. Risulterebbe pertanto fondamentale effettuare un'analisi degli epitopi non solo quantitativa, ma anche qualitativa;
- infine, DSA anti-DPB1 si confermano non positivizzare l'FC-XM, indipendentemente da MFI e tipologia ed esposizione dell'epitopo, verosimilmente in quanto molecole HLA non costitutivamente espresse.



Abstract Code: AIB24456-65

## HLAMatchmaker come strumento predittivo per lo sviluppo di *de novo* DSA nei trapianti di rene

C. Biagini<sup>1</sup>, G. Scatena<sup>2</sup>, V. De Gregorio<sup>1</sup>, S. Fornaciari<sup>1</sup>, R. Lamanna<sup>1</sup>, E.F. Kauffmann<sup>3</sup>, N. Napoli<sup>3</sup>, M. Ginesini<sup>3</sup>, D. Mandarino<sup>1</sup>, F. Galati<sup>1</sup>, U. Boggi<sup>3</sup>, M. Curcio<sup>1</sup>

(1) SOD Immunogenetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italia, (2) Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma, Italia, (3) U.O. Chirurgia Generale e dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italia

La selezione del donatore ottimale nei trapianti di rene rappresenta un fattore clinico rilevante, soprattutto nei pazienti ad alto rischio immunologico. L'impiego delle tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS) per la tipizzazione HLA, combinato con l'algoritmo HLAMatchmaker, permette un'analisi molecolare più approfondita della compatibilità donatore-ricevente. In questo studio è stato valutato se il carico degli eplets mismatch (EML; Eplets Mismatch Load) potesse offrire un vantaggio predittivo nella valutazione del rischio di rigetto, con l'obiettivo di ottimizzare la scelta del donatore ed il monitoraggio post-trapianto.

Sono stati analizzati 39 pazienti sottoposti a trapianto di rene, suddivisi in due gruppi: 20 con rigetto acuto confermato (R; Reject) e 19 con decorso post-trapianto favorevole (NF; Normal Function).

La tipizzazione HLA ad alta risoluzione dei pazienti è stata eseguita mediante tecnologia NGS (AllType™ FASTplex NGS 11 Loci Kit, One Lambda), mentre la tipizzazione HLA a media risoluzione dei donatori cadaverici è stata eseguita mediante Real Time PCR (kit LinkSeq™ HLA-ABCDRDQDP+ 384, One Lambda).

L'utilizzo del tool Matchmaker richiede la tipizzazione HLA ad alta risoluzione del donatore e del ricevente. Nei donatori tale tipizzazione è stata conseguita attraverso lo sviluppo di un algoritmo in linguaggio "Python" in grado di ricostruire con precisione gli aplotipi a partire dalla tipizzazione a media o bassa risoluzione.

La presenza di *de novo* anticorpi anti-HLA (*de novo*-DSA) è stata valutata con tecnologia Luminex (LIFECODES® Single Antigen Assays -LSA kit, Werfen).

Il confronto del carico di eplets tra la popolazione dei pazienti R vs NF, analizzato separatamente per la prima classe, la seconda classe e la loro somma (mismatch epitopico I+II classe), non ha evidenziato differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ), confermando così i dati già riportati in letteratura.

Per approfondire il potenziale del tool è stata inclusa una terza coorte di 12 pazienti, che hanno sviluppato *de novo* DSA senza perdita del *graft*. Questa è stata confrontata con i NF analizzando separatamente l'EML per la prima classe, la seconda classe ed in maniera aggregata I+II classe. Non si osservano differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ) quando l'analisi è effettuata separatamente per la prima o la seconda classe. Al contrario, l'analisi mostra una chiara tendenza alla significatività quando effettuata sul totale del mismatch epitopico classi I + II ( $p < 0.05$ ). I nostri risultati, sebbene preliminari e non ancora conclusivi, confermano i dati di letteratura e suggeriscono che HLAMatchmaker potrebbe rappresentare un valido strumento nell'*outcome* del trapianto, soprattutto riguardo al rischio di sviluppo di *de novo*-DSA. Si intende ampliare la casistica per validare le evidenze emerse, con l'obiettivo di ridurre il rischio di insorgenza di *de novo*-DSA, particolarmente rilevante nei pazienti più giovani che potrebbero necessitare di un secondo trapianto.

Abstract Code: AIB24457-66

## **Predizione e diagnosi di rigetto nei pazienti sottoposti a trapianto di rene mediante utilizzo del DNA libero da cellule derivate dal donatore (donor derived cell free DNA, dd-cfDNA)**

A. Panarese <sup>1</sup>, C. Cervelli <sup>2</sup>, I. Abruscio <sup>1</sup>, G. Celenza <sup>1</sup>, M.G. Tupone <sup>2</sup>, O. Valdez <sup>2</sup>, S. Scipione <sup>2</sup>, A. Canossi <sup>3</sup>, F. Vistoli <sup>1</sup>, F. Papola <sup>2</sup>

(1) Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche (DISCAB), Università degli Studi dell'Aquila, Via Vetoio, Coppito 2 – 67100 L'Aquila, Italia, (2) UOC “Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - CRITT” - P.O. di L'Aquila, (3) Istituto di Farmacologia Traslazionale - IFT - Sede Secondaria L'Aquila, Via Carducci, 32C. L'Aquila

### **INTRODUZIONE**

La diagnosi precoce del rigetto dopo il trapianto è essenziale per un trattamento tempestivo e per la sopravvivenza a lungo termine del trapianto. La biopsia ecoguidata rimane al momento lo standard per la diagnosi di rigetto. Tuttavia, la biopsia comporta costi, potenziali complicanze, necessità di ricovero ospedaliero e disagio per il paziente. Il DNA libero cellulare derivato dal donatore (dd-cfDNA) è un biomarcatore non invasivo di danno del graft, che può consentire una valutazione più frequente e più sicura del rigetto post trapianto. I livelli di dd-cfDNA derivanti dal donatore aumentano nel sangue nel caso di danno all'organo trapiantato, nel rigetto o nel caso di infezioni. Il monitoraggio del dd-cfDNA può aiutare a identificare lesioni e rigetto del graft.

L'obiettivo dello studio è stato di valutare il ruolo del dd-cfDNA come marker precoce di rigetto, in modo da poter modulare la terapia immunosoppressiva ed effettuare un trattamento tempestivo per evitare la perdita di funzionalità del graft renale.

### **MATERIALI E METODI**

Da novembre 2024 abbiamo arruolato in modo prospettico e consecutivo 20 pazienti sottoposti a trapianto renale, che sono stati monitorati con valutazione del dd-cfDNA (AlloSeq cfDNA, CareDx) a 15 e 60 giorni e 6/20 pazienti sottoposti a biopsia del graft renale per rigetto.

### **RISULTATI**

Nei pazienti nei quali la biopsia del graft renale ha evidenziato un rigetto cellulare o anticorpo mediato il dd-cfDNA è risultato positivo con valori sempre > 0,5%.

È stata riscontrata una correlazione negativa significativa tra i livelli di dd-cfDNA a 60 giorni e l'eGFR quando si utilizza Kendall's  $\tau$  ( $\tau = -0,393$ ,  $p = 0,0438$ ), indicando che concentrazioni più elevate di dd-cfDNA sono associate a una funzione renale inferiore in questo punto temporale. La stessa associazione, valutata con Spearman's  $\rho$ , ha mostrato una tendenza verso la significatività ( $\rho = -0,530$ ,  $p = 0,0510$ ), suggerendo un segnale coerente tra due metriche di correlazione non parametriche. Non è stata osservata invece alcuna significatività per i livelli di dd-cfDNA al giorno 15.

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONE**

Questi risultati preliminari effettuati su un piccolo campione confermano il ruolo del dd-cfDNA come test non invasivo, accurato e sensibile (“biopsia liquida”), che potrebbe essere utilizzato in sostituzione della biopsia eco-guidata sia nel rigetto anticorpo mediato (ABMR) che in quello cellulo-mediato (TCMR).

I risultati preliminari non sembrano al momento supportare l'uso del dd-cfDNA come strumento di monitoraggio nell'immediato post-trapianto (T15 giorni) di rene in quanto i suoi valori possono essere influenzati dal tempo di ischemia fredda e calda, dalla presenza di infezioni e dall'esecuzione della biopsia preimpianto. Sono necessari ulteriori test per completare lo studio, finora condotto su una piccola popolazione di pazienti.

**Abstract Code: AIB24458-67**

## **Valutazione in Luminex dell'impatto di un pannello di anticorpi non anti-HLA de novo in una popolazione di pazienti sottoposti a trapianto di polmone**

E. Longhi <sup>1</sup>, A. Innocente <sup>1</sup>, V. Sioli <sup>1</sup>, N. Caponio <sup>1</sup>, A. Comino <sup>1</sup>, F. Drago <sup>1</sup>, A. Espadas De Arias <sup>1</sup>, S. Grando <sup>1</sup>, M. Guarene <sup>1</sup>, M. Ramondetta <sup>1</sup>, C. Radaelli <sup>1</sup>, A. Tagliamacco <sup>1</sup>, C. Brambilla <sup>1</sup>, N. Cagni <sup>1</sup>, S. Capogreco <sup>1</sup>, M. Macchiagodena <sup>1</sup>, B. Speringo <sup>1</sup>, M. Tivelli <sup>1</sup>, R. Torelli <sup>1</sup>, M. Cardillo <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lombardia NITp, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Il ruolo degli anticorpi non-HLA nel trapianto polmonare e il loro potenziale impatto sul rigetto acuto o cronico sono ancora controversi.

È stato condotto uno studio prospettico arruolando 84 pazienti trapiantati presso il Centro Trapianti del Policlinico di Milano tra febbraio 2020 e agosto 2023. Degli 84 pazienti, 8 sono stati scartati dallo studio per decesso precoce o per mancanza di campioni sufficienti all'analisi. Di 76 pazienti sono stati quindi raccolti 380 campioni di siero prima e dopo il trapianto per monitorare le risposte anticorpali sono stati analizzati con un pannello di 39 anticorpi non-HLA.

La distribuzione degli anticorpi non-HLA al momento del trapianto è risultata simile tra i pazienti, quindi, la condizione preesistente del paziente non sembra influenzare la presenza o la distribuzione di questi anticorpi.

Abbiamo ulteriormente studiato gli anticorpi non-HLA dopo il trapianto, concentrandoci in particolare sui tassi di sieroconversione. Tra i 76 pazienti, 21 hanno manifestato almeno un episodio di rigetto acuto o cronico. L'analisi non ha rivelato differenze statisticamente significative nello sviluppo di anticorpi tra i due gruppi, ad eccezione dell'anticorpo anti-PLA2R, che ha come bersaglio il recettore della fosfolipasi A2 coinvolto nelle sindromi nefrosiche.

L'anti-PLA2R è risultato più frequente nei pazienti con rigetto (19%) rispetto a quelli senza rigetto (3%), con un valore p di 0,0269 e un intervallo di confidenza OR compreso tra 1,0482 e 37,0914, suggerendo un potenziale legame con il rigetto cronico o acuto. Tuttavia, dato l'ampio c.i. e la bassa significatività statistica, questo potrebbe rappresentare una risposta immunitaria secondaria al danno tissutale piuttosto che un marcatore primario di rigetto. Lo studio ha anche osservato che alcuni anticorpi, come quelli contro il collagene V, sono stati rilevati in alcuni pazienti con rigetto, ma non avevano una significatività statistica sufficiente a confermare un'associazione diretta con il rigetto.

In conclusione, sebbene alcuni anticorpi possano svolgere un ruolo, i risultati evidenziano la necessità di ulteriori studi per confermare la loro rilevanza clinica, anche se nella nostra popolazione la sieroconversione non sembra avere una reale rilevanza nel trapianto polmonare.

**Abstract Code: AIB24459-68**

## **Cross-match citofluorimetrico pretrapianto nei pazienti in trattamento con RITUXIMAB: utilizzo di Pronase e anti-CD20.**

L. Elena <sup>1</sup>, V. Sioli <sup>1</sup>, M. Ramondetta <sup>1</sup>, V. Caporale <sup>1</sup>, A. Comino <sup>1</sup>, F. Drago <sup>1</sup>, A. Espadas De Arias <sup>1</sup>, M. Guarene <sup>1</sup>, C. Radaelli <sup>1</sup>, A. Tagliamacco <sup>1</sup>, N. Caponio <sup>1</sup>, S. Dolzattelli <sup>1</sup>, S. Grando <sup>1</sup>, C. Brambilla <sup>1</sup>, N. Cagni <sup>1</sup>, S. Covotta <sup>1</sup>, A. Innocente <sup>1</sup>, M. Macchiagodena <sup>1</sup>, B. Speringo <sup>1</sup>, M. Cardillo <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lombardia NITP, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Un limite all'applicazione del cross-match citofluorimetrico (FCXM) riguarda i pazienti fortemente immunizzati contro antigeni HLA sottoposti a protocolli di desensibilizzazione con Rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico anti-CD20. Sebbene i benefici di questa terapia siano innegabili, è noto che nell'ambito del cross-match pretrapianto la presenza di Rituximab nel siero dei pazienti può dare risultati falsamente positivi per i linfociti B, rendendo quindi difficile l'interpretazione dei dati. Il farmaco presente nel siero del ricevente, anche a basse concentrazioni, può legarsi all'antigene CD20 dei linfociti B del donatore e venire quindi rilevato dall'anticorpo secondario anti-Human IgG. In questo caso un risultato positivo sui linfociti B potrebbe verificarsi anche in assenza di DSA.

Per eliminare questa interferenza è stato studiato un protocollo che prevede il trattamento delle cellule del donatore con l'enzima Pronase e successiva incubazione con anticorpo anti-CD20 al fine di saturare i recettori CD20 e impedire il legame con il farmaco Rituximab nel siero dei pazienti; questo anticorpo, privo della porzione F(ab')<sub>2</sub>, non è riconoscibile dall'anticorpo secondario.

A tal proposito, sono stati raccolti 24 sieri di pazienti in trattamento con farmaco Rituximab da utilizzare in cross-match con cellule di 15 donatori sani a tipizzazione nota. E' stata inizialmente valutata la biodisponibilità di farmaco nei sieri dei pazienti per scartare quelli non utili allo studio (5 dei 24 raccolti). Sui rimanenti 19 sieri è stata condotta la ricerca di anticorpi anti-HLA mediante bead array technique Luminex, per determinare il profilo anticorpale di ogni paziente. Successivamente, è stata eseguita la titolazione dell'anticorpo anti-CD20 per determinare la quantità ideale da utilizzare nello studio. Infine, è stata calcolata la deviazione standard per la determinazione del cutoff.

Durante lo studio sono stati eseguiti 42 FCXM: dei 13 cross-match attesi positivi per la presenza di anticorpi donatore specifici, 9 (69%) sono risultati positivi con i linfociti B anche dopo trattamento. I restanti 4 hanno dato esito negativo: nello specifico si trattava di anticorpi DSA anti-Cw14 (1781 MFI), anti Cw10 (1115 MFI) e anti-DQ6 (1496 MFI); la causa è probabilmente da ricondurre ad un'insufficiente o parziale espressione sulla superficie cellulare degli antigeni coinvolti e del basso valore di MFI degli anticorpi. Dei rimanenti 29 cross-match con sieri risultati negativi alla ricerca di anticorpi o con anticorpi non-DSA, 28 (97%) hanno dato esito negativo come atteso dopo trattamento. Solamente 1 cross-match è risultato positivo, verosimilmente a causa di anticorpi non-HLA, riconducibili alla complessa patologia autoimmune della paziente.

In conclusione, i dati raccolti dimostrano l'efficacia del protocollo studiato nell'eliminare l'interferenza da Rituximab nel cross-match citofluorimetrico, senza intaccare la sensibilità e la specificità del test.

**Abstract Code: AIB24460-60**

## **ddcfDNA nel follow up del trapianto di polmone: uno studio prospettico monocentrico**

E. Longhi <sup>1</sup>, V. Sioli <sup>1</sup>, V. Caporale <sup>1</sup>, A. Comino <sup>1</sup>, S. Dolzattelli <sup>1</sup>, F. Drago <sup>1</sup>, A. Espadas De Arias <sup>1</sup>, M. Guarene <sup>1</sup>, M. Ramondetta <sup>1</sup>, A. Tagliamacco <sup>1</sup>, B. Alessia <sup>1</sup>, B. Denise <sup>1</sup>, L. Chidichimo <sup>1</sup>, M. Grassi <sup>1</sup>, N. Suvajac <sup>1</sup>, L. Morlacchi <sup>2</sup>, V. Rossetti <sup>2</sup>, P. Mendogni <sup>3</sup>, M. Nosotti <sup>3</sup>, M. Cardillo <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, SC Trapianti Lombardia NITp, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, (2) S.C. Pneumologia e Fibrosi cistica, Dipartimento di Area Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, (3) 3Chirurgia Toracica E Trapianti Di Polmone, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Il rigetto post trapianto di polmone rimane una delle cause di perdita dell'organo trapiantato e rimane pertanto di fondamentale importanza il follow up post trapianto. Il gold standard per il monitoraggio post-trapianto è rappresentato dalla biopsia transbronchiale, procedura invasiva e costosa e che non sempre permette di diagnosticare precocemente un processo di rigetto. Per queste ragioni è crescente la richiesta di indagini diagnostiche sempre meno invasive, ma allo stesso tempo più precise e sensibili.

La metodica della biopsia liquida, che permette di rilevare il cell free DNA (cfDNA), è diventata negli ultimi anni oggetto di un interesse sempre maggiore come risorsa della diagnostica non invasiva; in campo trapiantologico, in particolare, si fa riferimento al donor derived cell free DNA (ddcfDNA).

Tutti i pazienti trapiantati di polmone dal 05.02.2020 al 08.02.2023 presso il Centro Trapianti di Polmone del Policlinico di Milano sono stati reclutati per uno studio prospettico: sono stati pertanto raccolti campioni di plasma e siero per tutti i soggetti coinvolti ai tempi 0, entro 1 mese, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 mesi post trapianto per lo studio del dd cf DNA e, collateralmente, per la valutazione degli anticorpi anti HLA.

Di questi pazienti sono stati raccolti i dati clinici e nella maggior parte dei casi è stata eseguita una biopsia transbronchiale.

Il test del ddcfDNA è stato eseguito con metodica NGS utilizzando il kit commerciale AlloSeq della ditta CareDx dopo estrazione manuale di cell free DNA da plasma con kit NonaCus.

Sono stati trapiantati 62 soggetti, 33 M e 29 F. Di questi, 4 non sono risultati valutabili per ddcfDNA per decesso precoce, 7 per precedenti trapianti di CSE, fegato o polmone e 5 per inadeguatezza del campione raccolto o per problematiche legate al test.

Dei 46 casi analizzati, 28 non hanno avuto segni clinici di rigetto e biopsia negativa. In tutti questi casi anche il dato di ddcf DNA risulta sotto la soglia di cut-off identificata a 0.85%.

In 4 casi sono stati descritti segni clinici di rigetto con valori di ddcfDNA al di sopra della soglia di positività, sebbene con tempistiche differenti.

In 8 casi non sono stati segnalati segni clinici di rigetto ma almeno un campione è risultato positivo per ddcfDNA, con valori superiori al cut-off; in 4 casi sono stati descritti segni clinici di rigetto con biopsia liquida negativa.

La valutazione del ddcfDNA sembra avere una buona correlazione in pazienti di cui non viene descritto rigetto o con biopsia transbronchiale negativa. In caso di positività del test, il dato deve essere valutato attentamente insieme ai dati clinici in quanto potrebbe non avere diretta correlazione con eventi di rigetto.

Restano da indagare con molta attenzione i casi di rigetto descritto clinicamente con valori di ddcfDNA sempre al di sotto del cut off di positività perché potrebbero rappresentare risultati falsamente negativi.

Abstract Code: AIB24461-61

## Effetto prozona nei pazienti altamente sensibilizzati: il trattamento del siero con EDTA è efficace nel prevenirlo?

C. Cervelli <sup>1</sup>, M.G. Tupone <sup>1</sup>, O. Valdez <sup>1</sup>, A.R. Lizzi <sup>1</sup>, M. Scimitarra <sup>1</sup>, R. Azzarone <sup>1</sup>, C. Battistoni <sup>1</sup>, S. Scacchi <sup>1</sup>, B. Spaziani <sup>1</sup>, S. Scipione <sup>1</sup>, D. Pulcinelli <sup>1</sup>, V. Torrelli <sup>1</sup>, A. Costanzi <sup>1</sup>, F. Papola <sup>1</sup>

(1) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - Ospedale Civile S.Salvatore, L'Aquila

La definizione del profilo anticorpale anti-HLA nei pazienti altamente sensibilizzati in lista d'attesa è fondamentale sia per garantire l'accuratezza del crossmatch virtuale nel processo di allocazione degli organi e, quindi, la migliore riuscita del trapianto, sia per gestire con la massima accuratezza protocolli di delisting personalizzati. Le metodiche citofluorimetriche beads based attualmente in uso sono però soggette a fenomeni di saturazione dei siti di legame in presenza di sieri contenenti Ab anti-HLA ad alto titolo. In particolare, i pazienti iperimmuni possono presentare l'effetto prozona, fenomeno in base al quale l'efficacia degli anticorpi nel formare il complesso antigene/anticorpo è compromessa quando le concentrazioni di anticorpo sono molto elevate, con conseguenti risultati sottostimati o addirittura falsi negativi. La saturazione dei siti leganti l'anticorpo, insieme alla presenza di fattori sierici "interferenti" (quali IgM o frazioni del complemento) che competono con le IgG nel raggiungimento o nell'occupazione del proprio sito di legame sulla biglia, inducono l'effetto prozona e, per evitarlo, si consiglia di aggiungere ai sieri da testare EDTA o di eseguire delle diluizioni sieriche o altri trattamenti (calore o DTT per le IgM). In questo studio, investighiamo l'intensità dell'effetto prozona in una coorte di pazienti altamente sensibilizzati (cPRA  $\geq$  95%), da arruolare nei protocolli di desensibilizzazione, mediante il test Single Antigen class I e II (Labscreen, OneLambda) prima con il solo pretrattamento del siero dei pazienti con EDTA e successivamente con diluizione del siero 1:16 con PBS. I risultati hanno evidenziato che l'effetto prozona è comune nei pazienti altamente sensibilizzati (57,14%; 4 su 7), in particolare in quelli con una storia di trapianto precedente (100%; 4 su 4). Le specificità HLA di classe II sono risultate più frequentemente presenti rispetto a quelle di classe I, con maggiore evidenza sui loci HLA-A (27,27%; 3 su 11) e HLA-DQ (72,72%; 8 su 11). In particolare un paziente che con siero intero + EDTA mostra solo 2/5 beads del DQ7 > 3000 MFI (9327.16 e 11242.55 MFI, le restanti 3 beads 906.57, 857.68, 650.52 MFI), dopo diluizione 1:16 mostra 5 beads tutte positive, con MFI medio 21505.31 (tutte >20000 MFI); situazione analoga ha mostrato un altro paziente con Ab anti-HLA DQ5 e DQ6, evidenti in toto solo dopo diluizione. Due pazienti hanno evidenziato una specificità anti-HLA A1 che passa da 7945.08 MFI nel siero indiluito a 25097.66 MFI nel diluito 1:16 ed un anti-HLA A3 che passa da 7078.82 MFI a 26332.82 in diluizione. Sulla base dei dati in nostro possesso, estrapolati da una casistica piccola ma in fase di ampliamento, possiamo affermare che il solo trattamento con l'EDTA non è sufficiente ad evitare l'effetto prozona mentre la diluizione dei sieri 1:16 con PBS si è dimostrata maggiormente efficace e fortemente indicata per completare lo studio accurato dei pazienti altamente sensibilizzati.



Abstract Code: AIB24462-62

## Impatto del fattore “alloreattività” sulla sopravvivenza post trapianto di CSE da aploidentico con PTCy

V. Torrelli <sup>1</sup>, G. Celenza <sup>2</sup>, C. Cervelli <sup>3</sup>, D. Vaddinelli <sup>4</sup>, C. Bigazzi <sup>5</sup>, S. Santarone <sup>4</sup>, A. Natale <sup>4</sup>, O. Valdez <sup>3</sup>, M.G. Tupone <sup>3</sup>, R. Azzarone <sup>3</sup>, M. Scimitarra <sup>3</sup>, A.R. Lizzi <sup>3</sup>, C. Battistoni <sup>3</sup>, D. Pulcinelli <sup>3</sup>, A. Costanzi <sup>3</sup>, S. Scacchi <sup>3</sup>, B. Spaziani <sup>3</sup>, M. Falco <sup>6</sup>, F. Papola <sup>3</sup>

(1) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale – Ospedale S.Salvatore, L'Aquila, (2) Dipartimento scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche - Università degli Studi dell'Aquila, (3) Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale - Ospedale Civile S.Salvatore, L'Aquila, (4) Terapia Intensiva Ematologica- Ospedale Civile Pescara, (5) UOC Ematologia e Terapia Cellulare AST Ascoli Piceno, (6) 4) Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale IRCCS Giannina Gaslini - Genova

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) è una procedura terapeutica che può salvare la vita in soggetti che presentano patologie ematologiche maligne. L'utilizzo di donatori aploidentici ha reso possibile l'aumento dei trapianti soprattutto con l'utilizzo del trattamento con PTCy. Con l'obiettivo di comprendere come l'alloreattività delle cellule NK possa influenzare la sopravvivenza e le complicanze post-trapianto, abbiamo valutato l'associazione tra l'alloreattività NK e i principali esiti clinici in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto di CSE con terapia PTCy. Lo studio ha compreso una coorte di 54 pazienti reclutati dalla Terapia Intensiva Ematologica dell'Ospedale Civile di Pescara e dal reparto di Ematologia dell'Ospedale Generale Provinciale C.G. Mazzoni di Ascoli Piceno. I pazienti sono stati divisi in due gruppi (in base al modello KIR/KIR ligand mismatch in GvH direction) andando a valutare i seguenti endpoint:

1. Recidiva di malattia
2. Graft-versus-Host Disease (GvHD)
3. Sopravvivenza globale (OS)
4. Mortalità correlata al trapianto (TRM)

Le analisi sulla recidiva e sull'incidenza di GvHD non hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa con la presenza di alloreattività NK.

Per quanto riguarda OS, l'analisi multivariata (Regressione di Cox) ha identificato due fattori di rischio indipendenti: l'età del ricevente e la presenza di alloreattività NK nel donatore. In particolare, per ogni anno di età in più del ricevente, il rischio di mortalità aumenta di circa il 15%, mentre la presenza di alloreattività può portare ad un rischio di mortalità quasi 3 volte superiore, con un risultato che sfiora la significatività statistica ( $P=0,0527$ ). I risultati più importanti sono stati ottenuti analizzando alloreattività e TRM: l'analisi univariata ha rivelato un'associazione forte e statisticamente significativa tra presenza di alloreattività e TRM ( $P = 0,0041$ ), quella multivariata ( $P=0.0099$ ) ha poi confermato che l'alloreattività è un predittore indipendente di questo endpoint. In oltre il 70% dei pazienti alloreattivi la TRM era dovuta ad infezioni batteriche e questo non era compatibile con le conoscenze del ruolo classico delle cellule NK che controllano soprattutto le infezioni virali. I pazienti alloreattivi, rispetto ai non-alloreattivi, hanno un rischio di decesso per complicanze del trapianto 5 volte superiore, indipendentemente dagli altri fattori. Una delle ipotesi più probabili per interpretare questi risultati è che le NK alloreattive contribuiscano all'eliminazione dei linfociti T residui del paziente diminuendo così la loro capacità di difendersi da infezioni batteriche. In prospettiva, la valutazione pre-trapianto dell'alloreattività potrebbe contribuire alla stratificazione del rischio e alla personalizzazione della gestione clinica. Tuttavia, l'utilità clinica di questo marcatore dovrà essere confermata in studi prospettici su coorti più ampie.

**Abstract Code: AIB24463-63**

## **Inusuale associazione DRB1\*08-DRB3\*02 in un donatore d'organi**

S. Giuliadori <sup>1</sup>, C. Foroni <sup>1</sup>, S. Capriglia <sup>1</sup>, E. Gravagno <sup>1</sup>, S. Bardini <sup>1</sup>, G. Rombolà <sup>1</sup>

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

I geni HLA, codificati all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), sono i loci più polimorfici del genoma umano con il maggior polimorfismo nei geni di classe II a livello della catena  $\beta$  dell'eterodimero. La regione DR presenta un ulteriore livello di complessità, poiché può essere espresso un secondo gene DRB, ovvero DRB3 negli aplotipi DRB1\*03/\*11/\*12/\*13/\*14, DRB4 negli aplotipi DRB1\*04/\*07/\*09 e DRB5 negli aplotipi DRB1\*15/\*16; gli aplotipi DRB1\*01/\*08/\*10 non presentano alcun gene DRB aggiuntivo. Nella maggior parte dei Laboratori italiani la tipizzazione del donatore deceduto viene eseguita mediante tecnica RT-PCR in bassa risoluzione estesa agli 11 loci HLA A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DQA1, DPB1 e DPA1. Nel corso della tipizzazione di un donatore d'organi deceduto dell'Emilia Romagna, maschio di 72 anni di origine ucraina, abbiamo riscontrato una rara associazione tra il DRB1\*08 e il DRB3\*02. Per escludere eventuali errori la tipizzazione degli 11 loci HLA è stata confermata in alta risoluzione mediante NGS (NGSgo®-MX11-3, GenDx) ed è risultata: A\*02:01:01, \*74:01:01; B\*18:01:01, \*27:02:01; C\*02:02:02, \*07:01:01; DRB1\*08:77, \*16:01:01; DRB3\*02:02:01, DRB5\*02:02:01; DQB1\*04:02:01, \*05:02:01; DQA1\*01:02:02, \*04:01:01; DPB1\*04:01P, \*04:02P; DPA1\*01:03:01, - (al locus DPB1 è stato assegnato il gruppo P per l'ambiguità tra DPB1\*04:01:01, \*04:02:01 e DPB1\*105:01:01, \*126:01:01). La tipizzazione in bassa risoluzione con RT-PCR ha portato all'assegnazione dell'allele comune DRB1\*08:01:01:01 senza permettere di escludere i possibili alleli rari del gruppo DRB1\*08:01P; l'alta risoluzione al contrario ha identificato l'allele raro DRB1\*08:77 del gruppo DRB1\*08:01P (HLA allele Frequency database: freq. 0.0208 nella popol. lituana) all'interno dell'aplotipo di classe II: DRB1\*08:77, DRB3\*02:02:01, DQB1\*04:02:01, DQA1\*04:01:01. Questo risultato conferma quindi l'inusuale presenza del gene DRB3 in presenza del DRB1\*08 già descritta in 4 differenti studi su individui con differenti aplotipi HLA; in alcuni di questi si ipotizza un evento di ricombinazione del DRB1\*08 con un aplotipo DRB3 positivo (DRB1\*03/\*11/\*12/\*13/\*14), ma solo in 1 caso viene definito 1 nuovo allele come combinazione tra DRB1\*08:01:03 e DRB1\*11. L'analisi di confronto tra la regione codificante (CDS) DRB1\*08:01:01:01 e DRB1\*08:77 evidenzia che i 2 alleli hanno la stessa sequenza nucleotidica a livello degli esoni 1-3 mentre differiscono nell'esone 4 in posizione 654 (T/A; codone 189 Ser/Arg) e nell'esone 5 in posizione 785 (C/G; codone 233 Thr/Arg); d'altro canto gli esoni 4-6 presentano la stessa sequenza del DRB1\*11:01:01:01 a confermare la possibile origine evolutiva del DRB1\*08:77 da eventi di ricombinazione tra i 2 alleli. L'identificazione di rare e inusuali associazioni come quella descritta tra DRB1 e DRB3/4/5 potrebbe avere implicazioni sia nel matching HLA nel trapianto di organi e CSE, sia nella comprensione della teoria evolutiva degli aplotipi DRB1.

**Abstract Code: AIB24464-64**

## **Presenza di comorbidità di varianti patologiche dell'HFE legate all'emocromatosi in pazienti sardi con fenotipo HLA associato alla celiachia.**

R.D. Stradoni <sup>1</sup>, G. Cualbu <sup>1</sup>, P. Carta <sup>2</sup>, R. Meleddu <sup>1</sup>, A. Cossu <sup>1</sup>, B. Onali <sup>1</sup>, R. Stradoni <sup>3</sup>

(1) ASL Nuoro- P.O. San Francesco, (2) ASL-Sassari P.O. Antonio Segni, (3) Nuoro

**Presenza di comorbidità di varianti patologiche dell'HFE legate all'emocromatosi in pazienti sardi con fenotipo HLA associato alla celiachia.**

*Stradoni R.D.1, Cualbu G.1, Carta P.2, Meleddu R.1, Cossu A.1, Onali B.1, Ibba A.1.*

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Laboratorio di Tipizzazione Tessutale, Presidio Ospedaliero San Francesco, ASL Nuoro, Nuoro (1)

S.S.D. di Genetica Medica - Laboratorio di Genetica Medica Presidio Ospedaliero di Ozieri - ASL 1 Via Cappuccini 07014 OZIERI (SS) ITALIA. (2)

La celiachia (CeD) e l'emocromatosi associata a varianti patologiche del gene HFE (HFE-HC) sono condizioni comuni definite dall'HLA nell'Europa nord-occidentale. Studi di correlazione tra aplotipi estesi HLA maggiormente presenti in Sardegna e le varianti legate alla HFE-HC, ha messo in luce che molti pazienti presentavano una comorbidità tra varianti HFE e malattia celiaca DQ2 associata. Circa il 9% dei nostri pazienti HH è affetto da Celiachia. Questa frequenza appare estremamente elevata ( $p < 0.0001$ ) se rapportata alla frequenza della celiachia in Italia che si aggira intorno allo 0.41% e in Sardegna allo 0.47% (7372 casi) [fonte ISS]. L'80% dei pazienti HH-CeD presentavano la variante tipicamente presente nella nostra regione.

La forte associazione osservata fra Celiachia e HH, in particolare con la variante p.His63Asp, può essere spiegata dalle manifestazioni cliniche meno gravi osservate nei pazienti HH-CeD.

Infatti, è da notare che i valori medi di ferritina nei pazienti HFE con celiachia risultavano significativamente più bassi rispetto agli altri pazienti con emocromatosi ( $616,8 \pm 126$  vs  $951 \pm 131,86$ ,  $p < 0.0001$ ). Anche il numero dei salassi eseguiti annualmente risultava ridotto di circa il 50% ( $3 \pm 1.5$  vs  $6 \pm 2$ ,  $p = 0.12$ )

E' interessante osservare come l'80% dei pazienti HH-CeD possedeva l'aplotipo ancestrale sardo a tre loci HLA-A\*30:02, \*B18:01, C\*05:01 rispetto al 28.4% osservato negli altri pazienti HH ( $p = 0.002$ ; OR = 10). Solo un paziente HH-CeD con genotipo p.Cys282Tyr (non di origini sarde) era privo di questo aplotipo presentando l'aplotipo HLA-A\*03:01, B\*40:01, C\*02:02 (descritto nei pazienti HH di origine spagnola). Da notare la presenza dell'aplotipo HLA-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 (eterodimero DQ2) nella totalità dei pazienti HH-CeD rispetto ai restanti pazienti HH ( $p < 0.0001$ ). Infatti, tale aplotipo risulta presente in oltre il 90% dei soggetti affetti da celiachia 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 analizzati 112 pazienti afferenti ai C.T. di Nuoro e Ozieri.

Abstract Code: AIB24465-65

## Risoluzione di pattern reattivi atipici in test di valutazione anticorpi anti-HLA con piattaforma Luminex One Lambda mediante studio degli Epitopi

F. Giorgio <sup>1</sup>, F. Viggiani <sup>1</sup>, P.G. Castellaneta <sup>1</sup>, A. Mellone <sup>1</sup>, M.V. Monteleone <sup>1</sup>, F. Bellini <sup>1</sup>, A. Latorre <sup>1</sup>, G. Mongelli <sup>1</sup>

(1) LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI

**Background:** Il campione di siero di un pz in studio per l'inserimento in lista d'attesa rene, ha mostrato una reattività atipica nel test LABScreen Single Antigen (LS1A04, lotto 013), con positività verso il pattern Cw1/12/15 e B\*15:16. Tale pattern, già noto per la sua criticità, non presenta epitopi condivisi tra gli alleli coinvolti, suggerendo una possibile reattività non specifica.

**Metodi:** Nel corso dell'analisi di sieri pazienti mediante saggi single antigen su piattaforma Luminex, sono state osservate reattività atipiche che hanno sollevato dubbi interpretativi. In particolare, in Classe I il kit LS1A04 lotto 013 ha evidenziato un pattern di positività verso gli alleli Cw1/12/15 e B\*15:16, già segnalato in letteratura come criticità metodologica. L'analisi epitopica non ha mostrato condivisioni significative, suggerendo un artefatto di lotto. La ripetizione dei test con il lotto successivo (LS1A04 #014) e con i lotti successivi, incluso il #015, ha confermato la risoluzione del problema, con assenza di reattività. Analogamente, in Classe II è stata osservata una reattività aspecifica pan-DR, anch'essa successivamente corretta con l'introduzione del lotto LS2A01 #017.

È stata condotta un'analisi dettagliata degli epitopi polimorfici associati agli alleli C12:03, C01:02, C15:02 e B15:16. Il campione è stato ritestato con lotti successivi (LS1A04 #014 e #015), evidenziando la risoluzione del pattern e la scomparsa della reattività. Parallelamente, è stata osservata una reattività pan-DR in classe II, anch'essa risolta con l'introduzione del lotto LS2A01 #017.

**Risultati:** L'analisi degli epitopi ha confermato l'assenza di condivisioni significative tra gli alleli coinvolti. I lotti aggiornati hanno eliminato le reattività spurie, migliorando la specificità del test. Il campione ha mostrato una risposta coerente con la risoluzione del pattern, confermando l'efficacia delle modifiche apportate ai reagenti.

**Conclusioni:** L'epitope analysis del campione evidenzia l'importanza di un costante aggiornamento dei kit diagnostici per garantire l'affidabilità dei test HLA. La risoluzione di pattern reattivi non specifici rappresenta un passo cruciale per ridurre i falsi positivi e migliorare la selezione dei donatori.

Questi dati sottolineano l'importanza del monitoraggio critico dei risultati ottenuti nei test di tipizzazione HLA, in particolare in presenza di pattern inattesi o non spiegabili da condivisione epitopica. Il confronto tra diversi lotti di reattivi si è rivelato determinante per distinguere tra reali specificità anticorpali e falsi positivi legati al test.

Abstract Code: AIB24466-66

## Ottimizzazione dell'estrazione automatizzata del DNA salivare per la tipizzazione HLA: risultati in un contesto di crescente adesione di donatori al Registro

P.G. Castellaneta <sup>1</sup>, F. Viggiani <sup>1</sup>, F. Giorgio <sup>1</sup>, A. Spinelli <sup>1</sup>, F. Bellini <sup>1</sup>, A. Marinelli <sup>1</sup>, F. Matera <sup>1</sup>, G. Mongelli <sup>1</sup>

(1) Laboratorio Tipizzazione Tessutale e Immunologia dei trapianti A.O.U.C. Policlinico Bari

La tipizzazione tessutale è un passaggio fondamentale nel processo di selezione dei donatori di midollo osseo compatibili con pazienti affetti da gravi patologie ematologiche. La procedura tradizionalmente ha inizio tramite prelievo di sangue, oggi questa può essere effettuata in modo più semplice, non invasiva e altamente efficace grazie all'utilizzo dei campioni salivari. L'estrazione di DNA genomico da saliva rappresenta una strategia efficace già da tempo per la tipizzazione HLA dei donatori di midollo osseo in contesti outdoor, offrendo una valida alternativa al prelievo ematico. Tuttavia, l'elevata viscosità e la variabilità compositiva della saliva possono ostacolare l'efficienza dei protocolli di estrazione automatizzata.

Nella fase iniziale della nostra esperienza con i kit salivari, l'utilizzo del sistema automatico QIA Symphony, ha mostrato un'elevata incidenza di fallimenti, dovuti all'impossibilità di aspirare correttamente campioni troppo densi direttamente dalle provette di raccolta. Diversi tentativi di ottimizzazione, tra cui la diluizione con soluzione fisiologica, il travaso in provette diverse e il riscaldamento preliminare del campione, hanno prodotto risultati limitati, spesso a scapito della resa e della concentrazione del DNA. In collaborazione con Qiagen, è stato sviluppato un protocollo dedicato e ottimizzato per l'estrazione da saliva, calibrato sulle caratteristiche specifiche dei campioni (volume, viscosità, obiettivi di concentrazione), e privo di passaggi intermedi di diluizione. L'adozione del protocollo personalizzato che prevede l'utilizzo del Qiasymphony dna midi kit ha permesso di eliminare quasi completamente i fallimenti di estrazione, garantendo concentrazioni e rapporti di purezza del DNA compatibili con le principali metodiche molecolari adottate nel nostro laboratorio, tra cui SSP-PCR, SSO Luminex e NGS.

Il protocollo ha dimostrato solidità ed efficienza, confermando la saliva come substrato affidabile per l'analisi genetica ad alta risoluzione dei potenziali donatori di midollo osseo. Questo risultato assume un'importanza ancora maggiore alla luce del fatto che i nostri numeri di adesione al Registro sono raddoppiati rispetto all'anno 2024. Per questo motivo, è fondamentale che il laboratorio si avvalga di un protocollo automatico, in grado di gestire l'elevato volume di campioni in modo rapido e preciso, garantendo al contempo la qualità delle analisi e l'affidabilità dei dati ottenuti.

Abstract Code: AIB24467-67

## Tipizzazione HLA e variabilità genetica: il caso di un allele non assegnabile

P.G. Castellaneta <sup>1</sup>, F. Viggiani <sup>1</sup>, F. Giorgio <sup>1</sup>, M.V. Monteleone <sup>1</sup>, A. Mellone <sup>1</sup>, A. Latorre <sup>1</sup>, G. Mongelli <sup>1</sup>

(1) Laboratorio Tipizzazione Tessutale e Immunologia dei trapianti A.O.U.C. Policlinico Bari

La tipizzazione HLA rappresenta un passaggio cruciale nella selezione dei donatori per il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. L'elevata eterogeneità genetica del sistema HLA, è particolarmente evidente in aree geografiche caratterizzate da un alto grado di polimorfismo, come la nostra regione.

In tali contesti, l'ampia adesione al Registro Nazionale dei Donatori di Midollo Osseo (IBMDR) aumenta la probabilità di imbattersi in alleli rari o non ancora descritti.

L'identificazione ad alta risoluzione degli alleli del sistema HLA consente un riconoscimento preciso, e ciò rappresenta un pilastro fondamentale per l'ottimizzazione della selezione dei donatori e rendere il processo di trapianto più efficace e personalizzato.

Nel corso dell'attività di tipizzazione di un potenziale donatore, è stata rilevata un'anomalia nella tipizzazione del locus *HLA-A*, non risolvibile mediante le metodiche convenzionali ad alta risoluzione.

Il DNA è stato estratto da sangue periferico con metodo automatico (QIAasympyphony), seguito da un secondo richiamo del donatore per prelievo e conferma analitica del dato (DNA estratto con il medesimo metodo).

In entrambe le situazioni per la Tipizzazione in HR sono state impiegate tecniche molecolari SSP-PCR(one lambda), SBT-PCR(Gen DX) e SSO Luminex in HR( one lambda), senza ottenere un'assegnazione allelica definitiva. Si riusciva ad identificare un allele: l'*HLA A\*30:02* ma il secondo rimaneva indeterminato

Abbiamo voluto testare anche la sensibilità della tecnologia NGS (Gen DX), attualmente in fase di validazione, che ha ulteriormente confermato l'assenza di corrispondenza del secondo allele con una specificità nota, suggerendo fortemente la presenza di una variante allelica non ancora caratterizzata.

Il dataset completo(SBT e NGS) è stato sottomesso all'IMGT/HLA Database per una valutazione formale e l'eventuale riconoscimento di un nuovo allele del locus *HLA-A*.

L'accuratezza nell'identificazione degli alleli HLA è fondamentale per garantire la compatibilità tra donatore e ricevente e per ridurre il rischio di rigetto migliorando significativamente gli esiti clinici post-trapianto.

Abstract Code: AIB24468-68

## Analisi del polimorfismo del gene *KLRC2*: un nuovo biomarcatore nella selezione del donatore CSE aploidentico?

M. Falco <sup>1</sup>, N. Zarefeizabadi <sup>2</sup>, P. Merli <sup>3</sup>, M. Di Duca <sup>4</sup>, M. Della Chiesa <sup>5</sup>, S. Sivori <sup>5</sup>, F. Locatelli <sup>6</sup>, C. Bottino <sup>2</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, (2) Laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale, IRCCS G. Gaslini, Genova; Dipartimento di Medicina Sperimentale, DIMES, Università degli Studi di Genova, Genova, (3) Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica e di Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, (4) Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS G. Gaslini, Genova, (5) Dipartimento di Medicina Sperimentale, DIMES, Università degli Studi di Genova, Genova, (6) Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica e di Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; Dipartimento di Scienze della Vita e della Salute Pubblica, Università

In questo studio abbiamo esaminato il possibile ruolo dei polimorfismi del gene *KLRC2*, che codifica per NKG2C, nella selezione del donatore aploidentico di trapianto CSE  $\alpha/b^{neg}$ ,  $CD19^{neg}$  per la cura di pazienti pediatriche affetti da malattie neoplastiche.

A questo scopo abbiamo analizzato una coorte di 80 donatori studiando sia il numero di copie *KLRC2* che gli 8 SNPs che caratterizzano questo gene. In particolare, sono stati analizzati: lo SNP presente nel promotore (c.-208 T>C), quelli dell'esone 1 (c.5 G>A) e dell'esone 3 (c.305 C>T) che determinano l'allele NKG2C, e quelli che mappano nella regione 3' trascritta e non tradotta (UTR) (c.\*20 A>G, c.\*105 A>G, c.\*285 G>A, c.\*401 A>G e c.\*419 T>C).

La frequenza degli aplotipi identificati (in linea con quella ottenuta da Asenjo e collaboratori studiando una coorte di donatori di origine spagnola; PMID 35802353) è riportata nella tabella sottostante.

Promotore	Sequenza codificante		3'UTR					Allele NKG2C	N.	%
c.-208	Cod. 2 c.5	Cod. 102 c.305	c.*20	c.*105	c.*285	c.*401	c.*419			
T	AGT (Ser)	TCT (Ser)	A	A	G	A	T	*01	67	41,9
T	AGT (Ser)	TCT (Ser)	G	A	A	G	T	*01	27	16,9
G	AAT (Asn)	TTT (PHE)	G	G	G	G	C	*02	32	20
T	AAT (Asn)	TTT (Phe)	G	G	G	G	C	*02	3	1,9
T	AAT (Asn)	TTT (Phe)	A	A	G	A	T	*02	1	0,6
-	-	-	-	-	-	-	-	delta	30	18,7

L'analisi del numero di copie del gene *KLRC2* indica che il 78,75% (N.=63) dei donatori aveva 2 copie, il 17,5% (N.=14) 1 copia e il 3,75% (N.=3) era *KLRC2* negativo. Per quanto riguarda la distribuzione degli alleli, NKG2C\*01 è stato identificato nel 83,75% degli 80 donatori (N.=67), NKG2C\*02 nel 40% (N.=32) e la mancanza di questo gene nel 21,25% (N.=17). Gli individui NKG2C\*01,\*01 (N.=38), \*01,\*02 (N.=19) e \*01,delta (N.=10) sono quelli più frequenti e nel loro insieme rappresentano l'83,75% della coorte analizzata.



Dal momento che è stato recentemente dimostrato che il polimorfismo del gene *KLRC2* modula l'espansione delle cellule NK NKG2C<sup>pos</sup> in risposta all'infezione da CMV e che l'allele NKG2C\*02 è più trascritto di NKG2C\*01 in questa sottopopolazione (PMID 39581700), abbiamo suddiviso i donatori in due gruppi: NKG2C\*02 positivi (che includevano quindi i genotipi NKG2C\*01,\*02; NKG2C\*02,\*02 e NKG2C\*02,del) e NKG2C\*02 negativi e abbiamo analizzato l'andamento clinico dei pazienti valutando l'incidenza dell'infezione da CMV post trapianto. L'analisi di questo endpoint clinico mediante curva Kaplan-Meier indica una minor probabilità di infezione da CMV post trapianto nei pazienti che hanno ricevuto un trapianto da donatore NKG2C\*02 positivo (p=0,039).

Lo studio proseguirà aumentando la casistica e includendo nell'analisi il polimorfismo di HLA-E (ligando di NKG2C). In particolare si vuole studiare se la presenza nel paziente di alleli HLA-E codificanti per allotipi caratterizzati da Glicina in posizione 107, correlati ad una maggiore espressione di questa molecola di classe I non classica, possa aiutare a meglio stratificare le coppie donatore/ricevente con maggior rischio di infezione da CMV post trapianto.

Abstract Code: AIB24469-69

## Analisi degli epitopi HLA-DPB1 e valutazione del rischio immunologico in una paziente candidata a trapianto di CSE

F. Viggiani <sup>1</sup>, F. Giorgio <sup>1</sup>, P.G. Castellaneta <sup>1</sup>, A. Mellone <sup>1</sup>, M.V. Monteleone <sup>1</sup>, F. Bellini <sup>1</sup>, A. Latorre <sup>1</sup>, F. Matera <sup>1</sup>, A. Spinelli <sup>1</sup>, P. Carluccio <sup>2</sup>, I. Attolico <sup>2</sup>, A. Marinelli <sup>1</sup>, G. Mongelli <sup>1</sup>

(1) LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI, (2) EMATOLOGIA CON TRAPIANTO A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI

**Introduzione:** La valutazione della compatibilità HLA nei pazienti candidati a trapianto si avvale sempre più di strumenti di analisi degli epitopi, in grado di identificare e prevedere la risposta anticorpale in presenza di specificità potenzialmente immunogene.

**Metodi:** Nel presente caso è stata condotta un'analisi dettagliata degli epitopi in una paziente candidata a trapianto di CSE, utilizzando la metodica single antigen bead (SAB) su piattaforma Luminex, integrata con lo studio degli eplets immunogenici. L'analisi ha evidenziato che gli eplets altamente immunogeni 35FV, 56E e p57D, appartenenti all'allele DPB1\*104:01 del potenziale donatore, risultano condivisi con l'allele DPB1\*03:01, verso il quale la paziente presenta una risposta anticorpale significativa (MFI = 22.000). Questo dato suggerisce un elevato rischio di reattività immunologica in caso di esposizione al suddetto antigene. Pertanto è stata incrementata la terapia di desensibilizzazione in uso nel nostro centro, con tre sedute in più di plasmateresi e monitoraggio continuo dei DSA. Lo schema adottato dal Centro Trapianti di CSE del Policlinico di Bari normalmente consiste in Rituximab, 3 sedute di plasmateresi e 2 infusioni di Immunoglobuline. La paziente è stata trapiantata ed attualmente, sotto stretto monitoraggio, non presenta segni clinici e di laboratorio di un rigetto.

**Conclusioni:** L'integrazione tra analisi epitopica ed evidenza sierologica fornisce un importante strumento predittivo nel processo di selezione del donatore, consentendo una valutazione più accurata del rischio immunologico e una maggiore sicurezza nella gestione clinica del trapianto.

Abstract Code: AIB24470-61

## Analisi avanzata degli epitopi in un campione: implicazioni diagnostiche e ottimizzazione dei pannelli antigenici

F. Giorgio <sup>1</sup>, F. Viggiani <sup>1</sup>, P.G. Castellaneta <sup>1</sup>, A. Mellone <sup>1</sup>, M.V. Monteleone <sup>1</sup>, F. Bellini <sup>1</sup>, A. Latorre <sup>1</sup>, F. Matera <sup>1</sup>, A. Spinelli <sup>1</sup>, A. Marinelli <sup>1</sup>, G. Mongelli <sup>1</sup>

(1) LABORATORIO DI TIPIZZAZIONE TESSUTALE ED IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI A.O.U.C. POLICLINICO DI BARI

**Background:** L'analisi epitopica rappresenta un approccio complementare ai saggi single antigen per la caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA.

**Metodi:** Lo studio di un campione post-trapianto nel corso delle nostre indagini ha evidenziato alcune criticità interpretative: è emerso che alcuni epitopi immunogenici, come 151H e 95I, non venivano autorizzati dal software perché non coperti da tutti gli alleli presenti nel pannello. Il campione inoltre ha evidenziato una reattività complessa nel contesto dell'analisi degli anticorpi anti-HLA, con positività verso antigeni come B\*35:01, confermato immunogenico e inoltre DSA. Tuttavia, alcuni epitopi come 151H e 95I non sono stati rilevati, nonostante la presenza di alleli potenzialmente associati, sollevando dubbi sull'efficacia della copertura epitopo -specifici nei kit attualmente disponibili.

Tale limite ha sollevato dubbi sulla completezza dell'analisi e sull'affidabilità della predizione della specificità anticorpale.

Questo caso evidenzia come, nonostante il potenziale dell'epitope analysis, sia necessario integrare i dati ottenuti con il contesto clinico e con le evidenze di laboratorio, al fine di ridurre il rischio di sovra- o sotto-stima della risposta immunologica.

È stata utilizzata la versione 4.7 dell'Epitope Panel per valutare la corrispondenza tra epitopi polimorfici e alleli presenti nel campione. L'analisi è stata integrata con workflow Magsort One Lambda, che consente una caratterizzazione rapida e personalizzata degli anticorpi specifici del donatore, sfruttando pannelli antigenici modulari.

**Risultati:** L'epitopo 151H non è stato chiamato a causa della mancata copertura da parte degli alleli testati, analogamente al 95I. La positività verso B\*35:01 è stata confermata come significativa. L'analisi ha evidenziato la necessità di una revisione dei criteri di chiamata degli epitopi e una maggiore granularità nella progettazione dei pannelli antigenici.

**Conclusioni:** L'analisi del campione sottolinea l'importanza di una copertura epitope-specifica più completa nei test diagnostici. L'integrazione di workflow personalizzati e pannelli modulari può migliorare la precisione nella rilevazione degli anticorpi anti-HLA, con ricadute positive sulla selezione dei donatori e sulla gestione clinica dei pazienti.

Abstract Code: AIB24471-62

## **PRIMUM NON DISCERNERE: come il BIAS di sesso e genere influenza il trapianto: la casistica in area NITp. Dati preliminari.**

M. Ramondetta <sup>1</sup>, R. Torelli <sup>1</sup>, V. Caporale <sup>1</sup>, A. Comino <sup>1</sup>, F. Drago <sup>1</sup>, A. Espadas <sup>1</sup>, E. Longhi <sup>1</sup>, V. Sioli <sup>1</sup>, A. Tagliamacco <sup>1</sup>, D. Bertola <sup>1</sup>, C. Brambilla <sup>1</sup>, N. Cagni <sup>1</sup>, M. Grassi <sup>1</sup>, A. Innocente <sup>1</sup>, M. Macchiagodena <sup>1</sup>, B. Speringo <sup>1</sup>, E. Soccio <sup>1</sup>, N. Suvajac <sup>1</sup>, M. Tivelli <sup>1</sup>, M. Cardillo <sup>1</sup>

(1) Laboratorio di Immunologia dei Trapianti - S.C. Trapianti Lombardia-NITp, IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

L'integrazione di sesso e genere nella ricerca e pratica clinica è sempre più riconosciuta come un fattore determinante per raggiungere risultati di equità in campo sanitario. Numerosi dati di letteratura riportano come storicamente, la ricerca pre-clinica e clinica si è concentrata prevalentemente sul soggetto maschile, portando a lacune diagnostiche e terapeutiche per il sesso femminile e le popolazioni di genere diverso. In particolare, le donne sono sottorappresentate nelle sperimentazioni, portando a strategie di trattamento e risultati non ottimali.

Tuttavia, è noto che sesso biologico e genere influenzano manifestazione, progressione e risposta ai trattamenti in numerose patologie: il sesso biologico attraverso fattori genetici, ormonali e fisiologici e il genere tramite identità, ruoli sociali e comportamenti.

Anche nell'ambito trapianti, sono state descritte in letteratura disparità di genere che coinvolgono le diverse fasi del processo: donazione, ingresso in lista d'attesa, accesso al trapianto una volta in lista, outcome post trapianto.

Poiché a tutt'oggi, la domanda di organi supera ancora l'offerta, emerge la necessità di garantire equità ed efficienza nel sistema di allocazione.

In area NITp, da gennaio 2020 a dicembre 2024, dei 3724 donatori utilizzati, 1616 (43%) erano di sesso femminile (F), mentre 2108 (57%) di sesso maschile (M). Nello stesso periodo, il numero totale di iscrizioni in lista rene è risultato 5940, delle quali 2133 F, pari al 35,9%, e 3807 M. Anche per le liste cuore, fegato, polmone le percentuali di ingresso in lista per le donne sono minori: rispettivamente 25,9%, 29,4%, 38% sul totale iscritti. Solo per la lista pancreas la percentuale sale al 53,6% per le donne.

La distribuzione dell'allo-immunizzazione anti-HLA (PRA > 0% in Classe I e II) all'ingresso in lista rene (n.5940) è risultata superiore per le donne 22%, (468/2133) rispetto ai maschi 11% (427/3807). Percentuali più elevate sono emerse nei pazienti trapiantati di rene: F con PRA positivo sono risultate il 37,5% (594/1581) contro il 21% dei M (567/2660). Anche per le iscrizioni in lista cuore e polmone le donne all'ingresso sono risultate maggiormente immunizzate: 15% delle donne (34/231) rispetto al 4% degli uomini (29/663) per il cuore, e 9% (F 18/191) contro 1% (M 3/312) per il polmone.

Riguardo la donazione da donatore vivente, di 357 coppie valutate con "donatore coniuge" 126 presentavano come probanda una donna e 232 probando uomo. Delle prime, il 24% circa è risultato sensibilizzato con DSA verso il marito, mentre solo il 6% circa dei probandi M presentava anticorpi verso la donatrice coniuge.

Le differenze di sesso e genere rendono necessari cambiamenti nella ricerca e pratica clinica. Anche nell'ambito dei trapianti è quindi auspicabile che si consolidi la consapevolezza di queste disparità e che studi futuri siano volti a chiarire gli aspetti citati nell'accesso al trapianto, negli esiti dell'organo trapiantato e nella sopravvivenza dei pazienti.

Abstract Code: AIB24472-63

## HLA-G 14 bp ins/del e gravità della celiachia: analisi allelica e genotipica in una coorte italiana

C.T. Prezioso<sup>1</sup>, A. Pasi<sup>1</sup>, A. De Silvestri<sup>2</sup>, I. Sbarsi<sup>1</sup>, M. Torchio<sup>1</sup>, P. Bergamaschi<sup>1</sup>, C. Bottazzi<sup>1</sup>, M.C. Monti<sup>1</sup>, S. Caimmi<sup>3</sup>

(1) Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (2) SSD Biostatistica e Clinical Trial Center -Direzioe Scientifica, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia, (3) Dipartimento di Pediatria, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia

### Background

Il polimorfismo HLA-G 14 bp *ins/del* nella regione 3' UTR modula la stabilità dell'mRNA e i livelli di HLA-G solubile (sHLA-G), influenzando la risposta immunitaria. Studi precedenti hanno suggerito un'associazione della variante DEL con un aumentato rischio di celiachia e con fenotipi più severi.

### Metodi

Sono stati analizzati 268 pazienti pediatrici con diagnosi di celiachia per polimorfismo HLA-G 14 bp *ins/del*, assetto HLA-DQ, presentazione clinica e gravità istologica (classificazioni di Marsh e Corazza-Villanacci). L'analisi statistica è stata condotta sia a livello allelico (INS vs DEL) sia genotipico (INS/INS, INS/DEL, DEL/DEL), mediante test  $\chi^2$ , calcolo dell'OR e test Mantel-Haenszel, con aggiustamento per DQ2.

### Risultati

A livello genotipico, la frequenza di DQ2 aumentava progressivamente da DEL/DEL (66,3%) a INS/INS (83,3%;  $p = 0,047$ ). Dopo aggiustamento per DQ2, i portatori di INS/INS mostravano odds significativamente inferiori di lesioni Marsh elevate rispetto ai DEL/DEL (OR = 0,33; IC 95%: 0,11–1,04;  $p = 0,046$ ). Il genotipo DEL/DEL era sovrarappresentato nelle forme istologiche severe sia secondo Marsh (>3: 61,5% vs 38,5%;  $p = 0,020$ ) sia secondo Corazza-Villanacci (forme B: 60,9% vs 39,1%;  $p = 0,004$ ). A livello allelico, l'allele INS era più rappresentato nei soggetti DQ2-positivi rispetto ai DQ2-negativi (49,50% vs 36,57%;  $p = 0,009$ ). Clinicamente, la probabilità di presentare una forma classica rispetto a una forma potenziale è risultata 1,8 volte superiore per l'allele DEL rispetto all'allele INS (OR = 1,81; IC 95%: 1,02–3,22;  $p = 0,043$ ). Istologicamente, l'allele DEL è più frequente nelle forme severe:

Marsh >3: INS = 38,50% vs DEL = 61,50% ( $p = 0,020$ ); OR per INS vs DEL, aggiustato per DQ2 = 0,54 (IC 95%: 0,30–0,97;  $p = 0,035$ ).

Classificazione Corazza-Villanacci: nelle forme B (atrofia dei villi) la frequenza di INS era pari al 39,15% e quella di DEL al 60,85%, mentre nelle forme OA (lesioni lievi) la frequenza di INS saliva al 61,54% e quella di DEL scendeva al 38,46% ( $p = 0,004$ ).

### Conclusioni

L'allele DEL risulta associato a presentazioni cliniche e istologiche più severe di celiachia, mentre INS è più frequente nei soggetti DQ2-positivi, meno a rischio di sviluppare la malattia celiaca, e nei casi con lesioni lievi. Poiché il polimorfismo HLA-G 14 bp influisce sui livelli di sHLA-G, con la variante DEL associata a una maggiore espressione e la variante INS a livelli ridotti, i nostri dati supportano l'ipotesi di un effetto modulatore di HLA-G sulla risposta immune mucosale al glutine. Un'eccessiva espressione di HLA-G potrebbe, da un lato, rappresentare un tentativo di controllo dell'infiammazione, ma dall'altro favorire la persistenza di cellule T glutine-specifiche e la cronicizzazione del danno, contribuendo a fenotipi più aggressivi. Al contrario, livelli più bassi di HLA-G possono non impedire l'esordio della malattia in soggetti geneticamente predisposti (DQ2-positivi), ma tendere a limitarne la severità istologica.

Abstract Code: AIB24473-64

## Cellule NK e COVID-19: possibile ruolo delle interazioni KIR-HLA nella gravità clinica

C.T. Prezioso <sup>1</sup>, A. Pasi <sup>1</sup>, C. Fornara <sup>2</sup>, R. Cacciatore <sup>1</sup>, I. Sbarsi <sup>1</sup>, M. Torchio <sup>1</sup>, P. Bergamaschi <sup>1</sup>, C. Bottazzi <sup>1</sup>, M.C. Monti <sup>1</sup>, M. Furione <sup>3</sup>, P. D'angelo <sup>3</sup>, D. Lilleri <sup>3</sup>, F. Baldanti <sup>4</sup>, C.G. Perotti <sup>5</sup>

(1) Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (2) Servizio di Medicina di Laboratorio, ICS Maugeri, Pavia, (3) Microbiologia e Virologia, IRCCS Foundation, Policlinico San Matteo, Pavia, (4) Microbiologia e Virologia, IRCCS Foundation, Policlinico San Matteo; Dipartimento di Scienze Clinico Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Università di Pavia, Pavia, (5) Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Fondazione IRCCS Pol. San Matteo, Pavia

**Background:** Il COVID-19, causato da SARS-CoV-2, presenta uno spettro clinico che varia da forme asintomatiche a condizioni gravi e potenzialmente letali. La risposta immunitaria, in particolare quella mediata dalle cellule NK regolate dai recettori KIR, svolge un ruolo cruciale nella progressione della malattia. La resistenza alle infezioni dipende dall'equilibrio tra segnali inibitori e attivatori, modulati dai recettori KIR e dai rispettivi ligandi HLA.

**Metodi:** Per indagare i fattori genetici che influenzano la suscettibilità e la gravità della malattia, sono stati analizzati i geni KIR e le loro interazioni con i ligandi HLA in 91 pazienti con COVID-19 grave (età media: 61,2 anni) e in 75 con sintomi lievi (età media: 44,4 anni). La tipizzazione KIR/HLA è stata eseguita mediante Luminex-PCR SSO e PCR SSP.

**Risultati:** KIR2DS4 e KIR3DL1, entrambi tipicamente codificati all'interno dell'aplotipo Telomerico B (TelB), sono risultati più frequentemente assenti nei pazienti con COVID-19 grave (11% vs 2,7%;  $p = 0,04$ ). L'analisi della distribuzione degli aplotipi mostra che il motivo TelBB è più frequente nei casi gravi (11% vs 2%), sebbene senza significatività statistica ( $p = 0,082$ ). L'associazione KIR2DL3+HLA-C1 è prevalente nei casi lievi (80% vs 62,2%;  $p = 0,012$ ), suggerendo un potenziale ruolo nel limitare l'infiammazione e ridurre la gravità della malattia. La positività per HLA-A11 è risultata più elevata nei casi gravi (20% vs 8%;  $p = 0,03$ ), suggerendone un possibile coinvolgimento nella gravità della malattia e nella modulazione della risposta immunitaria. L'associazione KIR2DS2+HLA-A11 è significativamente più frequente nei casi gravi (18,7% vs 2,7%;  $p = 0,001$ ; OR = 8,39), verosimilmente contribuendo alla maggiore severità attraverso un'aumentata attivazione delle cellule NK e risposte immuni/infiammatorie eccessive. L'analisi di regressione logistica multivariata ha mostrato che l'impatto di HLA-A11 sulla gravità della malattia è significativamente mediato dalla sua interazione con KIR2DS2 ( $p = 0,009$ ), sottolineando la rilevanza funzionale di questa coppia recettore-ligando nel determinare risposte immunitarie patogeniche.

**Conclusioni:** I nostri risultati evidenziano il ruolo cruciale delle interazioni KIR-HLA nel decorso clinico del COVID-19. Combinazioni specifiche, come KIR2DL3+HLA-C1 (inibitoria, associata a forme lievi) e KIR2DS2+HLA-A11 (attivante, associata a forme gravi), influenzano la funzione delle NK, modulando la suscettibilità all'iperinfiammazione e la progressione della malattia. Tali evidenze indicano che i genotipi individuali KIR-HLA possano rappresentare potenziali biomarcatori predittivi e supportare strategie terapeutiche personalizzate mirate all'immunità innata. Considerata la dimensione del campione, i dati vanno interpretati come esplorativi. Sono necessarie validazioni su coorti più ampie ed etnicamente eterogenee per confermare queste associazioni e chiarirne la rilevanza clinica nell'infezione da SARS-CoV-2.

Abstract Code: AIB24474-65

## Incremento degli anticorpi anti-recettore dell'endotelina-1 di tipo A (ETAR) e correlazione con esiti clinici e istologici nel trapianto di rene pediatrico

E. Demirkilic <sup>1</sup>, M. Vadori <sup>1</sup>, S. Negrisolo <sup>2</sup>, B. Antonello <sup>2</sup>, E. Vianello <sup>3</sup>, J. Igeno San Miguel <sup>3</sup>, E. Benetti <sup>3</sup>, E. Cozzi <sup>1</sup>

(1) Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova, Padova, (2) Laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale-Università di Padova, Padova, (3) UOC Nefrologia Pediatrica, DIDAS Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedale-Università di Padova, Padova

**Introduzione.** Gli anticorpi non-HLA sono stati identificati come possibili cause di rigetto anticorpo-mediato (AMR) nel trapianto renale. Tra questi, l'impatto degli anticorpi contro il recettore di tipo A dell'endotelina-1 (ETAR) rimane poco definito. Nel trapianto di rene pediatrico, la prevalenza degli autoanticorpi anti-ETAR è variabile e il loro significato clinico non è chiarito. Questo studio valuta la risposta anticorpale anti-ETAR dopo trapianto di rene pediatrico in relazione con gli esiti clinici e istologici su biopsie di protocollo.

**Materiali e Metodi.** Pazienti pediatrici trapiantati (n=161) sono stati arruolati nel centro Trapianto Pediatrico dell'Azienda -Ospedale-Università di Padova. Gli anticorpi anti-ETAR sono stati misurati pre- trapianto e a 6, 12 e 24 mesi post trapianto. Agli stessi time-point, **è stata valutata la funzionalità renale** in termini di creatinina serica, azotemia e velocità di filtrazione glomerulare. Sono state inoltre eseguite biopsie di protocollo valutate in accordo alla classificazione Banff 2018.

**Risultati.** Oltre il 50% dei pazienti arruolati presentava anticorpi anti-ETAR già prima del trapianto. Durante il follow-up, nel 19% dei casi (n=30) è stato osservato un incremento del titolo degli anticorpi anti-ETAR, con un picco superiore al 50% rispetto ai livelli pre-trapianto. In questi pazienti, tale incremento si è associato nel 57% dei casi (n=17) ad una riduzione della funzionalità renale, evidenziata da un aumento della creatininemia e azotemia e da una diminuzione della filtrazione glomerulare. Inoltre, le biopsie eseguite in corrispondenza del picco anticorpale hanno documentato 10 episodi di lesioni di rigetto, caratterizzati da una prevalenza di rigetto cellulo-mediato (TCMR, n=8) e da due casi di rigetto anticorpo-mediato (AMR, n=2).

**Conclusioni.** Questi dati suggeriscono che il monitoraggio degli anticorpi circolanti anti-ETAR possa contribuire a identificare i riceventi di trapianto renale pediatrico a maggior rischio di disfunzione d'organo. In particolare, i risultati clinici e istologici evidenziano una possibile correlazione tra la variazione di anticorpi anti-ETAR e lo sviluppo di rigetto cellulo-mediato.



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

 **PLANNING**