



## *Istituto Superiore di Sanità*

# *Centro Nazionale Trapianti*

**OGGETTO: “Linee guida per la valutazione dell’istocompatibilità nel trapianto di organo”**

### **IL CENTRO NAZIONALE TRAPIANTI**

**Vista** la legge 1 aprile 1999, n. 91, recante: «*Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti*», che, all’articolo 8, istituisce il Centro Nazionale Trapianti (CNT) presso l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) e ne definisce le funzioni;

**Viste**, in particolare, le funzioni assegnate al CNT dal citato articolo 8, comma 6, lettere c), d), e) e m- bis);

**Visto** il Decreto del Ministro della Salute del 23 novembre 2012, che definisce la composizione del CNT;

**Visto** il Decreto del Ministro della Salute del 19 novembre 2015, recante: «*Attuazione della direttiva 2010/53/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 7 luglio 2010, relativa alle norme di qualità e sicurezza degli organi umani destinati ai trapianti, ai sensi dell’articolo 1, comma 340, legge 24 dicembre 2012, n. 228, nonché attuazione della direttiva di esecuzione 2012/25/UE della Commissione del 9 ottobre 2012, che stabilisce le procedure informative per lo scambio tra Stati membri di organi umani destinati ai trapianti*»;

**Viste**, in particolare, le funzioni attribuite al CNT dall’articolo 4, comma 6, lettere a) del suddetto DM;

**Visto** l’articolo 9 della Legge 1 aprile 1999, n. 91, che istituisce la Consulta Tecnica Permanente per i Trapianti (Consulta), con il compito di predisporre gli indirizzi tecnico-operativi per lo svolgimento delle attività di prelievo e di trapianto di organi e di tessuti e di svolgere funzioni consultive a favore del CNT;

**Visto** il Decreto del Ministro della Salute del 18 gennaio 2016, che definisce la composizione della Consulta, riconoscendole, all’articolo 3, comma 1, la facoltà di costituire nel proprio ambito sottocommissioni o gruppi di lavoro

**Ravvisata** la necessità di fornire indicazioni di carattere metodologico finalizzate alla valutazione dell’istocompatibilità del trapianto d’organo allo scopo di incrementare il livello di qualità e sicurezza del processo donazione e trapianto;

**Sentite** sul tema l’Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) e la Società Italiana Trapianti Di Organi (SITO) in due incontri tenutisi presso il Centro Nazionale Trapianti in data 20 gennaio 2016 e in data 13 aprile 2016 insieme ai direttori dei laboratori di immunogenetica italiani coinvolti nel processo di donazione e trapianto;

**Acquisiti**, nella seduta del 20 luglio 2016, il parere favorevole della Consulta tecnica permanente per i trapianti e l’approvazione nel merito del Centro Nazionale Trapianti del documento presentato da AIBT a seguito del lavoro congiunto con SITO e CNT;

**Tenuto conto** della Delibera del Centro Nazionale Trapianti del 20 luglio 2016 con la quale, oltre all’approvazione del documento, si dava atto della necessità di inoltrare il documento alla Direzione generale della prevenzione sanitaria del Ministero della salute ai fini della successiva trasmissione alla Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano;

**Preso** atto delle indicazioni della Direzione generale della prevenzione sanitaria del Ministero della salute, che, sentita nel merito della procedura di trasmissione alla Conferenza, ha ritenuto che il documento, contenendo indicazioni di carattere tecnico e metodologico, possa essere assunto dal Centro Nazionale Trapianti, rientrando nell’ambito delle sue competenze;

**Acquisite** le indicazioni della Consulta nella seduta del 12 ottobre 2016;

**Ritenuto**, pertanto, necessario procedere all'emanazione del documento in oggetto;

DELIBERA

- l'emanazione del documento concernente **“Linee guida per la valutazione dell'istocompatibilità nel trapianto di organo”** come documento del Centro Nazionale Trapianti allegato alla presente delibera quale parte integrante e sostanziale, disponendone la pubblicazione sul sito web istituzionale del CNT, <http://www.trapianti.salute.gov.it/>, e sul sito <http://trapianti.net/>
- di fissare la decorrenza del suddetto documento a far data dal 14 dicembre 2016.



## **Linee Guida approvate dal Centro Nazionale Trapianti per la valutazione dell'istocompatibilità nel trapianto d'organo**

---

*I contenuti di questo documento sono stati formalmente approvati dal Centro Nazionale Trapianti e vengono pertanto adottati dalla Rete Nazionale Trapianti.*

Cari colleghi,

questo documento contiene le “*Linee Guida per la valutazione di istocompatibilità nel trapianto d’organo*” approvate in data 20 luglio 2016 dal CNT e della Consulta Nazionale Trapianti.

Partendo da un primo documento AIBT, elaborato con la collaborazione di un esperto SITO, il CNT ha convocato per 2 giornate di lavoro tutti i Laboratori della rete nazionale dei trapianti d’organo. Successivamente AIBT ha approvato in via definitiva il testo prodotto che viene di seguito riportato.

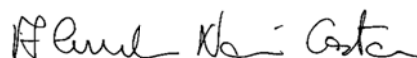
Questo documento rappresenta a seguito dell’approvazione degli organismi istituzionali della rete (CNT e Consulta) una indicazione metodologica ufficiale che sarà adottata a livello Nazionale.

Ringrazio in particolare la dott.ssa Antonina Piazza e il dott. Emanuele Cozzi per l’impegno e la qualità del lavoro svolto.

Un cordiale saluto

Dr. Alessandro Nanni Costa

Direttore del Centro Nazionale Trapianti





Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

## Linee-Guida AIBT per la Valutazione dell'Istocompatibilità nel Trapianto d'Organo

In sinergia con la Società Italiana Trapianti d'Organo (SITO)

(Versione 06/07/2016)

### **Premessa**

Le linee-guida AIBT, in collaborazione con la SITO, sono espressione di una volontà delle due società italiane maggiormente coinvolte nel settore dei trapianti di collaborare al fine di aumentare il livello di "cura" fornita al malato in attesa di un trapianto o trapiantato d'organo. In particolare, hanno l'obiettivo di fornire indicazioni/raccomandazioni metodologiche ai laboratori italiani che operano nel campo della istocompatibilità e dell'immunologia dei trapianti, illustrando le migliori e più attuali pratiche da adottare per lo studio sia dei donatori d'organo, sia dei riceventi di trapianto d'organo solido (sia esso *rene, pancreas, cuore, polmone o fegato*) che dei pazienti trapiantati. Queste indicazioni scaturiscono dalla revisione critica delle più recenti evidenze scientifiche presenti in letteratura.

Il fine ultimo di queste linee-guida è quello di permettere una standardizzazione, a livello nazionale, delle "procedure metodologiche" da attuare nei laboratori di istocompatibilità della rete trapiantologica italiana.

Queste linee-guida sono dirette all'attenzione dei laboratori di immunogenetica ma anche dei clinici del trapianto (siano essi nefrologi, chirurghi dei trapianti o immunologi clinici). Dovrebbero, infatti, facilitare il dialogo e la collaborazione tra tutti gli operatori del settore e permettere il trasferimento di informazioni, comprensibili a tutti gli addetti, sulla compatibilità HLA donatore-ricevente e sullo stato di sensibilizzazione del paziente sia pre- che post-trapianto. In ultima analisi, le linee-guida AIBT dovrebbero costituire uno strumento determinante al fine di una corretta valutazione del "rischio immunologico" di un potenziale trapianto e della rilevanza clinica degli anticorpi anti-HLA donatore-specifici preesistenti o prodotti *de novo* dopo il trapianto.

### **1. Trapianto di Rene (da donatore cadavere o vivente)**

#### **1.1 Tipizzazione HLA da eseguire ai fini della valutazione della compatibilità HLA donatore/ricevente.**

La tipizzazione HLA fornisce informazioni fondamentali per una corretta valutazione dei "mismatches" (MMs), cioè delle diversità di molecole HLA tra donatore e ricevente, il cui riconoscimento, da parte del sistema immune del ricevente, può esitare in un rigetto dell'organo trapiantato. I dati della letteratura mostrano chiaramente come la sopravvivenza dell'organo trapiantato sia correlata al grado di compatibilità HLA donatore/ricevente. Il trapianto ideale infatti è quello effettuato tra soggetti HLA identici che rappresenta, soprattutto nel trapianto da donatore cadavere, una situazione particolarmente infrequente.

Per la definizione della tipizzazione HLA sia del donatore che del ricevente si ritiene oggi indispensabile:

## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

- Utilizzare tecniche genomiche a bassa risoluzione, al fine di evitare una non corretta assegnazione degli antigeni HLA.
- Eseguire di “routine”, sia nei donatori che nei riceventi, la tipizzazione dei loci HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1. La tipizzazione dovrebbe, inoltre, essere informativa di tutte le specificità HLA sierologicamente definite.
- Nel ricevente sensibilizzato si deve estendere la tipizzazione ad altri loci HLA (C, DQA, DPA, DPB, DRB3/4/5) in relazione agli anticorpi evidenziati. Per pazienti sensibilizzati che presentano anticorpi allele-specifici è consigliata la tipizzazione molecolare ad alta risoluzione delle molecole HLA di pertinenza.
- Le tecniche attualmente in uso per la caratterizzazione dello stato di pre-sensibilizzazione HLA permettono di individuare la presenza di anticorpi specifici per le molecole di tutti i loci HLA. Pertanto, al fine di ottimizzare l’allocazione dell’organo in pazienti con stato di pre-sensibilizzazione HLA, la tipizzazione del donatore, soprattutto per donatori utilizzabili in programmi nazionali, dovrà essere estesa, entro il 2016, al locus C e successivamente (tempi attuativi da definire) anche agli altri loci HLA attualmente non tipizzati di routine (DRB3/4/5, DQA, DPA, DPB). Nelle more di arrivare ad una tipizzazione estesa a tutti i loci HLA di classe I e II, la tipizzazione dei loci aggiuntivi, quando pertinente, deve essere eseguita prospetticamente o nelle 72 ore successive al trapianto, con conseguente comunicazione al centro trapianti della presenza di eventuali DSA.

Le raccomandazioni su esposte sono da considerare sia nel trapianto da donatore cadavere che ancor più nel trapianto da donatore vivente.

### 1.2 Studio dello stato di pre-sensibilizzazione HLA

I pazienti in attesa di un trapianto d’organo possono presentare anticorpi circolanti diretti contro molecole HLA dovuti a precedenti immunizzazioni quali trasfusioni, gravidanze/aborti e pregressi trapianti (di organi e/o tessuti). I soggetti “pre-sensibilizzati” costituiscono, attualmente, più del 30% dei pazienti in lista d’attesa per trapianto di rene.

Il livello di sensibilizzazione di un malato nei confronti delle molecole HLA viene stimato con il PRA (**P**anel **R**eactive **A**ntibody) che definisce, da un punto di vista clinico, quale è la percentuale dei potenziali donatori riconosciuta dagli anticorpi anti-HLA presenti nel paziente.

Il trapianto in un paziente con anticorpi anti-HLA donatori-specifici (DSA) “citotossici”, cioè fissanti il complemento, evidenziati con tecniche di linfocitotossicità complemento-mediata (CDC), è inevitabilmente associato ad una perdita precoce dell’organo trapiantato.

Per contro, rispetto ai risultati del trapianto ed all’insorgenza di rigetto, il ruolo di anticorpi anti-HLA DSA, evidenziati con le moderne tecniche in fase solida e sotto una determinata soglia di “forza”, cioè d’intensità di fluorescenza, non è chiaramente documentato.

Pertanto il laboratorio di Istocompatibilità dei trapianti d’organo dovrà eseguire un’accurata valutazione e caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA preesistenti, fondamentale per una corretta assegnazione dell’organo, permettendo, quindi, il trapianto di rene in condizioni di “rischio immunologico” commisurato al beneficio che il paziente può trarre dal trapianto stesso.



## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

Attualmente, le tecniche utilizzate dai laboratori di Istocompatibilità italiani, per la valutazione dello stato di pre-sensibilizzazione di un paziente in lista d'attesa per trapianto, sono rappresentate dalla tecnica di citotossicità complemento-mediata (CDC) e dalle tecniche in fase solida (SPI), cioè le beads citofluorimetriche e le Luminex beads. In particolare:

A) Tecnica CDC. Di solito eseguita utilizzando un pannello di linfociti T a tipizzazione nota; pochi laboratori utilizzano anche i linfociti B, che tuttavia permettono di identificare non solo anticorpi diretti contro molecole di classe I ma anche anticorpi specifici per molecole di classe II. Sono note diverse varianti della metodica originale che ne aumentano la sensibilità; quella più utilizzata nei laboratori italiani è la tecnica "long incubation". Le considerazioni che debbono essere fatte su questa tecnica, che presenta parecchie limitazioni intrinseche rendendone l'utilizzo sempre più contenuto o comunque affiancato da metodologie in fase solida, sono le seguenti:

- *Vantaggi*:

- 1) Permette lo screening (% PRA) / caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA classe I (sia IgG che IgM).
- 2) **La positività di questo test, per DSA-preformati di classe IgG contro un potenziale donatore, rappresenta una controindicazione assoluta al trapianto**, in quanto dà luogo, nel test di crossmatch pre-trapianto, ad un risultato positivo e quindi, in una percentuale molto elevata di casi, è associata a rigetto iperacuto del trapianto.

- *Svantaggi*:

- 1) Scarsa sensibilità: in grado di identificare solamente gli anticorpi che, per isotipo o "titolo", siano in grado di fissare il complemento.
- 2) Il % PRA generato è interamente dipendente dalla composizione e numerosità del pannello cellulare utilizzato, rendendo molto diversi i risultati ottenuti da laboratori indipendenti.
- 3) Scarsa specificità: la tecnica CDC può risultare positiva per la presenza di anticorpi non-HLA (reazione con altri antigeni presenti sui linfociti), o per una citotossicità aspecifica del siero, soprattutto a carico dei linfociti B. In alcuni casi la positività del test è dovuta alla presenza di anticorpi anti-HLA di tipo IgM, sulla cui rilevanza clinica esistono dati discordanti in letteratura.
- 4) Questo test, che utilizza come bersaglio un numero limitato di cellule tipizzate (di solito 30-50) non permette l'identificazione di tutte le specificità anticorpali presenti nei pazienti iperimmuni (situazioni di overlap).

Per le limitazioni intrinseche sopradescritte, questa tecnica, ancora oggi utilizzata in diversi laboratori di Istocompatibilità per lo screening/caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA, non è attualmente considerata una metodologia sufficiente ad identificare il reale stato di pre-sensibilizzazione del candidato al trapianto di rene e deve essere sempre affiancata da tecniche in fase solida.

B) Tecniche in fase solida (SPI). In queste metodiche il siero in studio viene incubato con biglie ricoperte di molecole HLA purificate o ricombinanti rappresentative di tutte le specificità HLA antigeniche note nonché, in alcuni casi, di una o più specificità alleliche di una specifica molecola HLA. Dopo incubazione con un anticorpo fluorescinato anti-human-IgG (o IgM), le biglie vengono analizzate con un citofluorimetro classico (FlowPRA screening/FlowPRA Single Antigen beads) o con



## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

un citofluorimetro dedicato (Luminex Screening e Single Antigen beads) permettendo l'identificazione di tutti gli anticorpi anti-HLA presenti nel siero in studio.

La tecnologia Luminex è quella attualmente più utilizzata nei laboratori di istocompatibilità italiani. Le principali considerazioni su questa tecnica sono le seguenti:

- **Vantaggi:**
  - 1) Permette lo screening (%PRA)/caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA di classe I e di classe II.
  - 2) Elevata sensibilità (> di 10 volte rispetto alla CDC)
  - 3) Elevata specificità: identifica anticorpi anti-HLA specifici per alleli comuni/non comuni di 11 loci HLA (A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA, DQB, DPA, DPB).
  - 4) Può fornire informazioni sull'isotipo (IgG/IgM) dell'anticorpo presente nel siero in studio.
  - 5) Permette di valutare un "cPRA", su un numero qualsivoglia elevato di cellule tipizzate per tutti i loci HLA, cioè permette di valutare la percentuale di donatori contro i quali sono presenti specifici anticorpi anti-HLA. Si suggerisce che per la valutazione del cPRA possono essere utilizzate, al minimo, 100 cellule tipizzate, per tutti i loci HLA, provenienti dai controlli di qualità annuali dell'ISS/CNT.
  - 6) Permette una valutazione semi-quantitativa dell'anticorpo evidenziato (**Mean Fluorescence Intensity**). Valori di MFI>1000 solitamente rappresentano il cutoff di positività del test. La valutazione del valore di MFI dell'anticorpo permette di dare una misura delle "forza" dell'anticorpo stesso e conseguentemente permette di definire il "rischio immunologico" di un trapianto.
  - 7) Attraverso la definizione di valori "accettabili" di MFI degli anticorpi evidenziati, permette di definire gli "antigeni proibiti" di un donatore, cioè di eseguire un "virtual crossmatch" sui potenziali candidati al trapianto.
  - 8) Permette inoltre di distinguere in maniera selettiva gli anticorpi dotati della capacità di fissare il complemento (Luminex-C1q/C3d).
- **Svantaggi:**
  - 1) Occasionalmente la presenza di un elevato background (solitamente legato alla presenza nel siero di fattori aspecifici che reagiscono con il materiale costitutivo delle beads), può mascherare una reazione positiva, richiedendo la ripetizione del test dopo assorbimento mediante biglie specifiche.
  - 2) Fattori bloccanti possono determinare risultati falsi negativi per alcune beads. I fattori bloccanti più noti sono:
    - anticorpi anti-HLA di isotipo IgM, la cui presenza può essere sospettata in presenza di bassi valori di MFI del controllo positivo del test. In tali casi è opportuno eseguire il test per anticorpi anti-HLA IgM (gli anti-HLA IgG sono evidenziati dalla metodica standard).
    - presenza di complemento nel siero in studio che, per problemi di "ingombro", impedisce l'attacco dell'anti-human IgG/IgM all'anticorpo legato all'antigene presente sulle beads. L'aggiunta di EDTA al siero in studio permette di distaccare le sub-unità del C1q, responsabili del fenomeno, e quindi di eseguire una corretta analisi del campione. E' da sottolineare che il complemento è termolabile, pertanto non determinerà problematiche nei sieri sottoposti a ripetuti congelamenti/scongeliamenti.



- 3) E' stato, inoltre, dimostrato che la densità di espressione delle molecole HLA può variare da biglia a biglia e anche da lotto a lotto, richiedendo una validazione del kit (mediante saggio di un campione noto).
- 4) E' importante sottolineare che la differente concentrazione di antigeni sulle biglie rispetto alle cellule può determinare una errata stima del "quantitativo" di anticorpi presenti e, quindi, della rilevanza clinica degli anticorpi evidenziati.
- 5) È anche possibile che alcune positività rilevate siano dovute ad anticorpi che reagiscono con molecole HLA denaturate, cioè modificate nella loro struttura tridimensionale con conseguente esposizione di porzioni antigeniche (epitopi) di solito non esposti e quindi non "raggiungibili" da parte di anticorpi specifici. Pertanto tali anticorpi sono considerati meno pericolosi per il trapianto, anche se in letteratura non c'è concordanza di opinioni.
- 6) E' richiesto "expertise" per una corretta analisi/refertazione di alcuni risultati quali, ad esempio, quelli a carico degli eterodimeri DQA/DQB, DPA/DPB e anticorpi intra-allelici di molecole HLA proprie del paziente.

### **Raccomandazioni:**

Per i vantaggi sopradescritti, gli SPI rappresentano indiscutibilmente il *gold standard* nello studio della sensibilizzazione anti-HLA nel trapianto.

La ricerca di anticorpi in linfocitotossicità identifica anticorpi sicuramente citotossici ed altamente pericolosi, mima una situazione "in vivo" e rappresenta un test coerente con il cross-match pre-trapianto in CDC.

I test di screening anticorpale anti-HLA e di identificazione della specificità degli anticorpi eventualmente presenti vengono, di norma, eseguiti secondo le seguenti cadenze:

- Screening degli anticorpi anti-HLA (PRA):
  - al momento dell'iscrizione in lista d'attesa;
  - successivamente ogni tre mesi;
  - a 20 giorni/un mese di distanza da eventi sensibilizzanti.
- Identificazione delle specificità HLA degli anticorpi evidenziati al PRA:
  - Al momento dell'iscrizione in lista d'attesa ed ad ogni evidenza di variazione "sostanziale" del %PRA anti-HLA e comunque almeno una volta all'anno nei pazienti con valori stazionari del % PRA.
  - E' consigliabile una frequenza maggiore in pazienti in lista per ritrapianto con primo trapianto ancora in sede, a causa del possibile mascheramento della produzione di anticorpi donatore specifici dovuta al legame di tali anticorpi alle molecole target espresse sull'organo trapiantato.
  - In caso di valutazione di pazienti sottoposti a protocolli di desensibilizzazione deve essere eseguito studio degli anticorpi con metodiche SPI prima dell'inizio del protocollo e ad intervalli precisi, individuati insieme al clinico, durante e dopo il trattamento in modo di individuare il prima possibile l'eventuale modificazione dell'assetto anticorpale.

*Nel caso di pazienti PRA-Luminex-IgG negativo ma PRA-CDC positivo, si raccomanda di analizzare il siero con tecnica Luminex per IgM, o altra tecnica al fine di identificare la presenza di anticorpi anti-HLA di isotipo IgM responsabili della positività al test in CDC. La letteratura non è concorde nel definire il livello di rischio immunologico associato alla presenza di anticorpi anti-HLA DSA di tipo IgM, quindi in genere la presenza di questi*



## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

*anticorpi non è considerata una controindicazione assoluta al trapianto, anche se è consigliabile un attento monitoraggio immunologico post-trapianto.*

**Definizione della soglia di positività nel test SPI (screening ed identificativo)** ai fini di una standardizzazione, a livello nazionale, delle procedure utilizzate nei Laboratori di istocompatibilità che operano nel campo dei trapianti d'organo.

- Per la definizione della percentuale di PRA, ai fini dei programmi nazionali, deve essere utilizzato il cPRA ottenibile dalle tecniche in fase solida (Luminex). Tale metodologia è fortemente raccomandata anche per i registri regionali;

- Per la definizione degli antigeni proibiti da riportare nei programmi nazionali, il cutoff di positività è stato stabilito superiore ai 3000 MFI. E' da considerare che attualmente diversi laboratori, secondo protocolli concordati con i clinici, utilizzano già cutoff di positività maggiori (4000/5000 MFI) ai fini della definizione degli antigeni proibiti nei loro programmi regionali.

- Lo stesso cutoff di positività dovrà essere utilizzato per calcolare il cPRA ai fini di inclusione dei pazienti nei programmi nazionali.

*In conclusione, attualmente, grazie allo sviluppo di nuove tecniche molto sensibili per la caratterizzazione della risposta anticorpale anti-HLA, è cambiato il modo di percepire e stimare il "rischio immunologico" del trapianto in soggetto con anticorpi anti-HLA preformati, cioè presenti prima del trapianto. Questo cambiamento nella valutazione del rischio è soprattutto legato alla presa di coscienza che, mentre il grado di sensibilizzazione del paziente, stimato con il **PRA**, ci darà un'idea sulla durata del tempo di **attesa per il trapianto**, sarà invece la presenza/assenza nonché la **valutazione "quantitativa"**, nel ricevente, di **DSA anti-HLA diretti contro le molecole del potenziale donatore a incidere sull'esito del trapianto.***

### 1.3 Crossmatch

Il crossmatch consiste nella prova crociata donatore/ricevente eseguita prospetticamente prima dell'esecuzione di un trapianto e permette di *valutare in maniera diretta* la reattività del siero di un paziente nei confronti delle cellule (linfociti T e B) di un potenziale donatore, solitamente dovuta alla presenza di DSA anti-HLA. Nei pazienti sensibilizzati vengono classicamente utilizzati almeno due sieri, il più recente, di solito ottenuto negli ultimi tre mesi, e quello "storico" con il più elevato valore di PRA.

E' tuttavia importante sottolineare che, in alcuni casi, questo test, può dar luogo a risultati falsamente positivi dovuti alla presenza, nel siero del candidato al trapianto, di anticorpi non-HLA, di autoanticorpi o di anticorpi monoclonali somministrati al paziente sottoposto a trattamenti desensibilizzanti.

Le tecniche utilizzate per l'esecuzione del crossmatch sono la citotossicità complemento-mediata (CDC-XM) e la citometrica a flusso (FC-XM).

A) CDC-XM. Si esegue incubando i linfociti T e B del donatore, ottenuti da sangue periferico, linfonodi o frammenti di milza, con i sieri dei candidati al trapianto. Successivamente si aggiunge al test il complemento e, dopo una ulteriore incubazione, si aggiunge il colorante vitale (penetra solamente nelle cellule che hanno subito citotossicità complemento-mediata) che permette la lettura del risultato del test al microscopio a fluorescenza (cellule colorate in verde = crossmatch

negativo, cioè assenza di DSA citotossici; cellule colorate in rosso = crossmatch positivo, cioè presenza di DSA citotossici).

- *Vantaggi:*

- 1) Questo test ha la capacità di predire il rigetto iperacuto/accelerato anticorpo mediato, cioè la presenza nel paziente di DSA preformati ad alto titolo in grado di fissare il complemento e quindi di determinare citotossicità delle cellule del trapianto. Pertanto un CDC-XM positivo rappresenta una controindicazione assoluta al trapianto di rene.

- *Svantaggi:*

- 1) Scarsa sensibilità: risultato positivo solamente per anticorpi che, per isotipo o "titolo", siano in grado di fissare il complemento.
- 2) Scarsa specificità: può dare risultati positivi anche per anticorpi non anti-HLA.
- 3) A volte presenza di risultati "falsi positivi" per citotossicità aspecifica del siero, soprattutto a carico dei linfociti B.
- 4) Scarsa correlazione con i risultati dello studio anticorpale mediante tecniche Luminex; il CDC-XM dà un risultato positivo in presenza di DSA con MFI > 10000/15000 (a seconda che i DSA siano specifici per molecole HLA di classe I o II).

### **Raccomandazioni:**

Pur essendo un test dotato di scarsa sensibilità e specificità, il CDC-XM rappresenta una misura di sicurezza per prevenire il rigetto iperacuto e, pertanto, deve essere eseguito prima di procedere al trapianto di rene, soprattutto in paziente che presentano uno stato di presensibilizzazione HLA.

- B) FC-XM. Questo test permette di individuare la presenza di anticorpi anti-HLA, fissanti e non fissanti il complemento, diretti contro il donatore, attraverso l'utilizzo di tecniche citofluorimetriche triparametriche. In sintesi, i linfociti T e B del donatore vengono incubati con i sieri dei potenziali candidati al trapianto. Successivamente si aggiungono al test degli anticorpi monoclonali marcati con differenti fluorocromi (anti-CD3PerCP e antiCD19/CD20PE) per identificare i linfociti T e B del donatore e un'anti-immunoglobulina umana (IgG o IgM) marcata con un terzo fluorocromo (FITC) al fine di identificare gli anticorpi che si sono legati ai linfociti. L'analisi del risultato avviene mediante lettura del test al citofluorimetro.

- *Vantaggi:*

- 1) Elevata sensibilità (circa dieci volte maggiore di quella del CDC-XM).
- 2) Fornisce informazioni sull'isotipo del/dei DSA presenti nel siero in studio.
- 3) Permette di stratificare il livello di "rischio immunologico" di un trapianto in funzione del grado di positività del test (channel shift).
- 4) Buona correlazione con i risultati dello studio anticorpale mediante tecniche Luminex; l'FC-XM dà un risultato positivo in presenza di DSA con MFI > 5000/8000 (a seconda che i DSA siano specifici per molecole HLA di classe I o II).

- *Svantaggi:*

- 1) Scarsa specificità: può dare risultati positivi anche per anticorpi non anti-HLA.



## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

- 2) Richiesta una certa “expertise” per la standardizzazione della tecnica (citofluorimetro, fluorocromi, titolazione dell’anti-immunoglobulina, corretta valutazione del controllo negativo e della soglia di positività del test).

### **Raccomandazioni:**

L’FC-XM completa in maniera ottimale il percorso di valutazione del malato in attesa di trapianto con anticorpi anti-HLA rilevati con metodologia Luminex. Di conseguenza se ne prevede la disponibilità presso tutti i laboratori di istocompatibilità entro 2/3 anni.

***Nelle more della definizione, in stretta collaborazione con la Società Italiana Trapianti d’Organo (SITO), dei criteri per l’attuazione di un Programma di Trapianto di Rene solamente sulla base di un Crossmatch Virtuale, è possibile, in casi particolari e/o d’urgenza clinica, effettuare trapianti di rene da donatore cadavere in assenza di un crossmatch prospettico. Tali eccezioni sono rappresentate da pazienti, sempre negativi al PRA, che debbono ricevere, sulla base di Programmi Nazionali di allocazione d’organo, un trapianto combinato o il solo trapianto di pancreas, nei quali l’esecuzione del crossmatch comporterebbe tempi di ischemia fredda non compatibili con il trapianto dell’organo non-rene.***

***E’ comunque obbligatorio eseguire sempre il crossmatch retrospettivo.***

## **2. TRAPIANTO DI ALTRI ORGANI SOLIDI**

- 2.1 Trapianto di pancreas (o rene-pancreas).** Per il trapianto di pancreas isolato o combinato con il rene valgono le stesse considerazioni fatte per la valutazione immunogenetica nel trapianto di rene, a cui si rimanda. Infatti, oltre alla valutazione dello stato di presensibilizzazione, è prevista l’esecuzione del crossmatch prospettico al fine dell’esecuzione del trapianto.
- 2.2 Trapianto di cuore.** E’ stato evidenziato che la presenza di DSA preformati, nel ricevente un trapianto di cuore, si associa ad una elevata incidenza di rigetto e a ridotta sopravvivenza del trapianto. Pertanto nel paziente in lista d’attesa per questo tipo di trapianto si eseguono “di routine” tipizzazione HLA, valutazione dello stato di presensibilizzazione e crossmatch col potenziale donatore. Se il paziente con stato di presensibilizzazione si trova in una situazione clinica di “urgenza” e la logistica non permette l’esecuzione di un crossmatch prospettico, l’allocazione dell’organo può avvenire sulla base di un “virtual crossmatch” negativo; in questi casi, comunque il crossmatch viene eseguito in modo retrospettivo al fine di ottimizzare il trattamento immunosoppressivo in funzione del risultato del “actual crossmatch”. Inoltre, studi recenti hanno evidenziato come un trattamento desensibilizzante (plasmaferesi/immunoferesi associata a terapie immunosoppressive specifiche) possa permettere il trapianto di cuore in pazienti fortemente sensibilizzati con buoni risultati clinici.
- 2.3 Trapianto di polmone.** Anche per il trapianto di polmone sono presenti in letteratura dati a conferma dell’effetto nocivo di DSA preformati sul “graft outcome”. Per questa ragione, anche per il trapianto di polmone deve essere eseguita la ricerca ed

identificazione di anticorpi nei pazienti in lista d'attesa ed il cross-match reale prospettico, che può essere omesso, come per il trapianto di cuore, in caso di urgenza del paziente sulla base di un cross-match virtuale negativo, concordando la procedura ed il monitoraggio immunologico post-trapianto con il centro trapianti. In questi casi il cross-match reale deve essere comunque eseguito retrospettivamente.

- 2.4 Trapianto di fegato.** E' a tutt'oggi controverso se l'allosensibilizzazione del ricevente di trapianto di fegato abbia un impatto negativo sul "graft outcome" e, conseguentemente, la valutazione immunogenetica dei pazienti in lista per trapianto di fegato non è eseguita di routine in molti centri. Recentemente, tuttavia, molti studi sottolineano l'importanza del crossmatch nell'allocazione del fegato in quanto un crossmatch T-positivo, assieme alla presenza di DSA preformati, si associa ad un ridotta sopravvivenza del "graft" in pazienti al ritrapianto. E' raccomandato eseguire uno screening anticorpale pretrapianto anche in questa categoria di pazienti. Nei trapianti di fegato combinati valgono le regole del fegato, in considerazione dell'effetto di assorbimento di DSA, eventualmente presenti, nel tessuto epatico

### 3. MONITORAGGIO DELLA RISPOSTA ANTICORPALE DOPO TRAPIANTO

Molti studi hanno evidenziato che dopo il trapianto una gran parte dei malati sviluppa anticorpi anti-HLA donatori-specifici (DSA). La produzione *de novo* di DSA nel post-trapianto, è stata associata a ridotto "graft outcome".

Nel trapianto di rene l'insorgenza di rigetto anticorpo-mediato (AMR) rappresenta attualmente la maggiore causa di "graft failure", ma anche nel trapianto di altri organi, quali ad esempio il cuore, sono presenti, in letteratura, molti evidenze dell'effetto nocivo dei *de novo* DSA sulla sopravvivenza dell'organo trapiantato.

Inoltre in diversi studi è stato riportato che lo sviluppo di *de novo* DSA in grado di fissare il complemento (C1q/C3d-LSA-positivi o presenza di positività al C4d della biopsia) costituisce un fattore prognostico negativo per l'outcome del trapianto. E' stata anche riconosciuta l'esistenza (Banff Meeting 2013) di AMR anche in quadri istopatologici C4d-negativi e DSA C1q/C3d-negativi; questa tipologia di AMR è stata associata a più tardiva comparsa di graft failure.

Da quanto suddetto si evince il ruolo chiave che può svolgere il laboratorio di immunogenetica, attraverso test non invasivi, nel supportare il clinico nella "diagnosi precoce", anche pre-clinica, di AMR e nel monitoraggio dell'efficacia di trattamenti desensibilizzanti (approcci aferetici e/o farmacologici) attuati al fine di prolungare la funzione/sopravvivenza dell'organo trapiantato.

L'esecuzione del monitoraggio post-trapianto è obbligatoria, su richiesta del Centro Trapianti in base alle necessità cliniche, e deve essere eseguita nell'ambito di metodologie scientificamente riconosciute.

**Metodologie di studio dei *de novo* DSA.** Sono sostanzialmente due:

- Esecuzione, sui sieri post-trapianto di FC-XM (se si dispone dei linfociti del donatore crio-preserved in azoto liquido al momento del trapianto). Questo test è ottimale poiché rivela "in vitro" se sono stati prodotti anticorpi in grado di legarsi agli antigeni HLA "mismatched" espressi sulle cellule dell'organo trapiantato.

## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

- Identificazione/caratterizzazione dei *de novo* DSA attraverso l'utilizzo delle sensibili tecniche in fase solida (Luminex beads).

E' importante sottolineare che entrambe le tecniche presentano degli svantaggi; l'FCXM potrebbe dar luogo a risultati falsi positivi per la presenza di anticorpi non-HLA, la tecnica Luminex-beads potrebbe evidenziare anticorpi non in grado di legarsi agli antigeni HLA "mismatched" del trapianto e quindi potenzialmente "irrilevanti". Il *gold standard* è rappresentato dall'utilizzo di entrambe le metodiche in modo da superare le limitazioni delle singole tecniche.

**Strategie di studio.** Possono essere rappresentate dalle seguenti:

- monitoraggio ad intervalli prestabiliti nel post-trapianto; controlli più frequenti nel primo periodo e successivamente ogni 6/12 mesi in assenza di manifestazioni cliniche di disfunzione del trapianto.
- su richiesta del clinico in funzione della presenza di segni clinici/istopatologici di "graft dysfunction".

### **Raccomandazioni:**

Il laboratorio di Istocompatibilità deve attuare una procedura di tempistica di analisi/refertazione dei campioni inviati, concordata con i clinici, sia in rapporto all' "urgenza" dettata dal quadro clinico/istopatologico del paziente trapiantato, sia al livello di rischio immunologico del trapianto effettuato. Tutto ciò al fine di fornire, al clinico, indicazioni utili all'attuazione di un precoce trattamento immunosoppressivo specifico (farmacologico/afereitico) nonché alla valutazione dell'efficacia del trattamento stesso.

### Referenze

1. Gebel HM, Bray RA and Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation. *Am J of Transplant* 2003; 3: 1488-1500.
2. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91: 527-535
3. Eng HS, Leffell MS. Histocompatibility testing after fifty years of transplantation. *J Immunol Methods*. 2011 Jun 30;369(1-2):1-21
4. Andrews PA, Burnapp L, Manas D et al. Summary of the British Transplantation Society/Renal Association U.K. guidelines for living donor kidney transplantation. *Transplantation* 2012; 93: 666-673
5. ERBP guideline on the management and evaluation of the kidney donor and recipient. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2013) 28 (suppl 2): ii1-ii71.
6. Loupy A, et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *New Engl J Med* 2013; 369: 1215-26
7. Cecka JM, Kucheryavaya NL, Reinsmoen NL and Leffell MS. Calculated PRA: Initial Results Show Benefits for Sensitized Patients and a Reduction in Positive Crossmatches. *Am J of Transplant* 2001; 11:719-724
8. Tait BD, Süsal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):19-47
9. Fidler SJ, Irish AB, Lim W, Ferrari P, Witt CS, Christiansen FT. Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. *Transpl Immunol*. 2013 Jun;28(4):148-53
10. Guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. <http://www.bts.org.uk/Documents/Guidelines/Active/BSHI%20BTS%20Ab%20Guidelines%20Revision%20June%202014.pdf>.



## Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti

11. Gebel HM1, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant.* 2014 Sep;14(9):1964-75
12. Ashimine S, Watarai Y, Yamamoto T et al. Neither pre-transplant rituximab nor splenectomy affects de novo HLA antibody production after renal transplantation. *Kidney International* (2014) 85, 425–430
13. Mengel M1, Chong A, Rothstein DM, Zorn E, Maltzman JS. AST Cutting Edge of Transplantation 2013 Meeting Report: a comprehensive look at B cells and antibodies in transplantation. *Am J Transplantation* 2014 Mar;14(3):524-30
14. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirao I Castro-Henriques A, CabritaA. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol.* 2015; 32:66-71.