

**XXVII**

**Congresso  
Nazionale**

**AIBT**

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

**ABSTRACT BOOK**

**9-10 settembre 2021**

Cari colleghi,

dal 9 al 10 settembre 2021 si svolgerà in modalità Webinar il XXVII Congresso dell'Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti- AIBT.

La pandemia da Covid 19 ci ha imposto molti cambiamenti ma, seppur rallentati e distanti, riprendiamo la nostra programmazione annuale con la speranza che ben presto si ritorni ad un Congresso in presenza, garanzia di condivisione interpersonale oltre che di arricchimento culturale.

Come di consueto, con questo convegno vogliamo proporre ai professionisti di tutta Italia gli sviluppi recenti delle conoscenze sui temi dell'Immunogenetica e dell'Istocompatibilità oltre al forte stimolo di comprensione sulla causa immunologica su quanto stiamo vivendo. Sarà anche motivo per sottolineare con orgoglio come, nonostante la pandemia, la nostra Comunità Nazionale oltre a quella Internazionale abbia continuato a svolgere la propria attività garantendo la fattibilità dell'attività trapiantologica, e le sfide non sono proprio mancate!

Saranno due giorni in cui incontrarci di nuovo, aggiornarci e confrontarci su argomenti di attualità, scientifici ed organizzativi, fondamentali per la ricerca e la nostra professione.

Sarà anche l'occasione per i saluti del Presidente e del Direttivo attuali, con il rammarico di non poterli fare con più calore di persona (appuntamento solo rimandato) mentre daremo il benvenuto ai nuovi eletti.

A presto,

Il Presidente ed il Consiglio Direttivo

## INDICE

- Epitope Compatibility, the new HLA challenge** pag. 7  
Antonio G. Bianculli, Paola Giustiniani, Maria Troiano, Luca Dello Strologo, Marco Spada, Raffaella Labbadia, Maria Cristina Saffioti, Isabella Guzzo, Giuseppe Maggiore, Andrea Di Luzio, Annalisa Guagnano, Marco Andreani
- Monitoraggio del rigetto acuto del trapianto polmonare mediante un nuovo metodo di analisi del DNA libero circolante proveniente dal donatore** pag. 8  
Monica Sorbini, Gabriele Togliatto, Fiorenza Mioli, Margherita Cappuccio, Francesca Arruga, Paolo Solidoro, Mauro Rinaldi, Massimo Boffini, Erika Simonato, Matteo Marro, Mauro Giulio Papotti, Luisa Delsedime, Alessandro Gambella, Tiziana Vaisitti, Antonio Amoroso, Silvia Deaglio
- Case report: importanza degli anticorpi dsa igm nella valutazione pre-trapianto da donatore vivente** pag. 9  
M. Margiotta, F. Giorgio, S. Simone, F. Piancone, P. Gallo, M. Rossini, G. Lucarelli, G. Mongelli, P. D'Aniello, S. De Franceschi, C. Martino, N. Menolascina, V. Monteleone, A. Spinelli, L. Gesualdo, D. Mininni
- Cross-match citofluorimetrico (fc-mx) positivo: trapianto si o trapianto no?** pag. 10  
Benecchi M., Giuliodori S., Magni E., Muratori P., Parrotta J., Zanelli P.
- Alterazioni dello stato di pre-sensibilizzazione nei pazienti in lista d'attesa per trapianto di Pancreas-Rene/Pancreas conseguente a vaccinazione anti-Covid 19** pag. 11  
Fabio Vistoli, Silvia Fornaciari, Veronica De Gregorio, Chiara Biagini, Emanuele Kauffmann, Tina Cacace, Roberta Lamanna, Lidia Felet, Debora Gonnella, Ugo Boggi, Adriano Peris, Maria Luisa Migliaccio, Michele Curcio
- Valutazione della frequenza degli alleli hla e stato di pre-sensibilizzazione in pazienti in attesa di trapianto di pancreas** pag. 12  
Silvia Fornaciari, Chiara Biagini, Fabio Vistoli, Simone Lapi, Elisa Biagi, Tina Cacace, Emanuele Kauffmann, Roberta Lamanna, Veronica De Gregorio, Ugo Boggi, Adriano Peris, Maria Luisa Migliaccio, Francesco Galati, Serena Di Beo, Michele Curcio
- Analisi dello stato di pre-sensibilizzazione dei pazienti trapiantati di Pancreas e Rene/Pancreas in era pre-Luminex** pag. 13  
Chiara Biagini, Fabio Vistoli, Tina Cacace, Simone Lapi, Francesca Nocchi, Silvia Fornaciari, Emanuele Kauffmann, Roberta Lamanna, Veronica De Gregorio, Ugo Boggi, Adriano Peris, Maria Luisa Migliaccio, Domenica Mandarino, Federica Salvadori, Michele Curcio
- Influenza delle divergenze evolutive del sistema HLA (HED) sull'andamento clinico del trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatori non correlati in pazienti pediatrici affetti da malattie ematologiche maligne** pag. 15  
Marco Andreani, Rita Maria Pinto, Luisa Strocchio, Pietro Merli, Mattia Algeri, Francesca Del Bufalo, Daria Pagliara, Marco Becilli, Roberto Carta, Antonio Giacomo Grasso, Francesco Quagliarella, Giulia Boz, Emilia Boccieri, Annalisa Guagnano, Maria Troiano, Katharina Fleischhauer, Franco Locatelli e Pietro Crivello
- Associazione tra valori di pirche e andamento del trapianto in pazienti pediatriche con patologie ematologiche maligne sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche aploidentico** pag. 16  
Andreani M, Merli P, Testa G, Galluccio T, Pinto R, Locatelli F
- Probabilità di matching e dimensione dell'IBMDR** pag. 17  
N. Sacchi, S. Pollichieni, C. Costa, F. Vagnozzi, R. Marciano, E. Raggio, A. Gallina

- Trapianto di CSE: ruolo delle sostituzioni aminoacidiche nei siti di legame dell'antigene** pag. 18  
D. Bongioanni, F.E. Bertinetto, N.M. Ferrero, E. Garino, A. Giordano, P. Magistrone, G.A. Mazzola, T. Melchiorre, E. Navaretti, L. Rocchi, C.M. Dellacasa, L. Giaccone, A. Busca, A. Amoroso
- Applicabilità dell'algoritmo TCE DPB1 nella ricerca del donatore su una coorte monocentrica di pazienti consecutivi con attivazione MUD per allotrapianto** pag. 19  
Crocchiolo Roberto, Girgenti Debora, Cornacchini Giorgia, Lando Giuliana, De Marco Beatrice, Magliano Gabriele, Grillo Giovanni, Rossini Silvano
- Incidenza di anticorpi anti-hla e primary graft failure in pazienti pediatrici affetti da patologie ematologiche candidati a trapianto di cellule staminali emopoietiche** pag. 20  
Paola Giustiniani, Maria Troiano, Antonio Giuseppe Bianculli, Federica Galaverna, Pietro Merli, Roberto Carta, Marco Becilli, Tiziana Galluccio, Mariarosa Battarra, Giuseppe Testa, Marco Andreani, Franco Locatelli
- Trapianto aploidentico di cellule staminali ematopoietiche e anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) in un gruppo di pazienti pediatrici del Policlinico San Matteo di Pavia** pag. 21  
Cacciatore R., Pasi A., Bergamaschi P., Giorgiani G., Comoli P., Sbarsi I., Chiesa L., Radaelli C., Pizzochero C., Monti C., Perotti C., Zecca M.
- Ruolo degli anticorpi anti-HLA e degli anticorpi donatore specifici (DSA) nel TCSE in un gruppo di pazienti adulti del Policlinico San Matteo di Pavia** pag. 22  
Cacciatore R., Pasi A., Bergamaschi P., Caldera D., Colombo A., Troletti D., Sbarsi I., Chiesa L., Radaelli C., Monti C., Hoffmann M., Perotti C., Bernasconi P., Arcaini L.
- Associazione tra frequenza di alleli hla e suscettibilità a covid19 in un gruppo di 99 pazienti italiani** pag. 24  
Marco Andreani, Antonio Novelli, Paola Giustiniani, Mariarosa Battarra, Andrea Di Luzio, Antonio Bianculli, Rita Carsetti, Franco Locatelli, Giuseppe Novelli
- Polimorfismo del sistema HLA e risposta anticorpale al vaccino anti-Covid BNT162b2** pag. 25  
Crocchiolo Roberto, Gallina Anna Maria, Pani Arianna, Campisi Daniela, Cento Valeria, Sacchi Nicoletta, Miotti Valeria, Gagliardi Oscar Matteo, Vismara Chiara, Cornacchini Giorgia, Lando Giuliana, Cuppari Irene, Scaglione Francesco, Rossini Silvano
- L'analisi ad alta risoluzione del locus HLA DQB1\*02 può discriminare le miopatie infiammatorie idiopatiche (IIM) ad esordio adulto e giovanile? Descrizione di un caso clinico** pag. 26  
Longo Domenico, Giuffrida Vincenza, Romeo Petronilla Daniela, Gugliandolo Letterio, Marino Rosa, Franchina Veronica, Ricciardi Giuseppina Rosaria Rita, Russo Alessandro, Cacciola Francesca, Neri Santo, Terrizzi Piero, Li Gioi Felicina, Mannina Donato, Adamo Vincenzo
- L'antigene HLA B27 può dare protezione al COVID-19?** pag. 27  
Vittoriano Torrelli, Olaida J. Valdez, Barbara Spaziani, Carla Cervelli, Raffaella Azzarone, Maria Scimitarra, Carla Battistoni, Daniela Fracassi, Daniela Pulcinelli, Simona Scacchi, Stefano Scipione, Roberta Martinelli e Franco Papola
- Anticorpi anti-at1r e gravità del covid-19** pag. 28  
Franco Papola, Alessia Rosciano, Veronica Biancofiore, Chiara Angeletti, Alessandro Grimaldi, Anna Cecilia Carucci, Vincenza Cofini, Stefano Necozone, Franco Marinangeli, Carla Cervelli
- Presenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 e possibile associazione con Diabete Mellito di tipo 1** pag. 29  
Sgobba V., Labate C., Merli R., Troiano R., Manduca J., Russello E., Zanelli

<b>Studio del chimerismo misto lineage-specifico in un paziente pediatrico affetto da LLA a cellule T</b>	pag. 31
Madalese D., Maisto G., Auriemma L., Nappo S., Toriello M., Tambaro F.P., Penta de Vera d'Aragona	
<b>Alleli hla rari identificati mediante tecnologia ngs nella popolazione di donatori volontari ibmdr afferenti al cd tv01</b>	pag. 32
Elisabetta Durante, Elena Seganfredo, Simona Primerano, Debora Lorenzon, Daniela Scarpelli, Valentina Gobbo, Lorenzo Florese, Fabrizio Armellin, Arianna Veronesi	
<b>Metodo di validazione e verifica delle funzionalita' del wipe test per il controllo dell'inquinamento da templati di DNA</b>	pag. 33
Raffaella Azzarone, Daniela Pulcinelli, Olaida J. Valdez, Carla Cervelli, Carla Battistoni, Barbara Spaziani, Simona Scacchi, Daniela Fracassi, Stefano Scipione, Maria Scimitarra e Franco Papola	
<b>Rilevanza della strategia di tipizzazione in un caso di hla loss</b>	pag. 34
Francone M., Arcati V., Imbesi N., Genovese G., Saladino R.E.	
<b>Le attività di donazione e trapianto da non familiare durante la pandemia COVID -19: come la rete Italiana ha garantito la continuità delle cure</b>	pag. 36
Nicoletta Sacchi, Cristina Costa, Francesca Vagnozzi, Renato Marciano, Simona Pollichieni	
<b>L'analisi del locus KIR3DL1/S1 rivela, nella popolazione italiana, la presenza dell'allele null KIR3DS1*049N.</b>	pag. 38
Michela Falco, Raffaella Meazza, Franco Locatelli, Lorenzo Moretta, Cristina Bottino e Daniela Pende	

## Trapianto di Organi Solidi

## Epitope Compatibility, the new HLA challenge

Antonio G. Bianculli<sup>1</sup>, Paola Giustiniani<sup>1</sup>, Maria Troiano<sup>1</sup>, Luca Dello Strologo<sup>2</sup>, Marco Spada<sup>3</sup>, Raffaella Labbadia<sup>4</sup>, Maria Cristina Saffioti<sup>3</sup>, Isabella Guzzo<sup>4</sup>, Giuseppe Maggiore<sup>3</sup>, Andrea Di Luzio<sup>1</sup>, Annalisa Guagnano<sup>1</sup>, Marco Andreani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS - Roma

<sup>2</sup> Dipartimento di Nefrologia e Urologia, U.O. di Nefrologia e Dialisi - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS - Roma

<sup>3</sup> Chirurgia Epato-Bilio-Pancreatica e dei trapianti di fegato e di rene - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS - Roma

<sup>4</sup> Unità di Nefrologia, dialisi e trapianto renale - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS – Roma

Al fine di ottenere la maggiore compatibilità HLA nel trapianto di organo solido, così da garantire la più elevata sopravvivenza dell'organo trapiantato, sta emergendo la consapevolezza che appare incompleto fermarsi al Crossmatch Virtuale (v-XM), il quale ci fornisce indicazioni sul numero di mismatch tra le tipizzazioni HLA della coppia donatore-ricevente, oltre a predire il risultato dei crossmatch cellulari sulla base dello stato di pre-sensibilizzazione anti-HLA del ricevente. Infatti, un apparente mismatch antigenico potrebbe non risultare tale poiché costituito da epitopi presenti negli altri alleli HLA del paziente.

L'analisi che ci permette di valutare i mismatch epitopici è possibile grazie all'Epitope Matching che ci permette di stabilire l'*epitope compatibility* tra donatore e ricevente.

La correlazione tra numero di Epitope Mismatch e sopravvivenza dell'organo trapiantato è dimostrata da numerosi recenti studi, i quali suggeriscono quindi l'opportunità di standardizzare e rendere fruibili le fasce di stratificazione del rischio sulla base di Epitope Mismatch, suddividendole per classe e locus e di creare un cut-off sulla base del numero dei mismatch; inoltre, alla luce di tali studi, nasce l'esigenza di definire, oltre al numero dei mismatch, se e quali epitopi siano più immunogeni di altri.

Nel periodo gennaio 2020 – luglio 2021, sono state prese in esame 33 coppie in studio da donatore vivente, i cui i pazienti risultavano 9 candidati a trapianto di fegato e 24 a trapianto di rene, afferenti al centro trapianti dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

I risultati dei crossmatch sono stati correlati con quelli delle tipizzazioni HLA eseguite in alta risoluzione con metodica NGS e dei relativi studi anticorpali anti-HLA eseguiti con metodica FlowPRA e Luminex Single Antigen attraverso l'uso del software FUSION Matchmaker - Epitope Matching.

I 33 pazienti oggetto di studio sono risultati: PRA IgG I e II 0% in 15 casi (45%) e PRA IgG I e/o II positivi in 18 casi (55%). Inoltre, risultavano avere un PRA IgM I e II 0% in 24 casi (73%) e un PRA IgM I e/o II =positivi in 9 casi (27%), di cui in 2 casi (6%) positivi solo per anti-HLA di isotipo IgM.

L'analisi anticorpale è stata completata dallo studio dei sieri dei pazienti, dal quale è emerso in quattro di essi la presenza di anticorpi circolanti DSA a bassa intensità di fluorescenza, in 2 casi di isotipo IgG, in 2 casi isotipo IgM. L'analisi con Epitope Matching ha evidenziato che il più alto numero di Epitope Mismatch Verified è stato riscontrato sul locus A (11 pazienti registravano un numero di mismatch da 6 a 10, 8 pazienti da 1 a 5 e un paziente con più di 11 mismatch), e sul locus B (7 pazienti registravano un numero di mismatch da 6 a 10 e 16 pazienti da 1 a 5 e un paziente più di 11 mismatch). Al contrario, il più basso numero di Epitope Mismatch Verified è stato riscontrato sul locus DP (15 pazienti non registravano mismatch e 10 pazienti da 1 a 5), sui loci DRB3/4/5 (16 pazienti non registravano mismatch e 11 pazienti da 1 a 5), e infine sul locus C (7 pazienti non registravano mismatch e 21 pazienti da 1 a 5).

Gli epitopi mismatched più frequentemente presenti nella nostra popolazione di riferimento sono risultati: 52PL3 e 55PP (11% locus DQ), 37YV (11% locus DRB1), 11STS, 57DE e 57DEDP (10% locus DRB1), 193PL3, 21H, 267QE, 65QKR+76VS e 73AN (9% locus C), 80TLR e 44RT+69TNT (7% locus B) e 82LR+145R (6% locus A). Alla luce di queste prime evidenze, i dati ottenuti suggeriscono che l'uso del software FUSION Matchmaker - Epitope Matching può rappresentare uno strumento utile al fine di suggerire il miglior donatore, poiché può affiancare l'indicazione sul minore numero di Epitope Mismatch ottenibile tra le coppie donatore-ricevente ai criteri stabiliti dalle linee guida nazionali.

## Monitoraggio del rigetto acuto del trapianto polmonare mediante un nuovo metodo di analisi del DNA libero circolante proveniente dal donatore

Monica Sorbini<sup>1</sup>, Gabriele Togliatto<sup>1</sup>, Fiorenza Mioli<sup>1</sup>, Margherita Cappuccio<sup>1</sup>, Francesca Arruga<sup>1</sup>, Paolo Solidoro<sup>1,2</sup>, Mauro Rinaldi<sup>3</sup>, Massimo Boffini<sup>3</sup>, Erika Simonato<sup>3</sup>, Matteo Marro<sup>3</sup>, Mauro Giulio Papotti<sup>4</sup>, Luisa Delsedime<sup>5</sup>, Alessandro Gambella<sup>1</sup>, Tiziana Vaisitti<sup>1</sup>, Antonio Amoroso<sup>1,6</sup>, Silvia Deaglio<sup>1,6</sup>.

(1) Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino; (2) SCU Pneumologia, Città della Salute e della Scienza di Torino; (3) Chirurgia cardiaca, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Torino; (4) Anatomia Patologica, Dipartimento di Oncologia, Università di Torino; (5) Unità di Anatomia Patologica, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino; (6) Centro Regionale Trapianti del Piemonte, Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino.

Il DNA libero circolante proveniente dal donatore (dd-cfDNA) rappresenta un biomcatore di rapida determinazione e non invasivo per il monitoraggio del rigetto nei trapianti d'organo. L'obiettivo di questo lavoro è valutare se la quantificazione del dd-cfDNA basata sul *mismatch* HLA al locus *DRB1* possa essere un utile biomcatore di rigetto acuto nel trapianto di polmone.

Lo studio ha analizzato 30 pazienti (15 maschi, 50,0%) sottoposti a trapianto di polmone tra giugno 2019 e marzo 2021. Il dd-cfDNA, purificato da 372 biopsie liquide effettuate nel post-trapianto, è stato analizzato mediante *droplet digital PCR*, applicando un pannello di sonde specifiche per il gene *HLA-DRB1*. La percentuale di dd-cfDNA è stata correlata ai dati clinici e alla biopsia transbronchiale, effettuata in concomitanza alla biopsia liquida.

La coorte è composta da 21 riceventi trapianto bipolmonare (70,0%), 4 riceventi trapianto monopolmonare (13,3%) e 5 riceventi trapianto combinato (16,7%). L'età media al momento del trapianto è 47,4±17,0 anni, e la diagnosi più rappresentata è la fibrosi polmonare idiopatica (11 pazienti, 36,7%).

I risultati ottenuti mostrano che il dd-cfDNA è elevato nei primi giorni dopo il trapianto (6,36±5,36%), verosimilmente a causa del danno da ischemia-riperfusion. In assenza di rigetto, infezione o altro danno tissutale i valori di dd-cfDNA si attestano attorno al 2,18±3,26%, mentre in caso di comparsa di rigetto acuto alla biopsia transbronchiale aumentano al 7,81±12,7% ( $p < 0,0001$ ), correlando positivamente con il grado istologico di rigetto (A1-A2). È stata inoltre osservata una correlazione positiva tra i valori di dd-cfDNA e la proteina C reattiva ( $r=0,38$ ,  $p=0,0003$ ) e una correlazione negativa con la funzionalità respiratoria ( $r=-0,26$ ,  $p=0,0054$ ) indicata da FEV1. Tuttavia, i valori di dd-cfDNA risultano essere aumentati anche in presenza di infezioni respiratorie virali o batteriche (rispettivamente 7,88±14,9% e 7,59±11,1%,  $p=0,01$ ), non consentendo quindi una diagnosi differenziale tra le condizioni di rigetto acuto ed infezione.

Questi dati dimostrano che il dd-cfDNA può essere integrato in maniera efficace nel monitoraggio del rigetto acuto e delle complicanze in pazienti con trapianto di polmone.

## CASE REPORT: IMPORTANZA DEGLI ANTICORPI DSA IgM NELLA VALUTAZIONE PRE-TRAPIANTO DA DONATORE VIVENTE

M.Margiotta\*, F.Giorgio\*, S.Simone°, F.Piancone°, P.Gallo°, M.Rossini°, G.Lucarelli°, G.Mongelli\*, P.D'Aniello\*, S. De Franceschi\*, C. Martino\*, N. Menolascina\*, V.Monteleone\*, A. Spinelli\*, L. Gesualdo°, D. Mininni\*

\* UOSD Tipizzazione Tessutale e Biologia dei Trapianti AOUC Policlinico Bari

° UOC Nefrologia AOUC Policlinico Bari

Il ruolo degli anticorpi anti-HLA di classe IgM rimane controverso nella gestione del trapianto renale.

Donna di 37 anni B.A, con diagnosi di Nefropatia ischemica, nel 2018 ha avviato iter diagnostico per trapianto, considerando la madre come donatrice.

HLA paziente: A\*68/26 B\*58/45 C\*07/06 DRB1\*08/07 DQB1\*04/02

HLA donatrice: A\*26/29 B\*45/38 C\*06/12 DRB1\*07/04 DQB1\*02/03(DQ8) DQA1\*02:01/03:01

Primo crossmatch CDC positivo per IgM, da ricondurre a sindrome di DRESS da allopurinolo e paracetamolo.

La valutazione anticorpale anti-HLA (Luminex S.A. I/ II classe, IgG e IgM. One Lambda) ha evidenziato potenziale DSA IgM DQ8 (MFI= 2000). Nel 2021 è ripreso lo studio della coppia candidata. Due crossmatch CDC entrambi negativi con situazione anticorpale stabile: **IgG** Classe I: A80, A1 (MFI: 7000,1800) e Classe II: DQA1\*03:02, DQB1\*06:03 (MFI 1600,1200). **IgM** Classe I: assenti e Classe II: DQA1\*03:02, DQ8, DQA1\*05:03, DQA1\*06:01, DQA1\*05:05, DQ7, DQ9, DP19 (MFI da 3100 a 1200) con potenziale DSA DQ8 (MFI: 3000). L'applicazione del software di analisi MatchMaker/Fusion (One Lambda) ha permesso di considerare la specificità DQA1\*03:02, presente sia come IgG (MFI:1600) che IgM (MFI:3100), potenzialmente immunogena per condivisione di stesso epitopo con il DQA1\*03:01 del donatore. La paziente è stata sottoposta a seduta aferetica pre-Tx (cascadeflo EC30W), con negativizzazione del DQ8 IgM (MFI:500). Trapiantata in data 08/06/2021 è stata trattata con Steroidi e Thymoglobuline, con ripresa della funzionalità renale. In 7° giornata, compaiono IgG DSA de novo DQ8 (5600), DR4 (3000), in continuo aumento fino al 28/06/2021: IgG DQ8(12600), DQA1\*03:01(2700), DR4(1400). La valutazione con metodica C1q Luminex ha presentato unico DSAdn IgG DQ8 (600). In condizioni di funzione renale stabile, dal 30/06 la paziente ha eseguito III° trattamento aferetico EC30W, Immunoglobulina umana 10 g e.v. Rituximab 500 mg e.v. con progressiva riduzione dei valori di MFI dei DSAdn fino alla sola stabilizzazione del DQ8 (3500). Questo caso ha evidenziato uno switch isotipico di un DSA IgM pre-Tx in un DSA de novo IgG, C1q negativo, in assenza di segni clinici di rigetto. L'iter diagnostico per un trapianto di rene da donatore vivente dovrebbe porre attenzione alla presenza di anticorpi anti-HLA sia di tipo IgG che IgM ed all'applicazione di software interpretativi, tipo MatchMaker, per individuare non solo gli Ab preformati donatore specifico ma anche quelli che mostrano epitopi comuni, anch'essi potenzialmente immunogeni.

## CROSS-MATCH CITOFUORIMETRICO (FC-MX) POSITIVO: TRAPIANTO SÌ O TRAPIANTO NO?

Benecci M., Giuliadori S., Magni E., Muratori P., Parrotta J., Zanelli P.

S.S.D. Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Italia

### Introduzione

Un cross-match in citotossicità complemento-dipendente (CDC-XM) positivo viene considerato criterio di esclusione del paziente dal trapianto renale.

L'utilizzo di FC-XM, metodica più sensibile, fa attendere un aumento dei risultati positivi.

### Materiali e Metodi

Sono stati eseguiti, a posteriori per validare la metodica, 140 FC-XM in pazienti trapiantati di rene da donatore cadavere.

I riceventi non avevano anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA, MFI $\geq$ 3000) ed erano negativi, o positivi sui linfociti B, al CDC-XM.

Il FC-XM è stato eseguito su citofluorimetro BD-Lyric con protocollo Halifax.

È stato utilizzato come CUT-OFF uno scostamento dal controllo negativo di 50 canali (MCS) per i T e di 150 per i B.

Sono stati considerati positivi deboli valori di 51-150 MCS per i T e di 151-300 per i B.

### Risultati e Conclusioni

Il CDC-XM era negativo in 114 pazienti (81,4%) e positivo sui B in 26(18,6%).

Il FC-XM era negativo in 49 pazienti (35%) e positivo in 91(65%); 15(16%) erano positivi solo sui T, 10(11%) solo sui B e 66(73%) su T e B.

Dei 91 positivi 69(76%) avevano CDC-XM negativo e 22(24%) positivo sui B; solo 4(2,9%) erano positivi sui B in CDC-XM e negativi in FC-XM (probabili IgM).

Dei 91 positivi 43(47%) presentano solo deboli positività.

Suddividendo i positivi su T e B in 4 classi in base alla positività (positivo/positivo debole):

il 36,4% erano positivi T e B, il 10,6% positivi sui T e positivi deboli sui B, il 24,2% positivi deboli sui T e positivi sui B, il 28,8% positivi deboli T e B.

In circa la metà dei FC-XM positivi, la positività riguardava uno solo dei sieri esaminati (quasi sempre un siero storico).

Il follow-up di 24 pazienti con FC-XM positivo su 45(53%), trapiantati al 02/21, non ha evidenziato nessun episodio di rigetto anticorpo-mediato (AMR).

La valutazione dei follow-up sul numero completo dei FC-XM positivi giunti al trapianto è tutt'ora in corso. Da questi dati potremo meglio comprendere quale rischio immunologico attribuire ai FC-XM positivi.

Se infatti la positività al FC-XM fosse stata interpretata alla stregua di quella in CDC il 65% di questi pazienti non sarebbero stati trapiantati; questo numero scenderebbe al 34% se fossero stati trapiantati quelli con debole positività. Un FC-XM positivo in assenza di DSA non deve quindi rappresentare una preclusione al trapianto.

## **Alterazioni dello stato di pre-sensibilizzazione nei pazienti in lista d'attesa per trapianto di Pancreas-Rene/Pancreas conseguente a vaccinazione anti-Covid 19**

<sup>2</sup>Fabio Vistoli, <sup>1</sup>Silvia Fornaciari, <sup>1</sup>Veronica De Gregorio, <sup>1</sup>Chiara Biagini, <sup>2</sup>Emanuele Kauffmann, <sup>2</sup>Tina Cacace, <sup>1</sup>Roberta Lamanna, <sup>1</sup>Lidia Felet, <sup>1</sup>Debora Gonnella, <sup>2</sup>Ugo Boggi, <sup>3</sup>Adriano Peris, <sup>4</sup>Maria Luisa Migliaccio, <sup>1</sup>Michele Curcio

<sup>1</sup>SOD Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>2</sup>UO Chirurgia Generale e dei Trapianti-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>3</sup>SOC Cure intensive del trauma e delle gravi insufficienze d'organo-Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze

<sup>4</sup>Centro Regionale Allocazione Organi e Tessuti (CRAOT), Firenze

Trasfusioni, gravidanze e precedenti trapianti rappresentano la principale causa di immunizzazione. Inoltre, infezioni e vaccinazioni possono in alcuni casi influenzare o alterare lo stato immunologico del paziente.

La sindrome respiratoria acuta da nuovo Coronavirus (Sars-Cov-2) ha reso necessaria in maniera tempestiva e prioritaria la vaccinazione dei pazienti in lista per trapianto di organo solido.

In questo studio abbiamo valutato l'impatto della vaccinazione anti-Covid 19 sullo stato di pre-sensibilizzazione dei pazienti in lista di attesa per trapianto di Pancreas-Rene/Pancreas (P-RP) afferenti al Centro Trapianto dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana. A tale scopo, sono stati arruolati 27 pazienti vaccinati con BNT162b mRNA "Covid 19" (Pfizer Biontech) o mRNA-1273 (Moderna). Tutti i pazienti sono stati studiati prima della vaccinazione (T0) attraverso tecnologia Luminex (L-SAB I e II classe) per la ricerca di anticorpi preformati anti-HLA. A tre settimane dal completamento del ciclo vaccinale i pazienti sono stati nuovamente analizzati con le modalità precedenti.

Dei 27 pazienti analizzati, il 15% (n. 4) ha evidenziato una alterazione dello stato iniziale di pre-sensibilizzazione. In 2 pazienti è stato riscontrato un aumento del numero delle specificità anticorpali di I e II classe. I rimanenti 2 pazienti hanno mostrato un'alterazione della sola I o II classe. Nessun aumento o variazione statisticamente significativa è stata evidenziata a carico dei valori dell'Intensità di Fluorescenza Media (MFI).

Sebbene l'utilizzo di vaccini di nuova generazione, come quello da nuovo Coronavirus, prevedano due cicli di somministrazione, a causa della loro bassa immunogenicità, i nostri dati suggeriscono che in alcuni pazienti la vaccinazione anti-Covid-19 correli con lo sviluppo di nuove specificità anticorpali anti-HLA. I nostri risultati sono preliminari e necessitano di essere confermati su un numero maggiore di pazienti tenuto conto anche della variabilità soggettiva della risposta immunologica al vaccino. Qualora altri studi confermassero i nostri dati, sarebbe auspicabile considerare la vaccinazione anti-Covid 19 come un importante evento immunizzante da tenere in considerazione nelle fasi di valutazione di Istocompatibilità.

## VALUTAZIONE DELLA FREQUENZA DEGLI ALLELI HLA E STATO DI PRE-SENSIBILIZZAZIONE IN PAZIENTI IN ATTESA DI TRAPIANTO DI PANCREAS

<sup>1</sup>Silvia Fornaciari, <sup>1</sup>Chiara Biagini, <sup>2</sup>Fabio Vistoli, <sup>3</sup>Simone Lapi, <sup>3</sup>Elisa Biagi, <sup>2</sup>Tina Cacace, <sup>2</sup>Emanuele Kauffmann, <sup>1</sup>Roberta Lamanna, <sup>1</sup>Veronica De Gregorio, <sup>2</sup>Ugo Boggi, <sup>4</sup>Adriano Peris, <sup>5</sup>Maria Luisa Migliaccio, <sup>1</sup>Francesco Galati, <sup>1</sup>Serena Di Beo, <sup>1</sup>Michele Curcio

<sup>1</sup>SOD Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>2</sup>UO Chirurgia Generale e dei Trapianti-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>3</sup>SOD Biobanche-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>4</sup>SOC Cure intensive del trauma e delle gravi insufficienze d'organo-Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze

<sup>5</sup>Centro Regionale Allocazione Organi e Tessuti (CRAOT), Firenze

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (HLA) svolge un ruolo importante nella risposta immunitaria e nel rigetto del trapianto; è noto che la presenza di anticorpi anti-HLA pre-trapianto specifici rivolti verso il donatore (DSA) è correlata al rigetto d'organo. Inoltre, particolari aplotipi come l'HLA DR3-DQ2 e DR4-DQ8 predispongono allo sviluppo del diabete di tipo 1.

L'obiettivo dello studio è indagare l'eventuale correlazione tra le frequenze degli alleli HLA e la presenza di anticorpi preformati anti-HLA in pazienti in attesa di trapianto di pancreas. Sono stati arruolati 1003 pazienti così stratificati: 72 trapianti di pancreas isolato (PTA), 211 trapianti di rene/pancreas simultaneo (SPK), 20 trapianti di pancreas dopo rene (PAK) e 750 trapianti di rene isolato (KTA).

La tipizzazione HLA-A\*, B\*, C\*, DRB1\* e DQB1\* è stata eseguita mediante tecniche di biologia molecolare e lo studio di pre-sensibilizzazione attraverso la tecnologia xMAP (Luminex).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata tra le popolazioni PTA, SPK e PAK ( $p > 0.05$ ). Pertanto, i tre gruppi sono stati considerati come unica popolazione (n. 303) per le successive analisi (Merged Pancreas Kidney-MPK). Le frequenze alleliche MPK sono state confrontate con quelle presenti nel database "Allele Frequency Net Database" (AFND). L'analisi ha evidenziato un aumento statisticamente significativo della frequenza degli alleli HLA-DRB1\*03, DRB1\*04, DQB1\*02 rispetto alla popolazione generale ( $p < 0.01$ ). Al contrario le frequenze HLA-DRB1\*11 e DRB1\*15 sono risultate inferiori alle attese ( $p < 0.01$ ). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i pazienti KTA e la popolazione generale ( $p > 0.05$ ). La frazione dei pazienti che presentavano Ab anti-HLA prima del trapianto è risultata essere la stessa (30%) per ciascuna popolazione analizzata (PTA, SPK, PAK e KTA).

In accordo con quanto riportato in letteratura, i nostri risultati confermano un aumento delle frequenze degli Ag HLA-DR3, -DR4 nelle popolazioni PTA, SPK e PAK che tuttavia sembrano non influenzare il tasso di positività degli Ab anti-HLA prima del trapianto. Un'osservazione interessante è che gli alleli HLA-DRB1\*11, DRB1\*15 e DQB1\*06 sembra possano svolgere un ruolo protettivo allo sviluppo del diabete di tipo I.

## **Analisi dello stato di pre-sensibilizzazione dei pazienti trapiantati di Pancreas e Rene/Pancreas in era pre-Luminex**

<sup>1</sup>Chiara Biagini, <sup>2</sup>Fabio Vistoli, <sup>2</sup>Tina Cacace, <sup>3</sup>Simone Lapi, <sup>3</sup>Francesca Nocchi, <sup>1</sup>Silvia Fornaciari, <sup>2</sup>Emanuele Kauffmann, <sup>1</sup>Roberta Lamanna, <sup>1</sup>Veronica De Gregorio, <sup>2</sup>Ugo Boggi, <sup>4</sup>Adriano Peris, <sup>5</sup>Maria Luisa Migliaccio, <sup>1</sup>Domenica Mandarino, <sup>1</sup>Federica Salvadori, <sup>1</sup>Michele Curcio

<sup>1</sup>SOD Dipartimentale di Immunogenetica-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>2</sup>UO Chirurgia Generale e dei Trapianti-Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>3</sup>SOD Biobanche- Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

<sup>4</sup>SOC Cure intensive del trauma e delle gravi insufficienze d'organo-Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze

<sup>5</sup>Centro Regionale Allocazione Organi e Tessuti (CRAOT), Firenze

Presso il Centro Trapianti dell'AOUP lo studio di pre-sensibilizzazione dei pazienti, da avviare a trapianto di organo solido, veniva effettuato fino al 2008 attraverso metodiche in CDC ed in fase solida (ELISA). Quest'ultima a partire dal 2009 è stata sostituita dalla tecnologia xMAP (Luminex) potenzialmente in grado di evidenziare specificità anticorpali anti-HLA anche a bassi livelli.

Nel presente studio è stato valutato lo stato di pre-sensibilizzazione e la presenza di eventuali anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) dei sierici storici pre-Tx, compresi tra il 2005 ed il 2008 (pre-Luminex), inviati a trapianto di Pancreas e Rene-Pancreas. I sierici erano conservati presso la SOD Biobanche dell'AOUP come previsto dal programma avviato nel 2005 dall' Organizzazione Toscana Trapianti (OTT).

Nello studio è stato arruolato l'89% (n. 95) delle coppie Donatori/Riceventi disponibili (n. 112). I sierici dei pazienti sono stati analizzati per la presenza di Ab-anti HLA di classe I e II. Quelli reattivi e/o dubbi sono stati analizzati attraverso l'identificazione dei singoli antigeni (L-SAB) di classe I e/o II per caratterizzare livello e specificità anticorpali.

Su 95 pazienti totali il 33% (n. 31) hanno manifestato rigetto acuto. Di questi il 58% (n.18) sono risultati positivi allo studio Luminex: 26% (n. 8) L-SAB positivi alla classe I ed il 32% (n.10) L-SAB alla classe II. La presenza di DSA è stata evidenziata nel 6% (n. 6) della popolazione: 13% (n. 4 ) dei pazienti con rigetto e 6.4 % (n. 2) dei pazienti con normale funzionalità del graft.

Nessuna correlazione statisticamente significativa ( $p>0,05$ ) è stata trovata confrontando la popolazione con e senza rigetto e la distribuzione degli Ab anti HLA di classe I e II. Allo stesso modo, nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nella distribuzione dei DSA di classe I tra le due popolazioni con e senza rigetto: 13% vs 6.4%. La presenza dei DSA di classe II è stata evidenziata solo nella popolazione con rigetto. I valori dell'Intensità di Fluorescenza Media (MFI), delle singole specificità anticorpali di Classe I  $>5000$  MFI e di II classe  $>1000$  MFI, sembrerebbero correlare con il rigetto d'organo.

In conclusione, i nostri dati indicano che l'utilizzo della tecnologia Luminex completa in maniera ottimale il percorso di valutazione della coppia Don/Ric nella fase pre-TX riducendo di circa un 4% la quota dei rigetti.

## Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche

## **Influenza delle divergenze evolutive del sistema HLA (HED) sull'andamento clinico del trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatori non correlati in pazienti pediatriche affette da malattie ematologiche maligne**

Marco Andreani,<sup>1</sup> Rita Maria Pinto,<sup>2</sup> Luisa Strocchio,<sup>2</sup> Pietro Merli,<sup>2</sup> Mattia Algeri,<sup>2</sup> Francesca Del Bufalo,<sup>2</sup> Daria Pagliara,<sup>2</sup> Marco Becilli,<sup>2</sup> Roberto Carta,<sup>2</sup> Antonio Giacomo Grasso,<sup>2</sup> Francesco Quagliarella,<sup>2</sup> Giulia Boz,<sup>2</sup> Emilia Boccieri,<sup>2</sup> Annalisa Guagnano,<sup>1</sup> Maria Troiano,<sup>1</sup> Katharina Fleischhauer,<sup>3</sup> Franco Locatelli<sup>2,4</sup> e Pietro Crivello<sup>3</sup>

1. Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia
2. Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy
3. Institute for Experimental Cellular Therapy, University Hospital Essen, Essen, Germany
4. Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Le divergenze genetiche tra i diversi alleli HLA sono alla base di una efficiente protezione immunologica nei confronti di tumori e infezioni da patogeni che si concretizza attraverso la capacità delle diverse molecole HLA di presentare diversi peptidi antigenici alle cellule immunocompetenti. Un elevato grado di variabilità del sistema HLA in pazienti oncologici, stimato attraverso lo *score* relativo alle divergenze evolutive del sistema HLA (HED - HLA evolutionary divergence) è stato associato ad un miglior andamento clinico dopo trattamento con farmaci inibitori del checkpoint immunitario o successivamente al trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche (HSCT) negli adulti. In questo studio abbiamo retrospettivamente analizzato questa possibile associazione in un gruppo di 144 pazienti pediatriche affette da disordini ematologici maligni trattati con un trapianto da donatore non correlato (MUD) caratterizzato da una compatibilità HLA di 9-10/10 nel Dipartimento di Onco-Ematologia dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma. La tipizzazione HLA è stata eseguita attraverso tecniche di sequenziamento, in parte SBT ed in parte NGS, e il valore dello *score* HED è stato calcolato sommando le differenze aminoacidiche nelle diverse coppie di alleli HLA-A, B, C o DRB1, quantificate usando la matrice di punteggio Grantham Distance. In linea con precedenti osservazioni, il locus HLA-DRB1 ha mostrato i valori più elevati di HED score (mediana 10.98), seguito da HLA-A, B and C (mediane 8.10, 8.07 and 4.82, rispettivamente). I pazienti con HED maggiore della mediana nei loci HLA-B e -DRB1 hanno mostrato in analisi univariata una migliore disease free survival (DFS  $p=0.018$  and  $p=0.022$ , rispettivamente) e una migliore overall survival soltanto per il locus HLA-DRB1 ( $p=0.037$ ). L'impatto sulla DFS si è confermato statisticamente significativo in analisi multivariata con un valore di HR di 0.51 (95% CI 0.27-0.93,  $p=0.03$ ) per HLA-B e HR di 0.53 (95% CI 0.28-0.98,  $p=0.04$ ) per HLA-DRB1. Un trend di miglioramento della DFS è stato osservato in pazienti con leucemia linfoblastica acuta con alti valori di HED, mentre un andamento simile è emerso in pazienti con neoplasie mieloproliferative in associazione ad un valore elevato di HED per il solo locus HLA-DRB1. Questi risultati indicano che un elevato score HED per HLA-B e HLA-DRB1 potrebbe predire l'andamento del trapianto in bambini e/o giovani adulti. Se verranno confermati in una più ampia coorte, questi risultati potrebbero indirizzare la selezione per un donatore alternativo al MUD (ad esempio aploidentico o di cordone ombelicale) in pazienti con un valore di HED per i loci HLA-B e HLA-DRB1 più basso.

## **ASSOCIAZIONE TRA VALORI DI PIRCHE E ANDAMENTO DEL TRAPIANTO IN PAZIENTI PEDIATRICI CON PATOLOGIE EMATOLOGICHE MALIGNHE SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE APLOIDENTICO**

Andreani M<sup>1</sup>, Merli P<sup>2</sup>, Testa G<sup>1</sup>, Galluccio T<sup>1</sup>, Pinto R<sup>2</sup>, Locatelli F<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

<sup>3</sup>Università La Sapienza, Roma, Italy

E' noto che il polimorfismo del sistema HLA rappresenta un ostacolo per la ricerca di un donatore compatibile per pazienti affetti da patologie ematologiche sottoposti ad un trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT). Dati presenti in letteratura dimostrano come differenze antigeniche e/o alleliche tra donatori (sia correlati che non correlati - MUD), possano influenzare l'andamento clinico del trapianto, focalizzando l'attenzione sulla possibilità di individuare "mismatched" permissivi. A questo proposito, Geneugelijk ha recentemente reso fruibile un software, chiamato PIRCHE (Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes) in grado di predire l'alloreattività indiretta tra donatore e ricevente dopo HSCT a carico dei linfociti T. L'obiettivo dell'utilizzo di tale algoritmo è quello di determinare il numero di "eplets-mismatches" di classe I (PIRCHE-I) e di classe II (PIRCHE-II) nella scelta del donatore, in particolare per quanto riguarda i MUD. In una recente pubblicazione lo stesso autore ha dimostrato come un elevato score di PIRCHE-II rappresenti un fattore di rischio per pazienti sottoposti a trapianto da MUD mismatched 8-9/10 per quanto riguarda la probabilità di sopravvivenza (OS), se confrontata con pazienti con valori di PIRCHE-II più bassi; oppure nei confronti di pazienti matched 10/10. L'introduzione nella routine trapiantologica di donatori aploidentici ha dimostrato che nonostante le numerose diversità antigeniche per le molecole HLA tra donatore e ricevente, questo tipo di approccio abbia prodotto ottimi risultati clinici, sia in pazienti pediatrici che adulti. In questo studio abbiamo analizzato il possibile ruolo delle differenze in PIRCHE in una casistica di 80 pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico in un singolo centro (Locatelli, Blood 2017) utilizzando l'algoritmo PIRCHE disponibile online. Sebbene non raggiunga un valore statisticamente significativo, abbiamo osservato una più alta sopravvivenza in pazienti con un valore di PIRCHE-I maggiore di 36 e un diminuito rischio di sviluppare una aGvH. Benché interessanti, questi dati iniziali necessitano di una più ampia casistica e di un maggior approfondimento prima di poter trarre conclusioni definitive.

## Probabilità di matching e dimensione dell'IBMDR

N. Sacchi, S. Pollichieni, C. Costa, F. Vagnozzi, R. Marciano, E. Raggio, A. Gallina

Registro italiano donatori di midollo osseo, IBMDR - E.O. Ospedali Galliera, Genova

**Introduzione** L'enorme polimorfismo del sistema HLA ha reso necessario iscrivere elevati numeri di soggetti ai registri per aumentare la probabilità di reperire donatori non familiari HLA compatibili per i pazienti in attesa di trapianto di CSE. Questo studio stima la probabilità di trovare almeno un donatore IBMDR 8/8 compatibile (HLA-ABC e DRB1) in alta risoluzione o 7/8 (con una differenza HLA in I classe) per pazienti di origine italiana, a seconda della dimensione del nostro Registro, al fine di impostare una corretta strategia di reclutamento e aumentare l'efficienza dell'IBMDR.

**Materiali e metodi** Le frequenze allotipiche HLA-ABC e DRB1 in alta risoluzione (HR) sono state calcolate con il programma Arlequin, utilizzando i fenotipi HLA di oltre 100.000 donatori IBMDR. Sono state stimate le frequenze dei 25.057 allotipi italiani più frequenti (freq. cumulativa del 99,99%) e le frequenze allotipiche regionali sulla base del luogo di nascita di un set di dati di 104.135 donatori. Per calcolare le probabilità di matching (MP) all'aumento della dimensione del registro sono state utilizzate le formule descritte da Schmidt (1).

**Risultati** La MP di trovare almeno un donatore HLA compatibile 8/8 in alta risoluzione è stata 17,5% in un registro italiano con una ipotetica dimensione di 100.000 donatori, 23,8% in 200.000, 27,8 in 300.000, 33,4% in 500.000, 41,4% in 1 milione e 49,7 in una simulazione con 2 milioni di iscritti. La MP di trovare almeno un donatore compatibile 7/8, con una differenza HLA in I classe, è stata 53,4% in 100.000 donatori, 62,8% in 200.000, 67,8 in 300.000, 73,6% in 500.000, 80,3% in 1 milione e 85,6 in 2 milioni. Con lo stesso approccio, utilizzando i dati delle frequenze allotipiche regionali si è stimata la probabilità che un donatore nuovo iscritto originario di una specifica regione introduca un nuovo fenotipo HLA HR non ancora rappresentato nell'inventario IBMDR. Attualmente, con l'eccezione della Sardegna, in tutte le regioni italiane il reclutamento introduce ancora nuovi fenotipi in più del 74% dei casi.

**Conclusioni** Questo studio fornisce importanti informazioni e strumenti per definire la dimensione ottimale del registro italiano IBMDR e, di conseguenza, per pianificare e supportare il reclutamento dei donatori e la loro tipizzazione, con particolare attenzione alle regioni italiane dove è più conveniente investire nel reclutamento dei donatori per il maggiore polimorfismo delle caratteristiche HLA.

- 1) Schmidt AH, Sauter J, Pingel J, Ehninger G. Toward an optimal global stem cell donor recruitment strategy. PLoS ONE. 2014;9:e86605.

## Trapianto di CSE: ruolo delle sostituzioni aminoacidiche nei siti di legame dell'antigene

<sup>1</sup>D. Bongioanni, <sup>1</sup>F.E. Bertinetto, <sup>1</sup>N.M. Ferrero, <sup>1</sup>E. Garino, <sup>1</sup>A. Giordano, <sup>1</sup>P. Magistrone, <sup>1</sup>G.A. Mazzola, <sup>1</sup>T. Melchiorre, <sup>1</sup>E. Navaretti, <sup>1</sup>L. Rocchi, <sup>2</sup>C.M. Dellacasa, <sup>2</sup>L. Giaccone, <sup>2</sup>A. Busca, <sup>1</sup>A. Amoroso

<sup>1</sup>S.C. Immunogenetica e Biologia dei Trapianti U., AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino

<sup>2</sup>SSD Trapianti di CSE, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino

Non sempre è possibile avere a disposizione un donatore 10/10 HLA compatibile e per questo motivo è necessario indagare la relazione tra i mismatch e l'andamento del trapianto. Sono interessanti gli studi condotti sulle sostituzioni aminoacidiche nei siti di legame dell'antigene (Pidala J et al, Blood, 2013) ed in particolare i mismatch HLA-B in posizione 9 (aumento GvHD cronica), HLA-C 99 (aumento mortalità trapianto correlata), HLA-C 116 (aumento GvHD acuta). Tali mismatch possono essere non permissivi o permissivi a seconda che cambi o no l'aminoacido. Per analizzare l'impatto sull'andamento dei trapianti è stato condotto uno studio retrospettivo in collaborazione con il Centro Trapianti del Presidio Molinette sulle coppie trapiantate dal 2005 (inizio tipizzazioni in alta risoluzione) ad oggi. Si è tipizzato usando i kit GenDx (SBTexcellerator fino al 2017, poi NGSgo) e analizzata la permissività con il tool di allineamento delle sequenze (IPD-IMGT/HLA). Dal 2005 sono stati eseguiti 1695 trapianti di CSE su riceventi adulti di cui 932 (55%) allotrapianti da: donatore familiare HLA identico (330, 35%), familiare aploidentico (117, 13%) e MUD (485, 52%). L'analisi è stata eseguita confrontando 4 gruppi di riceventi che hanno effettuato un primo trapianto da: familiare APLO (106), MUD 10/10 (240), MUD 9/10 con un mismatch permissivo al locus HLA-B o HLA-C (MM-P, 45), MUD 9/10 con un mismatch non permissivo al locus HLA-B o HLA-C (MM-NP, 39). Questi gruppi sono stati analizzati in relazione a sesso, età, patologia del ricevente, insorgenza e severità di GvHD, profilassi immunosoppressiva, fonte di CSE e sono stati confrontati per la sopravvivenza del paziente (i ritrapiantati sono stati considerati censored alla data del ritrapianto). A 3 anni dal trapianto la sopravvivenza dei trapianti APLO, MUD e MM-P risulta essere simile (circa 53%), mentre per i trapianti MM-NP è 34%. In particolare, confrontando solo i gruppi MM-P e MM-NP, anche a 5 anni dal trapianto, i primi hanno una sopravvivenza del 52% rispetto al 32% dei secondi ( $p=0.04$ ). Il laboratorio, sulla base dei risultati ottenuti, continuerà a fornire tale informazione al Centro Trapianti sia come strumento per la selezione del donatore qualora presenti più donatori 9/10 o comunque per modulare la terapia.

## **Applicabilità dell'algoritmo TCE DPB1 nella ricerca del donatore su una coorte monocentrica di pazienti consecutivi con attivazione MUD per allotrapianto**

Crocchiolo Roberto <sup>1</sup>, Girgenti Debora <sup>1</sup>, Cornacchini Giorgia <sup>1</sup>, Lando Giuliana <sup>1</sup>, De Marco Beatrice <sup>2</sup>, Magliano Gabriele <sup>2</sup>, Grillo Giovanni <sup>2</sup>, Rossini Silvano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; <sup>2</sup> Centro Trapianti Midollo, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano.

**Introduzione:** una recente survey AIBT ha mostrato che l'utilizzo dell'algoritmo DPB1-TCE è aumentato, passando dal 24% al 65% dei centri tra il 2010 ed il 2019; la motivazione principale del non utilizzo è la riferita difficile applicabilità dell'algoritmo stesso, legata alla percepita rarità di situazioni in cui più di 1 donatore potenziale è 10/10- or 9/10-matched ma differente rispetto al TCE (P vs. nonP). L'obiettivo della presente analisi è identificare la % di tali casi partendo da dati retrospettivi monocentrici.

**Pazienti e Metodi:** sono stati incluse tutte le ricerche MUD presso l'ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda di Milano dal luglio 2013 al luglio 2019 e sono stati analizzati il numero di test di conferma giunti al laboratorio HLA e di questi l'esito di compatibilità allelica ai loci A-B-C-DRB1-DQB1 e secondo l'algoritmo DPB1-TCE3.

**Risultati:** le ricerche MUD valutabili ai fini dello studio sono n=199 di cui n=120 con almeno 2 campioni giunti al laboratorio HLA per test di conferma; in n=84 casi almeno 2 donatori potenziali sono compatibili allo stesso livello, 10/10 o 9/10-matched, e dal punto di vista del TCE3 la suddivisione in P/P, nonP/nonP e P/nonP è come segue: n=32, n=22, n=22 (n=8 non valutabili). Il gruppo P/nonP rappresenta i casi in cui l'algoritmo è applicabile per la scelta del donatore, rappresentando il 18% delle ricerche con almeno 2 test di conferma ed il 26% di quelle con almeno 2 donatori con pari compatibilità, 10/10 o 9/10, tra i quali il DP potrebbe fare la differenza.

**Conclusioni:** la presente analisi mostra che l'algoritmo TCE3 è applicabile nel 18% delle ricerche MUD che abbiano almeno 2 test di conferma giunti al laboratorio HLA, contribuendo a meglio definire il posizionamento del TCE nel contesto della ricerca MUD.

## **INCIDENZA DI ANTICORPI ANTI-HLA E PRIMARY GRAFT FAILURE IN PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA PATOLOGIE EMATOLOGICHE CANDIDATI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE**

Paola Giustiniani<sup>1</sup>, Maria Troiano<sup>1</sup>, Antonio Giuseppe Bianculli<sup>1</sup>, Federica Galaverna<sup>2</sup>, Pietro Merli<sup>2</sup>, Roberto Carta<sup>2</sup>, Marco Becilli<sup>2</sup>, Tiziana Galluccio<sup>1</sup>, Mariarosa Battarra<sup>1</sup>, Giuseppe Testa<sup>1</sup>, Marco Andreani<sup>1</sup>, Franco Locatelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS - Roma; <sup>2</sup> Dipartimento di Oncoematologia e Terapia Cellulare e Genica- Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS – Roma

In pazienti ematologici candidati a trapianto di cellule staminali emopoietiche, in particolare da donatore aploidentico, la presenza di anticorpi anti-HLA nel siero dei pazienti è correlata ad un aumento del rischio di perdita del trapianto. Tali anticorpi, se diretti verso antigeni codificati dall'aplotipo non condiviso del donatore (DSA), e se presenti con un livello di intensità di fluorescenza media (MFI) superiore a 5000 possono contribuire alla possibilità di sviluppare Primary Graft Failure (GF).

Lo scopo dello studio è stata l'identificazione della distribuzione di anticorpi anti-HLA IgG di I e II classe attraverso la metodica Luminex Single Antigen in campioni di siero di 403 pazienti pediatrici candidati a trapianto di CSE raccolti da maggio 2017 ad aprile 2021 nell'ambito di uno screening pre-trapianto, di cui 275 pazienti affetti da emopatie maligne e 128 da emopatie non maligne. E' stata inoltre osservata l'incidenza di GF nei pazienti sottoposti a trapianto di CSE, considerando un follow up di 3-18 mesi.

I risultati ottenuti nei pazienti affetti da emopatie maligne mostrano una incidenza di anticorpi anti-HLA in almeno una delle due classi in 92 pazienti su 275 (33%). Il 7% ha presentato valori di MFI>5000. Nei pazienti affetti da emopatie non maligne lo studio ha riscontrato la presenza di anticorpi anti-HLA in 81 pazienti su 128 (63%) mostrando una significativa differenza di incidenza paragonata al gruppo di pazienti affetti da emopatie maligne ( $p<0,0001$ ). Il 23% dei pazienti affetti da emopatie non maligne ha mostrato un valore di MFI>5000. Tra i 403 pazienti sottoposti a trapianto di CSE, 16 pazienti hanno mostrato GF, 15 pazienti dopo trapianto aploidentico e 1 paziente dopo trapianto MUD; in particolare la GF si è manifestata in 5 pazienti affetti da patologie maligne (1,8%) e 11 affetti da patologie non maligne (8.6%), mostrando una aumentata incidenza di GF nel gruppo di pazienti con emopatie non maligne rispetto alle emopatie maligne ( $p<0,01$ ). 10 su 11 pazienti affetti da emopatie non maligne colpiti da GF (91%) hanno mostrato nel siero la presenza di anticorpi anti-HLA (di cui 5 con MFI compreso tra 1000 e 5000 e 5 con valori di MFI maggiori di 5000). 3 su 5 pazienti affetti da emopatie maligne colpiti da GF (60%) hanno mostrato nel siero la presenza di anticorpi anti-HLA (di cui 2 con MFI compreso tra 1000 e 5000 e 1 con un valore di MFI maggiore di 5000).

In questo studio i dati ottenuti mostrano una maggiore incidenza di anticorpi anti-HLA nei pazienti affetti da emopatie non maligne ( $p<0,0001$ ). Inoltre, è stata riscontrata una maggiore incidenza di GF in pazienti con emopatie non maligne rispetto ai pazienti affetti da emopatie maligne ( $p<0,01$ ): il 91% dei pazienti affetti da emopatie non maligne che hanno presentato GF sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-HLA

## **Trapianto aploidentico di cellule staminali ematopoietiche e anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) in un gruppo di pazienti pediatrici del Policlinico San Matteo di Pavia.**

Cacciatore R.<sup>1</sup>, Pasi A.<sup>1</sup>, Bergamaschi P.<sup>1</sup>, Giorgiani G.<sup>2</sup>, Comoli P.<sup>2</sup>, Sbarsi I.<sup>1</sup>, Chiesa L.<sup>1</sup>, Radaelli C.<sup>1</sup>, Pizzochero C.<sup>1</sup>, Monti C.<sup>1</sup>, Perotti C.<sup>3</sup>, Zecca M.<sup>2</sup>

1 Laboratorio di Immunogenetica, Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

2 Dipartimento di Ematologia-Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

3 Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) rappresenta la principale strategia terapeutica per la cura delle malattie ematologiche. Tuttavia è una procedura ad alto rischio associata a complicanze come ritardo dell'attecchimento, GVHD, rigetto e ricaduta. Il 30% dei candidati non trova il donatore ideale nel nucleo familiare o nei Registri; di conseguenza il TCSE viene eseguito da donatori alternativi. Dato il numero crescente di trapianti aploidentici, il rigetto è diventato un rischio potenzialmente rilevante.

La presenza di anticorpi anti-HLA è associata ad incremento di *graft failure* e diminuzione della sopravvivenza nel trapianto di organo solido. Recentemente i Donor Specific Antibodies (DSA) sono stati riscontrati anche nel TCSE.

Abbiamo analizzato retrospettivamente 68 pazienti pediatrici sottoposti ad aplo- TCSE tra il 2010 e il 2018. Il 78% aveva patologie maligne. Il siero è stato studiato mediante Luminex LABScreen mixed e Single Antigens. 17 pazienti erano Ab anti-HLA positivi (25%) di cui 9 presentavano DSA. Abbiamo valutato l'effetto dei DSA e degli Ab anti-HLA sull'outcome trapiantologico. 6 pazienti (9%) hanno presentato rigetto immunomediato (RI). Di questi, 3 pz erano DSA positivi (50%) vs 6/62 (10%) che non hanno sviluppato rigetto ( $p < 0.05$ ; OR=9.33). 10 dei 68 pazienti analizzati hanno mostrato *poor engraftment* (PE). Di questi, il 50% era DSA positivo vs 4/58 (7%) con buon attecchimento ( $p < 0.005$ ; OR=12.59). Anche la presenza di Ab anti-HLA, pur in misura minore rispetto ai DSA, correla in modo positivo con PE. Infatti il 60% dei pz con *poor engraftment* era Ab anti-HLA positivo vs 11/58 (19%) con buon attecchimento ( $p < 0.05$ ; OR=6.18).

Ciò sembra indicare un ruolo degli Ab anti-HLA. Non è stata trovata associazione tra DSA, OS (Overall Survival) e TRM (Transplant Related Mortality). I dati dovranno essere confermati aumentando la numerosità campionaria; tuttavia sono già indicativi per un utilizzo dei DSA nella selezione del donatore HLA parzialmente compatibile. In presenza di più candidati, il donatore verso il quale il paziente non presenta DSA offre più chance di successo trapiantologico, soprattutto in termini di capacità di *engraftment* e prevenzione del rigetto.

## **Ruolo degli anticorpi anti-HLA e degli anticorpi donatore specifici (DSA) nel TCSE in un gruppo di pazienti adulti del Policlinico San Matteo di Pavia.**

Cacciatore R.<sup>1</sup>, Pasi A.<sup>1</sup>, Bergamaschi P.<sup>1</sup>, Caldera D.<sup>2</sup>, Colombo A.<sup>2</sup>, Troletti D.<sup>3</sup>, Sbarsi I.<sup>1</sup>, Chiesa L.<sup>1</sup>, Radaelli C.<sup>1</sup>, Monti C.<sup>1</sup>, Hoffmann M.<sup>2</sup>, Perotti C.<sup>3</sup>, Bernasconi P.<sup>2</sup>, Arcaini L.<sup>4</sup>

1 Laboratorio di Immunogenetica, Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

2 UOS Centro Trapianti - UOC Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

3 Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

4 UOC Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

Al fine di valutare il ruolo degli anticorpi anti HLA nell'outcome del TCSE (Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche), sono stati analizzati 46 pazienti adulti provenienti dal Dipartimento di Ematologia. I pz sono stati testati per la presenza di Ab anti-HLA mediante tecnologia Luminex su campioni di siero raccolti prima del trapianto. I pazienti erano tutti affetti da patologie maligne. 16/46 (35%) pz presentavano anticorpi anti HLA e 5/46 (11%) erano DSA (Donor Specific Antibody) positivi ed hanno ricevuto un trapianto di cellule staminali ematopoietiche da un figlio; in tre casi su cinque è stato effettuato un trapianto nella direzione "figlio vs madre". Un pz è deceduto dopo 19 giorni dal trapianto, senza possibilità di valutare l'attecchimento. 3/39 (8%) pz hanno mostrato poor engraftment (PE) e 36/39 (92%) hanno raggiunto un buon attecchimento. 2/3 (67%) pz con poor engraftment erano DSA positivi vs 2/36 (5%) che hanno raggiunto un buon attecchimento ( $p=0,02$ ; OR= 26,79). Questo risultato è in linea con quanto riportato dalla letteratura dove la presenza di DSA è stata associata alla *Graft Failure* ed in particolare alla *Primary Graft Failure*. Da un'analisi multivariata su DSA, *Poor Engraftment*, *Graft versus Host Disease*, *TRM* e recidiva, la presenza di DSA è risultata un fattore di rischio per il poor engraftment ( $p=0,02$ ). Si segnala che tutti i 5 pazienti in cui è stata riscontrata aGvHD di grado superiore a I presentavano Ab anti-HLA mentre i 4 casi di aGvHD di grado I erano pazienti non alloimmunizzati. In particolare la aGvHD di grado II-IV è stata riscontrata con una frequenza significativamente più elevata nei pazienti che presentano Ab anti-HLA di classe I rispetto ai pazienti Ab anti-HLA di classe I negativi (66,67% vs 3,33%,  $p < 0,05$ ). Tale risultato è stato descritto anche in studi precedenti [Ansari *et al*, 2013; Pan *et al*, 2016; Nickel *et al*. 2020]. Di conseguenza, ipotizziamo che gli Ab anti-HLA possano giocare un ruolo importante nella patogenesi della aGvHD, partecipando attraverso un legame diretto o attraverso meccanismi indiretti, all'immunità umorale e cellulare, avendo così una parte fondamentale nel processo infiammatorio che merita ulteriori approfondimenti.

**HLA e malattie**

## **ASSOCIAZIONE TRA FREQUENZA DI ALLELI HLA E SUSCETTIBILITA' A COVID19 IN UN GRUPPO DI 99 PAZIENTI ITALIANI**

Marco Andreani<sup>1</sup>, Antonio Novelli<sup>2</sup>, Paola Giustiniani<sup>1</sup>, Mariarosa Battarra<sup>1</sup>, Andrea Di Luzio<sup>1</sup>, Antonio Bianculli<sup>1</sup>, Rita Carsetti<sup>3</sup>, Franco Locatelli<sup>4</sup>, Giuseppe Novelli<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Immunogenetica dei Trapianti, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italia

<sup>2</sup>Laboratory of Medical Genetics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

<sup>3</sup>Immunology Research Area B-cell development Unit Immunological Diagnosis Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

<sup>4</sup>Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS and Sapienza University of Rome, Rome, Italy

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Nevada, USA and University of Rome Tor Vergata, Department of Experimental Medicine, Rome, Italy

Covid19 è una sindrome respiratoria acuta causata dal virus SARS-CoV-2, che negli ultimi mesi ha infettato milioni di individui in tutto il mondo, causando una disastrosa pandemia caratterizzata purtroppo da un numero impressionante di decessi. Le attuali ricerche stanno cercando di comprendere quali siano i possibili meccanismi responsabili di una buona risposta immunitaria indotta in risposta al virus, incluso il ruolo delle molecole del sistema HLA, in base alla loro frequenza e distribuzione nelle diverse popolazioni. Benché ad oggi si siano ottenuti risultati contrastanti da questi studi, è bene ricordare che il sistema HLA, costituito da uno specifico gruppo di molecole espresse sulla superficie cellulare, svolge un ruolo cruciale nel riconoscimento degli antigeni "non-self" da parte del sistema immunitario. Con lo scopo di individuare alleli HLA che potessero riflettere una più alta sensibilità alla malattia, in questo studio abbiamo analizzato le frequenze degli alleli HLA in un gruppo di 99 pazienti Italiani affetti sia da una severa che da una estremamente severa forma di Covid19. Successivamente all'applicazione della correzione di Bonferroni per test multipli, abbiamo individuato una significativa associazione per gli alleli HLA-DRB1\*15:01,-DQB1\*06:02 e -B\*27:07 confrontando i risultati con un gruppo di riferimento di 1017 individui Italiani, precedentemente tipizzati nel nostro laboratorio. L'aumentata frequenza nel gruppo dei 99 pazienti Italiani affetti da severe forme di Covid19 degli alleli HLA-DRB1\*15:01 e -DQB1\*06:02 (in forte linkage disequilibrium tra loro) conferma parzialmente i risultati pubblicati da Kaghuri et al. che identifica questi stessi all'interno di altri 7 suscettibili alleli HLA. Nonostante la bassa numerosità del campione analizzato – che potrebbe rappresentare un rischio di falsa positività – crediamo che le nostre osservazioni possano essere un interessante contributo da condividere per verificare la potenziale capacità di specifici alleli HLA di interagire con il virus SARS-CoV-2, integrandoli con più ampi studi multicentrici.

## Polimorfismo del sistema HLA e risposta anticorpale al vaccino anti-Covid BNT162b2

Crocchiolo Roberto<sup>1</sup>, Gallina Anna Maria<sup>2</sup>, Pani Arianna<sup>3,4</sup>, Campisi Daniela<sup>4</sup>, Cento Valeria<sup>3,4</sup>, Sacchi Nicoletta<sup>2</sup>, Miotti Valeria<sup>5</sup>, Gagliardi Oscar Matteo<sup>6</sup>, Vismara Chiara<sup>4</sup>, Cornacchini Giorgia<sup>1</sup>, Lando Giuliana<sup>1</sup>, Cuppari Irene<sup>1</sup>, Scaglione Francesco<sup>3,4</sup>, Rossini Silvano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy; <sup>2</sup> Italian Bone Marrow Donor Registry, E. O. Ospedali Galliera, Genova, Italy; <sup>3</sup> Department of Oncology and Hemato-Oncology, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy; <sup>4</sup> Chemical-Clinical and Microbiological Analyses, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano, Italy; <sup>5</sup> Laboratory of Immunogenetics, Santa Maria della Misericordia University Hospital, Udine, Italy; <sup>6</sup> Postgraduate School of Clinical Pharmacology and Toxicology, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy.

### Abstract

**Introduzione:** il sistema HLA è oggetto di molti studi nell'ambito dell'infezione Covid-19, tuttavia al momento attuale pochi sono i dati nell'ambito della risposta al vaccino. Poiché il polimorfismo del sistema HLA impatta sul numero e sull'affinità dei peptidi della proteina Spike presentati al sistema immunitario, la presente analisi è volta ad identificare eventuali assetti HLA associati alla risposta post-vaccino e pertanto potenzialmente implicati nell'efficacia vaccinale.

**Metodi:** riportiamo qui le frequenze alleliche HLA di n=111 individui sottoposti al vaccino ad RNA messaggero BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), confrontate con una popolazione di riferimento rappresentata da circa 120,000 donatori sani di CSE da registro IBMDR, come riportato da Sacchi et al. (HLA 2019). Il campione in studio è stato selezionato sulla base del titolo anticorpale relativamente basso (<5° percentile) misurato 2 settimane dopo la seconda dose vaccinale, su un totale di n=2,569 vaccinati presso l'ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda di Milano tra il 27/12/19 ed il 18/2/20. La tipizzazione è stata eseguita a 4-digits sui loci A, B, C e DRB1 in modo da essere confrontabile con la popolazione di riferimento. Lo studio è stato approvato dal CE Milano Area 3 e dall'ISS (progetto "RENAISSANCE").

**Risultati:** sono state ritrovate alcune differenze statisticamente significative nella frequenza di alcuni alleli (HLA-A\*03:01, A\*33:03, B\*35:02, B\*58:01, B\*37:01, B\*49:01, C\*05:01, DRB1\*16:01 e DRB1\*03:01) e di almeno 1 alotipo (HLA-A\*2402~B\*1801~C\*0701~DRB1\*1104) potenzialmente associati ad una risposta anticorpale post-vaccinale più bassa, insieme all'età anagrafica, più alta nel campione in studio rispetto ai restanti vaccinati. Non sono state osservate differenze su altri fattori quali sesso, BMI o comorbidità.

**Conclusioni:** i nostri risultati potrebbero suggerire un ruolo da parte di alcuni alleli HLA e di almeno 1 alotipo nella produzione di anticorpi post-vaccino BNT162b2, dando potenziali indicazioni sull'efficacia vaccinale. Studi successivi sono necessari al fine di interpretare tali dati che sono di natura esplorativa e per meglio definire il ruolo del polimorfismo del sistema HLA sulla risposta ai vaccini anti-Covid.

## L'analisi ad alta risoluzione del locus HLA DQB1\*02 può discriminare le miopatie infiammatorie idiopatiche (IIM) ad esordio adulto e giovanile? Descrizione di un caso clinico

Longo Domenico<sup>(1)(2)</sup>, Giuffrida Vincenza<sup>(1)</sup>, Romeo Petronilla Daniela<sup>(1)(2)</sup>, Gugliandolo Letterio<sup>(1)</sup>, Marino Rosa<sup>(1)</sup>, Franchina Veronica<sup>(2)</sup>, Ricciardi Giuseppina Rosaria Rita<sup>(2)</sup>, Russo Alessandro<sup>(2)</sup>, Cacciola Francesca<sup>(2)</sup>, Neri Santo<sup>(1)</sup>, Terrizzi Piero<sup>(1)</sup>, Li Gioi Felicina<sup>(1)</sup>, Mannina Donato<sup>(1)</sup>, Adamo Vincenzo<sup>(2)(3)</sup>

<sup>(1)</sup>U.O.C Ematologia Laboratorio di Tipizzazione Tissutale HLA e CDME01, Azienda Ospedaliera Papardo, Messina

<sup>(2)</sup> U.O.C. Oncologia Medica, Azienda Ospedaliera Papardo, Messina

<sup>(3)</sup> Dipartimento di Patologia Umana, Università degli Studi di Messina, Messina

**Introduzione.** Le miopatie infiammatorie croniche idiopatiche (IIM)<sup>1-2</sup> sono rare patologie autoimmuni clinicamente eterogenee, caratterizzate da debolezza muscolare e coinvolgimento di organi sistemici. Comprendono dermatomiosite, miosite a corpi inclusi, miopatia necrotizzante immuno-mediata, polimiosite e sindrome da antisintetasi<sup>1-2</sup>. Abbiamo indagato l'eventuale correlazione tra IMM e pattern HLA associato alla sensibilità al glutine in un paziente caucasico che riferiva debolezza muscolare dall'età di 17 anni rispondente ad una dieta priva di glutine recidivata a 39 anni.

**Materiali e metodi.** Sono state eseguite l'analisi HLA mediante Sequence Specific Primers e Sequence Specific Oligonucleotides e la ricerca di autoanticorpi miosite-specifici: anti PL7, anti PL12, anti SignalRecognitionParticle, anti Mi2, anti EJ, anti MDA-5, anti TF1 gamma, anti SAE1 / 2, anti NXP-2, anti HMGR.

**Risultati.** Sono stati rilevati gli aplotipi: DRB1\*03:01, DRB1\*11:04; DQA1\*05:01, DQA1\*05:05; DQB1\*02:01, DQB1\*03:01. Gli autoanticorpi sono risultati tutti negativi.

**Discussione.** La combinazione DRB1\*03, DQA1\*05:01, DQB1\*02:01 (DR3-DQ2) e DRB1\*11, DQA1\*05:05, DQB1\*03:01 (DR5-DQ7) conferisce un alto rischio per la sensibilità al glutine<sup>3</sup>, nonostante la negatività riscontrata per anti-transglutaminasi, anti-gliadina e anti-endomisio.

S.Rothwell, in pazienti positivi per anti-TIF1 utilizza il sistema HLA DQB1\*02 H.R. per distinguere l'esordio in età adulta (HLA-DQB1\*02:02) e l'esordio in età giovanile (DQB1\*02:01), quest'ultimo, strettamente associato con HLA-DRB1\*03:01, predispone maggiormente all'insorgenza della miosite in età giovanile<sup>4</sup>.

Il nostro caso presenta l'aplotipo ancestrale 8.1 HLA-DRB1\*03-DQA1\*05-DQB1\*02 (predisponente alla polimiosite) e l'aplotipo HLA-DQB1\*02:01-HLA DRB1\*03:01 strettamente associato all'insorgenza giovanile. L'analisi dot blot potrebbe non aver rilevato rari autoanticorpi anti-TIF1 non inclusi nei line-blot disponibili in commercio<sup>4</sup>. La nostra esperienza evidenzia come la genotipizzazione HLA potrebbe essere uno strumento utile per la migliore diagnosi clinica e per una terapia mirata in base al tempo di insorgenza della malattia.

### Bibliografia

1. Lundberg IE, Tjárnlund A, Bottai M, et al. European League against Rheumatism/American College of rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Arthritis Rheumatol* 2017;2017:2271–82.
2. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, et al. Development of a new classification system for idiopathic inflammatory myopathies based on clinical manifestations and myositis-specific autoantibodies. *JAMA Neurol* 2018;75.
3. Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, Maluenda C, de la Concha EGH. HLA-linked genes acting as additive susceptibility factors in celiac disease *Hum Immunol*. 1995 Apr;42(4):295-300.
4. Simon Rothwell, Hector Chinoy, Janine A Lamb, et al. Focused HLA analysis in Caucasians with myositis identifies significant associations with autoantibody subgroups *Ann Rheum Dis* 2019;78:996–1002.

## L'antigene HLA B27 può dare protezione al COVID-19?

Vittoriano Torrelli, Olaida J. Valdez, Barbara Spaziani, Carla Cervelli, Raffaella Azzarone, Maria Scimitarra, Carla Battistoni, Daniela Fracassi, Daniela Pulcinelli, Simona Scacchi, Stefano Scipione, Roberta Martinelli e Franco Papola

Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale Ospedale Civile S.Salvatore ASL1 Abruzzo - L'Aquila

1- UOSD Medici Competenti ed Autorizzati ASL1 Abruzzo - L'Aquila

**Introduzione** La malattia da Sars-CoV-2 (COVID-19) è causa di gravi complicanze, tra cui tromboembolia, insufficienza multiorgano e sindrome da stress respiratorio acuto (ARDS). Nel presente lavoro, abbiamo studiato l'associazione tra l'antigene leucocitario umano (HLA) di classe I B27, che predispone allo sviluppo di molte patologie autoimmuni, come la spondilite anchilosante e che secondo alcuni studi sembra avere un ruolo protettivo contro l'HIV, l'epatite C e l'influenza, e il tempo di guarigione da COVID-19, prendendo in considerazione la data del primo tampone negativo dopo quello risultato positivo analizzato presso l'Ospedale San Salvatore di L'Aquila. Il tempo dell'osservazione prende in considerazione i mesi che vanno da marzo 2020 a dicembre 2020.

**Materiali e metodi** I dati relativi a 35 pazienti che hanno contratto il virus SARS-CoV-2 sono stati estratti dagli archivi informatici del Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale e del Laboratorio Analisi dell'Ospedale San Salvatore di L'Aquila, secondo le vigenti norme per la privacy. I pazienti che hanno contratto il virus SARS-CoV-2 sono stati divisi in due gruppi: il primo gruppo è composto da 8 pazienti portatori dell'allele HLA B\*27, il secondo gruppo è composto da 27 pazienti non portatori dell'allele HLA B\*27.

**Risultati** Nel periodo preso in considerazione nel primo gruppo di 8 pazienti portatori dell'allele HLA B\*27 infettati, 7 pazienti hanno avuto un tempo di negativizzazione del tampone inferiore ai 10 giorni, un solo paziente ha avuto un tempo di negativizzazione superiore ai 10 giorni; nessuno dei pazienti ha avuto sintomi gravi da COVID-19. Nel secondo gruppo composto da 27 pazienti non portatori dell'allele HLA B\*27, 6 pazienti hanno avuto un tempo di negativizzazione del tampone inferiore ai 10 giorni e 21 pazienti hanno avuto un tempo di negativizzazione del tampone superiore ai 10 giorni arrivando, in alcuni casi anche a superare i 30 giorni. L'analisi statistica ha mostrato un  $\chi^2 = 11,26$  con un  $p = 0,00079$ . Questo suggerisce che un individuo HLA B\*27 positivo potrebbe presentare un'attività cellulo-mediata più efficace e tempestiva verso il Sars-CoV-2 con una sua eliminazione in tempi più brevi rispetto a soggetti HLA-B\*27 negativi proteggendo anche dalle complicazioni frequenti in questa patologia. Uno studio con una numerosità più ampia è necessario per convalidare questa osservazione.

## ANTICORPI ANTI-AT1R E GRAVITA' DEL COVID-19

Franco Papola<sup>1</sup>, Alessia Rosciano<sup>1</sup>, Veronica Biancofiore<sup>2</sup>, Chiara Angeletti<sup>3</sup>, Alessandro Grimaldi<sup>4</sup>, Anna Cecilia Carucci<sup>4</sup>, Vincenza Cofini<sup>5</sup>, Stefano Necozone<sup>5</sup>, Franco Marinangeli<sup>3</sup>, Carla Cervelli<sup>1</sup>

1 Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale Ospedale S.Salvatore L'Aquila.  
2 Anestesiologia, Terapia Intensiva e medicina del dolore, Dipartimento di Emergenza, Ospedale S.Salvatore L'Aquila.

3 Anestesiologia, Terapia Intensiva e medicina del dolore, Dipartimento di Emergenza, Ospedale G. Mazzini Teramo.

4 Dipartimento di Malattie Infettive Ospedale S.Salvatore L'Aquila. 5 Dipartimento di Scienze della vita, salute e ambiente, Università di L'Aquila.

Il COVID-19 si manifesta con diversi gradi di gravità, da asintomatica a sintomatica molto grave. Il virus SARS-CoV-2 infetta le cellule ospiti attraverso il recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE2) su epitelio respiratorio. L'occupazione del sito ACE2 da parte di SARS Cov-2 favorisce l'aumento dell'Angiotensina2 (Ang2) sierica che stimola l'AT1R e attiva la risposta proinfiammatoria mediata da ADAM17, con aumentato rilascio di citochine, quali TNF- $\alpha$ , IL6 ecc, tipico della tempesta citochinica delle forme gravi di COVID-19. Nel presente studio, abbiamo analizzato la correlazione fra la presenza di autoanticorpi anti-AT1R (antiAT1Rab) e l'andamento clinico di COVID-19, ipotizzando che anti-AT1Rab, interferendo con l'azione di Ang2 su AT1R, possano modulare la cascata di citochine e di conseguenza l'esito della patologia.

### Materiali e Metodi

È stato eseguito uno studio retrospettivo su 74 pazienti con COVID-19 ricoverati in due ospedali della Regione Abruzzo (L'Aquila e Teramo). I campioni di siero dei pazienti sono stati testati per anti-AT1Rab e i dati sono stati confrontati con 129 soggetti sani del gruppo di controllo. La rilevazione di AT1Rab è stata eseguita utilizzando ELISA quantitativo, un test sandwich in fase solida (CellTrend GmbH, Luckenwakde, Germania) assumendo come soglia di positività  $\geq 10$  U/mL. Abbiamo suddiviso i 74 pazienti in 2 gruppi in base alla gravità dell'infezione: il gruppo grave (A), composto da 40 pazienti critici ricoverati in Unità di Terapia Intensiva (UTI) mentre il gruppo (B), lieve/moderato è composto da 34 pazienti ricoverati in ospedale con quadro respiratorio lieve.

### Risultati e Discussione

Anti-AT1Rab si riscontrano normalmente nella popolazione generale, la percentuale nel nostro gruppo di controllo è 29,46% (38/129) mentre nel gruppo di studio è del 15% (11/74)  $\chi^2$  test=5,468 (p=0,019). Nel gruppo A, 16/40 pazienti sono deceduti (40%) e nessuno di essi aveva anti-AT1Rab, mentre dei restanti 24 pazienti, sopravvissuti nonostante le loro gravi condizioni respiratorie, 7/40 (18%) mostravano antiAT1Rab, i restanti 17/40 (42%) non avevano anti-AT1Rab, quindi, complessivamente, 33/40 (82%) dei pazienti afferenti in terapia intensiva non mostravano anti-AT1Rab. I dati si sono dimostrati significativi  $\chi^2$  test=5.656, p = 0.017. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata confrontando età e sesso tra deceduti o sopravvissuti in UTI. I risultati suggeriscono che la presenza di anti-AT1Rab può svolgere un ruolo nell'infezione da Sars-Cov-2. Alla luce di quanto suddetto, a seguito dell'evidenza di anti-AT1Rab nella popolazione sana di controllo si possono formulare 2 ipotesi. Un'ipotesi potrebbe essere che il minor rischio di complicanze gravi nei pazienti COVID 19 con anti-AT1Rab sia conseguente ad uno stato di "tolleranza" indotto da uno stimolo cronico da parte di anti-AT1Rab sul proprio recettore. L'aumento di Ang2 sierica conseguente all'occupazione di ACE2 da parte di Sars-Cov-2 trova, quindi, nei soggetti positivi agli anti-AT1Rab, un sistema immunitario "refrattario" all'attivazione infiammatoria acuta, mentre nei soggetti privi di anti-AT1Rab potrebbe indurre una violenta tempesta citochinica. Un'altra ipotesi è che gli anti-AT1Rab competano con Ang2 nel legame con il recettore AT1R, determinando un aumento dell'Ang2 plasmatica che si rende disponibile a legarsi al recettore AT2R; mentre l'attivazione dell'AT1R promuove uno stato infiammatorio, l'attivazione dell'AT2R inibisce l'effetto infiammatorio, limitando quindi l'attivazione della tempesta di citochine, meccanismo analogo a quello dei sartani. In conclusione, anti-AT1Rab, quando presenti, potrebbero essere in grado di proteggere i pazienti da forme gravi di COVID-19, mentre la loro mancanza potrebbe correlare con sintomatologie più gravi.

## **Presenza di anticorpi anti-SARS-CoV-2 e possibile associazione con Diabete Mellito di tipo 1**

Sgobba V., Labate C., Merli R., Troiano R., Manduca J., Russello E., Zanelli

P. S.S.D. Immunogenetica dei Trapianti, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Italia

Si ipotizza che il Diabete Mellito di tipo 1 (DMT1) sia uno dei fattori che espone maggiormente allo sviluppo dell'infezione da SARS-CoV-2 e relative complicanze. Sono stati riportati in letteratura casi in cui l'infezione da SARS-CoV-2 ha provocato uno scompenso metabolico severo nel contesto di un diabete pre-esistente o all'origine di un diabete di nuova insorgenza. Nel primo semestre del 2021, in corrispondenza alla terza ondata pandemica, sono pervenute presso il nostro laboratorio un numero di richieste di ricerca di aplotipi associati al DMT1 paragonabile a quelle ricevute solitamente nell'arco di un intero anno. Al fine di capire se l'infezione da Covid19 potesse essere il fattore scatenante alla base di nuove diagnosi di diabete, è stata effettuata la ricerca degli anticorpi anti-SARS-CoV2 utilizzando il kit LABScreen™ COVID Plus (One Lambda) su una ristretta popolazione di pazienti pediatrici con diagnosi di DMT1, inviati dalla Diabetologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. In tutto sono stati studiati 13 soggetti: 5 femmine e 8 maschi di età media pari a  $7,5 \pm 3,6$  anni, nessuno dei quali sottoposto in precedenza a tampone molecolare per diagnosi di SARS-CoV2. Sulla base della tipizzazione dei loci HLA-DRB1, DQB1, DQA1 effettuata sui 13 pazienti, risulta che: 2 non presentano un aplotipo suscettibile per DMT1, 1 mostra un aplotipo mediamente suscettibile, 4 hanno due aplotipi fortemente suscettibili, i rimanenti 6 presentano 1 solo aplotipo fortemente suscettibile. In relazione alla ricerca di anticorpi anti-SARS-CoV-2, solo il soggetto con l'aplotipo mediamente suscettibile per diabete, è risultato positivo per la proteina Spike (S) e le subunità S1, RBD (Receptor-Binding Domain) e S2, i restanti 12 pazienti sono risultati negativi. I risultati ottenuti sulla nostra popolazione suggeriscono che non ci sia una relazione tra l'esordio di DMT1 e infezione da SARS-CoV-2. Tuttavia, informazioni più approfondite si potranno avere solo implementando la casistica. Poiché non è del tutto nota la correlazione tra infezione da SARS-CoV-2 e DMT1, è consigliabile mantenere uno stretto monitoraggio dei pazienti che presentano un'insorgenza di diabete durante la pandemia, al fine di evitare eventuali gravi complicanze.

**XXVII**

**Congresso  
Nazionale**

**AIBT**

Associazione Italiana  
di Immunogenetica  
e Biologia dei Trapianti

**Tecniche di laboratorio di Immunogenetica e  
Istocompatibilità**

## Studio del chimerismo misto lineage-specifico in un paziente pediatrico affetto da LLA a cellule T

Madalese D.<sup>1</sup>, Maisto G.<sup>1</sup>, Auriemma L.<sup>1</sup>, Nappo S.<sup>1</sup>, Toriello M.<sup>1</sup>, Tambaro F.P.<sup>2</sup>, Penta de Vera d'Aragona R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UOSD BaSCO, Manipolazione cellulare e Immunogenetica – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon

<sup>2</sup> UOC Trapianto di cellule emopoietiche e Terapia cellulari – A.O.R.N. Santobono-Pausilipon

**INTRODUZIONE** Il Trapianto allogenico di Cellule Staminali Ematopoietiche è oggi l'unico strumento terapeutico curativo per numerose patologie ematologiche maligne ed errori congeniti/malattie genetiche. Lo studio del chimerismo permette di valutare lo stato del "graft" e diagnosticare precocemente una ricomparsa della patologia di base indirizzando il clinico a specifiche terapie.

La presenza di chimerismo misto (MC), in cui coesistono emopoiesi del donatore e del ricevente, è descritta in patologie ematologiche non maligne. Qui riportiamo il caso di un paziente pediatrico affetto da Leucemia Linfoblastica T (LLA T) con un MC persistente non associato a recidiva di malattia a 4 anni dal trapianto.

**MATERIALI & METODI** Lo studio del chimerismo è stato effettuato mediante STR-PCR (PowerPlex Fusion Promega-24 markers). Il chimerismo è stato effettuato su sangue intero periferico/midollare e su popolazioni selezionate con metodica immunomagnetica MACS (StemCell EasySep CD3 e CD15 Positive Selection Kit). La purezza delle popolazioni è stata valutata in citofluorimetria con FACSCanto II (BD). L'estrazione del DNA è stata eseguita con Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit (Promega).

**RISULTATI** Il paziente affetto da LLA T ha effettuato un trapianto allogenico da donatore non familiare *full mached* dopo terapia mieloablative. Lo studio del chimerismo mostra un iniziale attecchimento del 100% (+30gg/+333gg) ed una graduale riduzione della percentuale di donatore, fino a stabilizzarsi al 30% (+730gg/+1460gg). Lo studio del chimerismo sulle popolazioni rivela una percentuale del donatore del 66% sui linfociti CD3<sup>+</sup> e del 15% sui granulociti CD15<sup>+</sup>. Il paziente presenta in citometria assenza di malattia ed un trend in costante aumento dei linfociti T<sub>reg</sub>: 1% (+730gg) ; 5% (+1460gg).

**CONCLUSIONI** Il MC è una condizione frequente in pazienti trapiantati ma è un fenomeno raro in patologie maligne come la LLA, dove un chimerismo del donatore ≤ 85% a 90/120 giorni è predittivo di ripresa di malattia entro i 3 anni.

In questo paziente la presenza del 66% di linfociti T del donatore e l'aumento delle T<sub>reg</sub> sono associate ad un out come favorevole e all'assenza di recidiva di malattia, facendo ipotizzare un ruolo di queste cellule nel meccanismo di tolleranza immunologica.

## ALLELI HLA RARI IDENTIFICATI MEDIANTE TECNOLOGIA NGS NELLA POPOLAZIONE DI DONATORI VOLONTARI IBMDR AFFERENTI AL CD TV01

Elisabetta Durante<sup>°</sup>, Elena Seganfredo<sup>°</sup>, Simona Primerano<sup>°</sup>, Debora Lorenzon\*, Daniela Scarpelli\*, Valentina Gobbo\*, Lorenzo Florese\*, Fabrizio Armellin\*, Arianna Veronesi<sup>°\*§</sup>

<sup>°</sup>Laboratorio di Istocompatibilità; \*Banca del Sangue Cordonale TVCBB; <sup>°\*§</sup>UOC Medicina TrASFusionale valenza provinciale AULSS2 Marca Trevigiana

### Premessa.

Il grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente ha un ruolo determinante per il successo del trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche (HSCT). L'elevato polimorfismo che caratterizza questo Sistema genetico, quindi, richiede strumenti di analisi con potenzialità tali da assicurare uno screening sofisticato dei donatori di CSE. L'introduzione nei Laboratori di tipizzazione HLA della tecnologia di sequenziamento Next-Generation (NGS) ha incrementato l'accuratezza del risultato abbassando la percentuale di ambiguità ed aumentando il potenziale di identificazione di alleli HLA rari o rarissimi e di nuove varianti, con conseguente aumento del grado di variabilità fenotipica rappresentata nei database. Il Laboratorio di Istocompatibilità della U.O.C. Medicina TrASFusionale di Treviso utilizza da Giugno 2020 questa tecnologia per la caratterizzazione genetica dei donatori volontari IBMDR (Italian Bone Marrow Donor Registry) da iscrivere al Registro Italiano.

### Metodi.

1. Campioni raccolti nel periodo 01/06/2020 - 31/07/2021: 895 campioni di sangue in EDTA di donatori volontari di etnia Caucasica e provenienti dalle Province di Treviso e Belluno di competenza del Centro Donatori IBMDR TV01 (CD TV01)
2. I campioni di DNA sono stati estratti utilizzando il sistema MAGLEAD<sup>®</sup>12gC (PSSco);
3. La tipizzazione HLA ai loci A,B,C,DRB1,DQB1,DPB1 è stata eseguita in sequenziamento NGS utilizzando i kit NGSgo-MX6<sup>®</sup> (software NGSengine<sup>®</sup>);
4. Tutti gli alleli rari e le nuove varianti sono stati confermati in sequenziamento secondo Sanger (SBT) utilizzando i kit SBTexcellerator<sup>®</sup> (GenDx), software SBTengine<sup>®</sup>.

### Risultati.

Sono stati identificati i seguenti alleli rari:

- A\*02:665
- B\*40:120
- B\*27:163
- B\*15:220
- C\*03:359
- C\*04:295
- C\*12:143

Sono stati, inoltre, identificate nuove varianti ai seguenti alleli:

- B\*18:01
- DRB1\*16:01
- DRB1\*15:02

depositate alla GenBank ed in attesa di assegnazione.

Tutti gli alleli sono stati identificati in un solo donatore, tranne l'HLA-B\*15:220 (in 2 soggetti).

### Conclusioni.

La tecnica di tipizzazione HLA mediante NGS ha incrementato l'accuratezza della genotipizzazione HLA aumentando la variabilità fenotipica del reservoir di donatori del CD TV01 a vantaggio dei pazienti in lista di attesa di trapianto di CSE.

## **METODO DI VALIDAZIONE E VERIFICA DELLE FUNZIONALITA' DEL WIPE TEST PER IL CONTROLLO DELL'INQUINAMENTO DA TEMPLATI DI DNA**

Raffaella Azzarone, Daniela Pulcinelli, Olaida J. Valdez, Carla Cervelli, Carla Battistoni, Barbara Spaziani, Simona Scacchi, Daniela Fracassi, Stefano Scipione, Maria Scimitarra e Franco Papola

Centro Regionale di Immunoematologia e Tipizzazione Tissutale Ospedale S. Salvatore ASL1 Abruzzo, L'Aquila

L'estrazione del DNA e l'amplificazione con metodiche di PCR sono diventate pratiche routinarie in Laboratorio per tipizzare e studiare con grande affidabilità la compatibilità nei trapianti di CSE e la suscettibilità alle malattie autoimmuni. Per evitare di ottenere false reazioni di amplificazione ed analisi di difficile interpretazione bisogna adottare, secondo gli standard di qualità EFI/ASHI, delle misure volte a prevenire e ad individuare possibili contaminazioni di DNA o di template di geni HLA presenti sulle superfici di lavoro o sulle pipette o nei reagenti utilizzati. Per agevolare l'attività di controllo della contaminazione si è verificata la possibilità di impiegare un solo kit per rilevare simultaneamente gli ampliconi di DNA associati all'utilizzo di tutte le tecniche genomiche in uso. Descriviamo quindi la procedura attuata per validare l'utilizzo di un solo kit, sensibile agli ampliconi derivanti dalla PCR Olerup SSP, che è stato dimostrato funzionare anche per quelli derivanti dall'utilizzo di primers di amplificazione PCR con metodiche SBT, SSO Luminex e con la metodica NGS.

**MATERIALI E METODI:** si sono utilizzate 2 strip da 8 pozzetti contenenti coppie di primers liofilati per ampliconi SSP di tutti i loci HLA (Kit OLERUP-SSP HLA WIPE TEST-N. C. Care DX) con la Master MIX più Taq del kit ed il programma di amplificazione Olerup SSP. Una strip si è usata per la verifica della contaminazione ed una per il controllo dell'inibizione. In ciascuna strip si sono inseriti un controllo negativo ed uno positivo e nei restanti pozzetti si sono seminati gli ampliconi di DNA prodotti dalle reazioni PCR. Questa procedura si è ripetuta per ogni metodica utilizzata in biologia molecolare (SBT, SSO Luminex, NGS). **RISULTATI:** in tutti i casi testati, con l'elettroforesi su gel di agarosio, si è evidenziata la presenza di amplificazione nei pozzetti contenenti i campioni di template.

**CONCLUSIONI:** il kit HLA WipeTest SSP in uso è reattivo con ogni tipo di ampliconi dei geni HLA ottenuti dalla PCR di metodi diversi di tipizzazione genomica e può essere impiegato per monitorare in maniera universale in laboratorio la contaminazione delle superfici e dei reagenti. La procedura descritta rappresenta la validazione necessaria e documentata per il suo utilizzo.

## RILEVANZA DELLA STRATEGIA DI TIPIZZAZIONE IN UN CASO DI HLA LOSS

Francone M<sup>1\*</sup>., Arcati V.<sup>1</sup>, Imbesi N.<sup>1</sup>, Genovese G.<sup>1</sup>, Saladino R.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> U.O.S.D. Tipizzazione Tissutale-G.O.M. "Bianchi-Melacrino-Morelli"-Reggio Calabria

\*corresponding author

La mancata espressione degli antigeni HLA di classe I, *HLA loss*, consente alle cellule tumorali di sfuggire all'immunosorveglianza. E' frequente nei tumori solidi ma poco osservata nelle leucemie. Nel trapianto di CSE, *HLA loss* può determinare errori nella tipizzazione per ricerca di un donatore compatibile. Riportiamo il caso di un paziente affetto da LLA per il quale, ad esordio di malattia, era stato richiesto lo studio familiare. Dalla prima tipizzazione eseguita, il paziente è risultato non compatibile con le due sorelle ed omozigote per i loci di prima classe. Il DNA era estratto da sangue intero con metodica automatica e tipizzato come di routine con PCR SSO reverse. Alcuni mesi dopo, un secondo campione prelevato per attivazione ricerca donatore da registri internazionali e tipizzato con la stessa tecnica ha rivelato, in contrasto col precedente, eterozigosi sui loci di prima classe, poi confermata con la caratterizzazione HLA dei genitori e la segregazione degli aplotipi parentali. Si è deciso quindi di testare il primo campione con altre metodiche: SSP ha evidenziato combinazione allelica eterozigote sui loci di prima classe, NGS ha dato omozigosi benchè il software abbia evidenziato problemi nella genotipizzazione per bassa copertura allelica sui loci di prima classe. Un terzo campione pervenuto in un periodo successivo ha confermato in SSO eterozigosi sui loci di prima classe. Il primo campione era stato prelevato dal paziente in crisi blastica. La discrepanza dei risultati di tipizzazione e l'individuazione degli aplotipi parentali, sebbene non sia stato possibile eseguire ulteriori indagini, consente di ipotizzare la mancata espressione dell'aplotipo materno di classe I in un elevato numero di blasti circolanti. I risultati ottenuti sul primo campione con SSO e 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.

## Modelli organizzativi

## **Le attività di donazione e trapianto da non familiare durante la pandemia COVID -19: come la rete Italiana ha garantito la continuità delle cure**

Nicoletta Sacchi, Cristina Costa, Francesca Vagnozzi, Renato Marciano, Simona Pollichieni

Registro italiano donatori di midollo osseo, IBMDR - E.O. Ospedali Galliera, Genova

### **Introduzione**

La pandemia COVID ha causato uno stress senza precedenti sui sistemi sanitari mettendo a rischio la capacità di fornire per molte patologie i trattamenti adeguati. Sono qui descritti gli effetti della pandemia sul programma di donazione e trapianto di CSE da non familiare in Italia e come la rete IBMDR ha affrontato le sfide inattese, sapendo anche cogliere nuove opportunità.

### **I trasporti delle CSE**

L'IBMDR ogni anno importa ed esporta circa 900 prodotti da trapiantare. L'evoluzione della pandemia COVID in tutto il mondo ha avuto un immediato drammatico impatto sul trasporto delle CSE, apparso subito come la sfida più difficile da affrontare. In risposta a tali criticità l'IBMDR ha attivato procedure non convenzionali e spesso creative: il trasporto a staffetta, l'uso di vettori dedicati al trasporto organi, voli cargo e il „cockpit cargo“, (trasporto delle CSE nella cabina di pilotaggio). Grazie a questi correttivi e alla disponibilità dei corrieri, tutti i trasporti programmati sono andati a buon fine, consentendo di eseguire ininterrottamente donazioni e trapianti.

### **Il donatore**

Sospesi gli eventi di reclutamento *outdoor*, per garantire comunque la possibilità di iscrizione è stato predisposto un percorso COVID-free presso i CD ed è stato ideato e reso operativo *Match at home* il reclutamento da casa con auto prelievo salivare. Il trattamento del donatore selezionato per la donazione, ha richiesto numerose modifiche allo standard con l'introduzione della pre-valutazione anamnestica (HAC) da remoto. La rete IBMDR ha inoltre vicendevolmente supportato CD e laboratori HLA qualora questi, allocati in zona rossa, non fossero in grado di garantire l'operatività. Anche i centri prelievo di midollo osseo riconvertiti a centri di terapia intensiva COVID sono stati vicariati trasferendo il candidato donatore. Tale sinergia ha funzionato non solo in ambito IBMDR ma ha compenetrato procedure e supporto anche del trapianto da familiare.

### **La crioconservazione**

Per ovviare alle possibili drammatiche conseguenze in caso di ineleggibilità del donatore o criticità nel trasporto, è stato indicato di non iniziare il condizionamento del ricevente se non a prodotto consegnato al CT. Tali indicazioni hanno determinato, nel 2020, la crioconservazione di oltre 500 donazioni (65% del totale). Purtroppo, ad oggi, 12 di questi prodotti non sono stati utilizzati per deterioramento delle condizioni del ricevente o delle CSE stesse.

### **Risultati e prospettive future**

Malgrado le descritte criticità, le azioni correttive adottate hanno permesso di garantire la continuità delle cure: inaspettatamente nel 2020 sono state eseguite 288 donazioni da donatore IBMDR e 875 trapianti da non familiare, numeri mai registrati prima. Fra le nuove procedure adottate, alcune, come la crioconservazione, hanno evidenziato anche aspetti negativi (l'inutilizzo del prodotto). Per tale ragione, non appena le condizioni lo hanno reso possibile, si è deciso di tornare allo standard pre-crisi e di utilizzare prodotti "a fresco", salvo casi eccezionali. Altre nuove procedure hanno, al contrario, dimostrato un effetto migliorativo del processo, come l'HAC, il reclutamento *Match at home* e l'indicazione del donatore di back up, tanto da suggerire la loro adozione nello standard abituale.

Altro

**L'analisi del locus KIR3DL1/S1 rivela, nella popolazione italiana, la presenza dell'allele null KIR3DS1\*049N.**

Michela Falco\*, Raffaella Meazza°, Franco Locatelli#, Lorenzo Moretta# , Cristina Bottino\*& e Daniela Pende°

\*IRCCS Istituto G. Gaslini, Genova, °IRCCS Ospedale San Martino, Genova, # IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, &Università degli Studi di Genova

In questo studio abbiamo analizzato il locus KIR3DL1/S1, l'unico tra i geni KIR a includere alleli codificanti sia per recettori inibitori (3DL1) che attivatori (3DS1), in 341 individui, sani, non consanguinei e di origine italiana. L'analisi, eseguita mediante SSP-PCR, ha rivelato la presenza di KIR3DL1/S1 in tutti gli individui della coorte. Stratificando gli individui per la presenza/assenza (P/A) degli alleli 3DL1 e 3DS1, abbiamo dimostrato che ~59% dei donatori era caratterizzato solo da alleli 3DL1, ~37% era 3DL1pos/3DS1pos, mentre ~4% era 3DL1neg/3DS1pos. Per valutare la frequenza degli individui che avevano almeno un allele 3DL1 codificante per un recettore di superficie (cioè caratterizzato da TCG al codone 86), abbiamo combinato l'analisi molecolare (sequenza diretta di una reazione di PCR 3DL1 specifica) con l'approccio fenotipico (citometria a flusso delle cellule NK derivate dal sangue periferico utilizzando gli anticorpi monoclonali Z27 e DX9). I dati ottenuti hanno rivelato che ~15% dei donatori mancava di alleli 3DL1 codificanti per recettori funzionali. Abbiamo inoltre analizzato la presenza dell'allele 3DS1\*049N, l'unico allele 3DS1 noto che codifica un polipeptide non espresso sulla superficie cellulare. Utilizzando un approccio di SSP-PCR abbiamo identificato 5 individui 3DS1\*049Npos e l'assenza di molecole 3DS1 di superficie è stata confermata mediante citometria a flusso. Infine, dal momento che i soggetti analizzati erano genitori di pazienti anch'essi tipizzati per i geni KIR, abbiamo potuto studiare la segregazione degli aplotipi all'interno dei trio. L'analisi, informativa in 4 famiglie su 5, ha permesso la caratterizzazione dell'aplotipo KIR3DS1\*049Npos che, in tutti i donatori, comprendeva una regione Cen-A e una regione Tel-B1. Lo studio dimostra l'importanza di integrare i dati relativi alla P/A dei geni KIR con informazioni a livello allelico.