

Biologia dei trapianti emopoietici

Studio degli Ab anti-HLA e loro significato

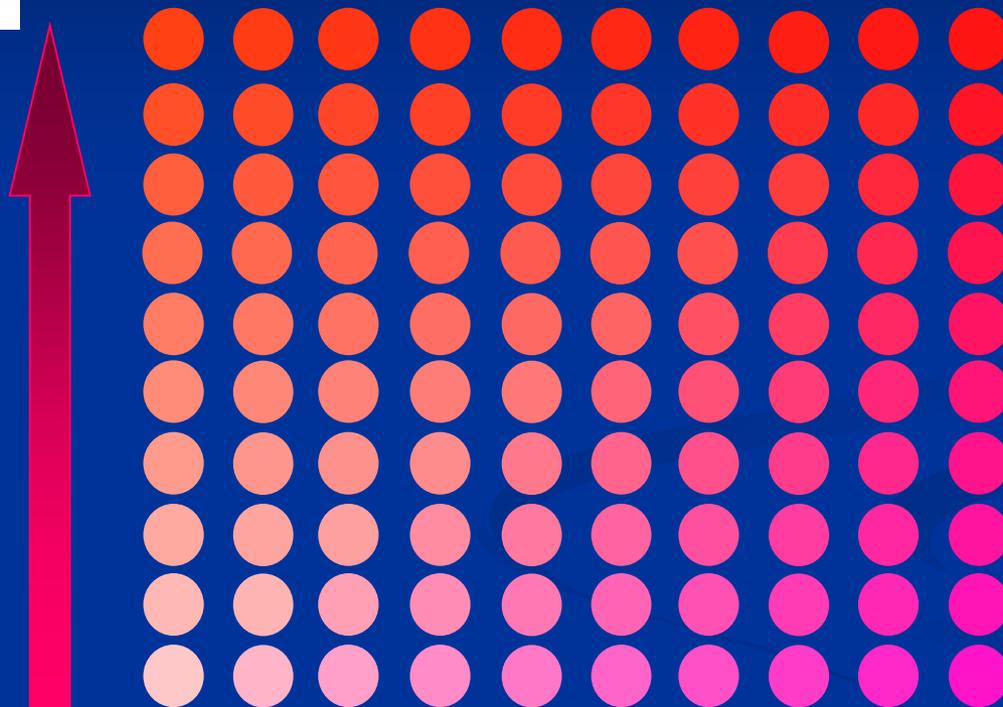
A. Bontadini

*Summer School
AIBT
Favignana, 4-6 giugno 2015*



La tecnologia Luminex ha modificato
gli studi sugli anticorpi

Fluorescenza 2



Fluorescenza 1

L'evoluzione delle tecniche

Dal 1964 nuove tecniche emergenti vengono utilizzate nel laboratorio in combinazione determinando discrepanze di risultato a causa della loro differenza in sensibilità e specificità che stanno aumentando continuamente.



	CDC positiva N.	CDC negativa N.	Totale
Luminex positivo	112	21	133
Luminex negativo	2	176	178
Totale	114	197	311

Metodologia anti-HLA con Luminex

- LabScreen mixed:
 - Negativo
 - Positivo
- LabScreen PRA:
 - Negativo
 - Positivo con specificità dell'anticorpo e % PRA
- Antigene singolo:
 - Specificità dell'anticorpo

Mixed (1 campione)



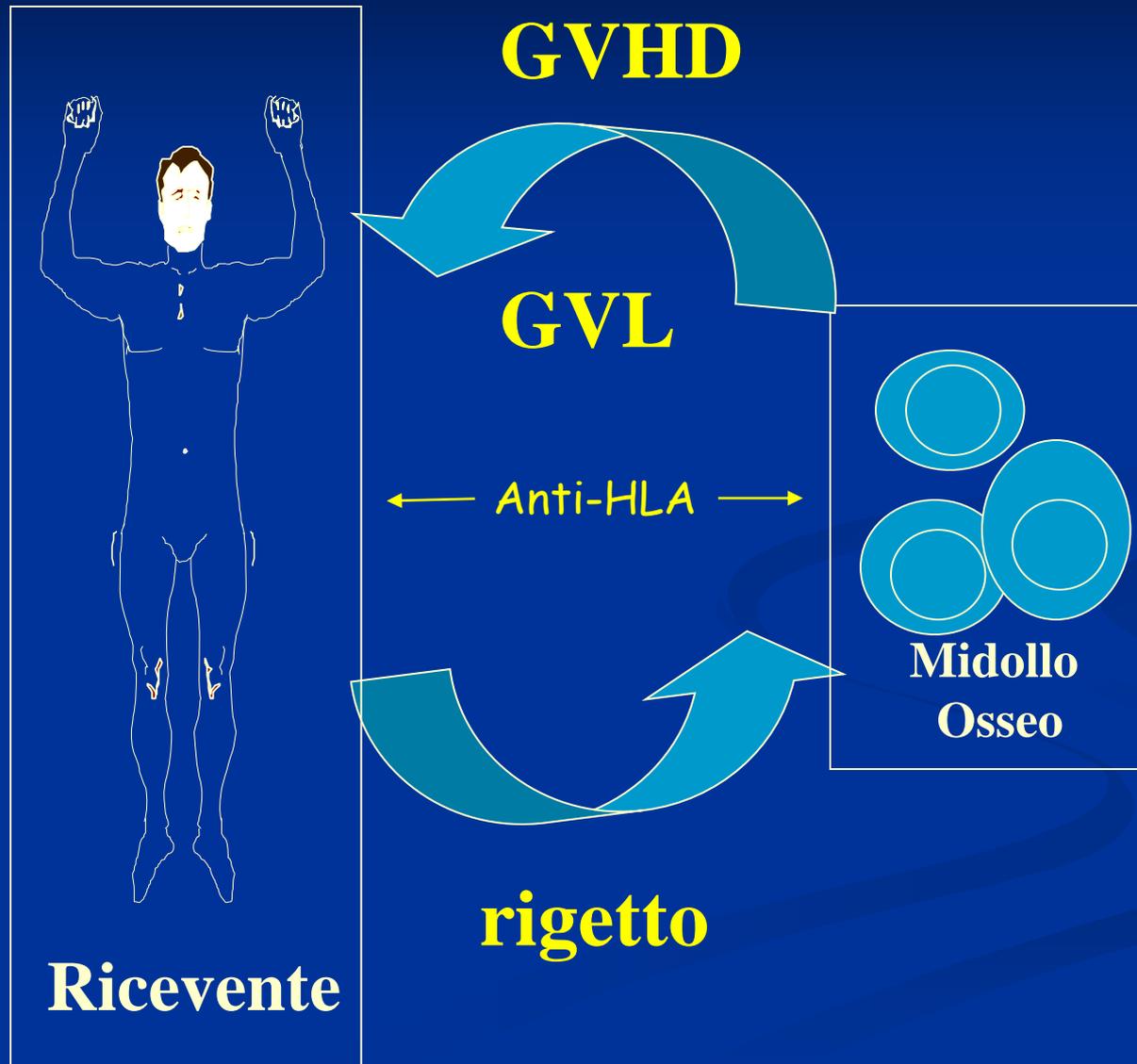
PRA (1 campione)



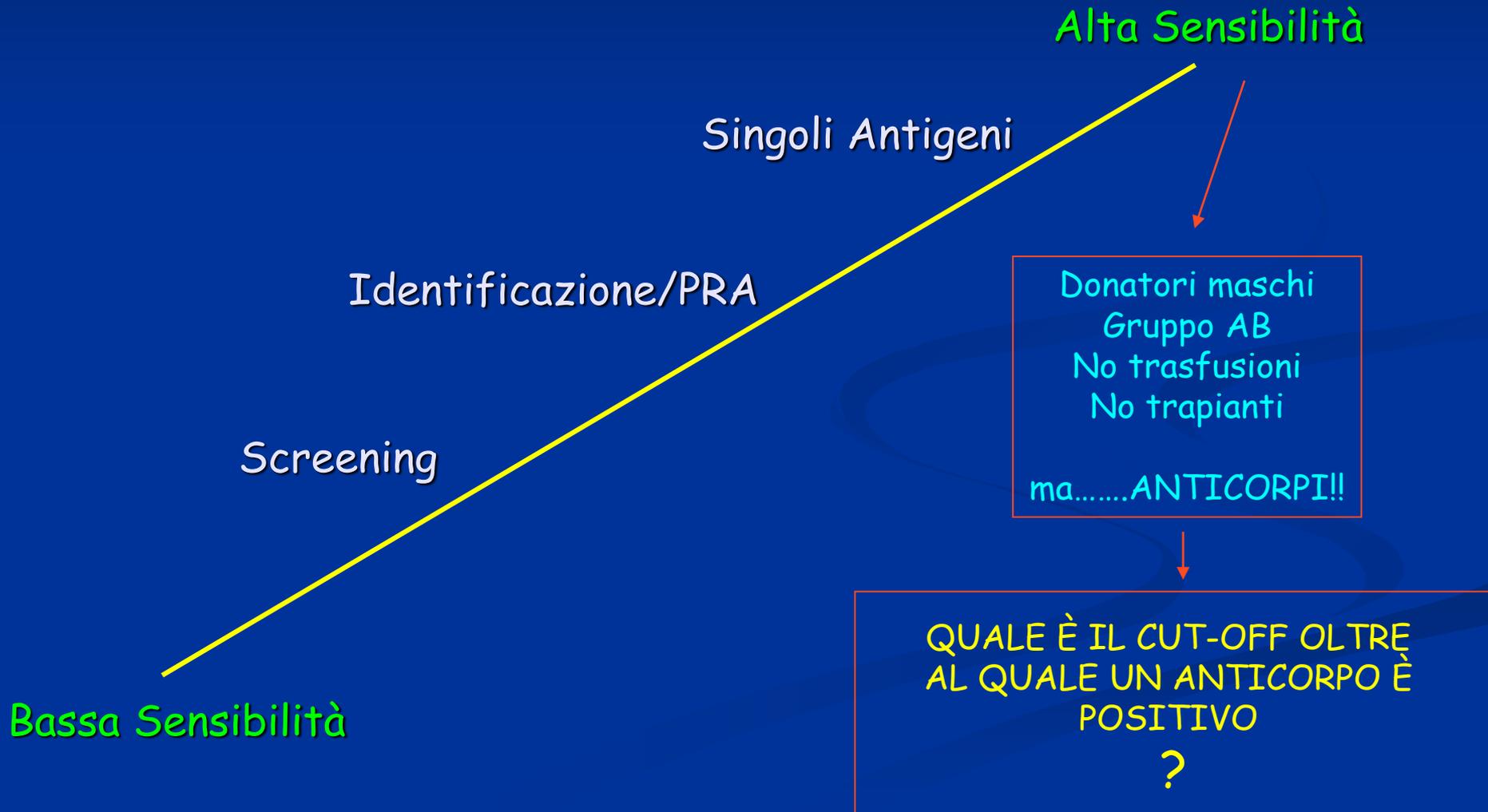
Antigene singolo (1 campione)



Il trapianto di midollo osseo: doppia barriera immunologica

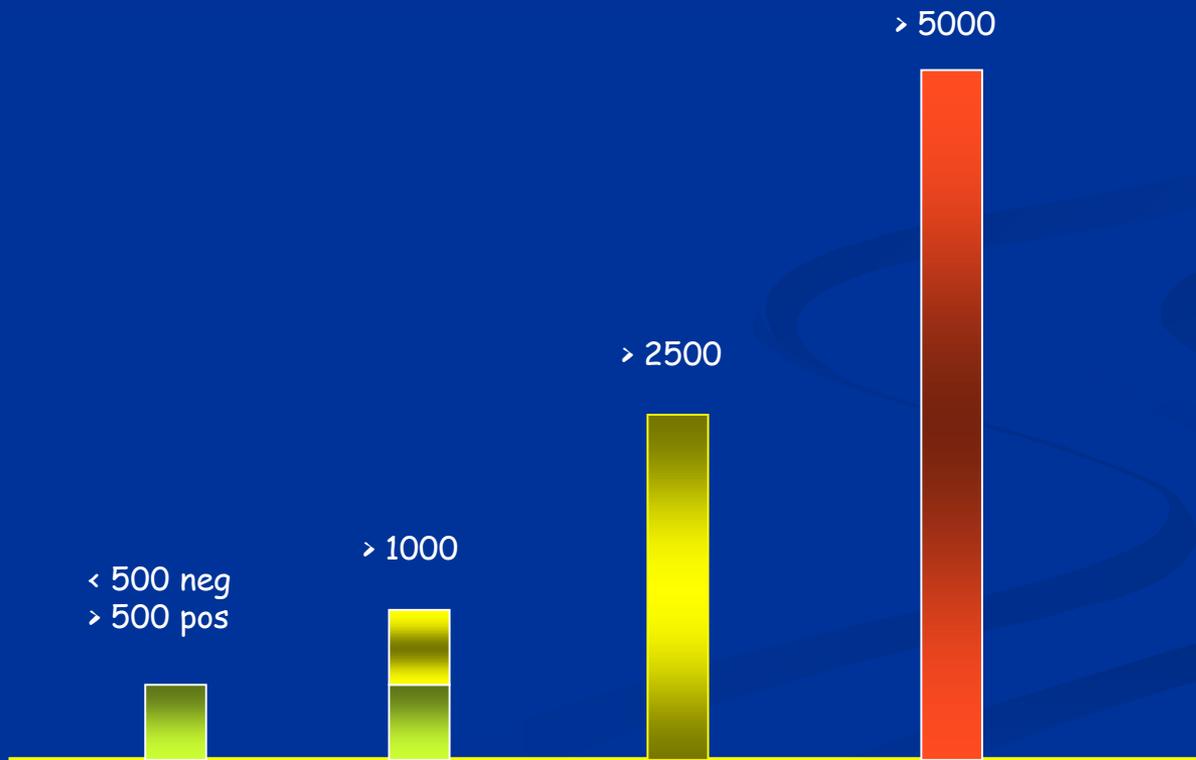


Differenti sensibilità



MFI: Mean Fluorescence Intensity

$$\text{MFI} = \frac{\text{MFI biglia} - \text{MFI medio background biglie}}{\text{MFI controllo positivo} - \text{MFI medio background biglie}} \times 100$$



Rischio immunologico in pazienti sensibilizzati

CDC - / Cellule T

CDC+ Cellule B IgG

Flow / Luminex
Ab specifici

Flow / Luminex
Ab specifici

ELISA | Ab non specifici
Luminex | o MFI basso

CDC+ Cellule T IgG

Rigetto iper-acuto

Rigetto acuto umorale

Basso rischio

Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood

Nadim El-Awar ^{a,*}, Paul I. Terasaki ^b, Anh Nguyen ^a, Nori Sasaki ^a, Luis E. Morales-Buenrostro ^c, Hiroh Saji ^d, Etsuko Maruya ^d, Francesca Poli ^e

^a One Lambda, Inc., Canoga Park, CA 90064, USA

^b Terasaki Foundation Laboratory, Los Angeles, CA 90064, USA

^c Department of Nephrology and Mineral Metabolism, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City DF 14000, Mexico

^d HLA Laboratory NPO, Kyoto 606-8396, Japan

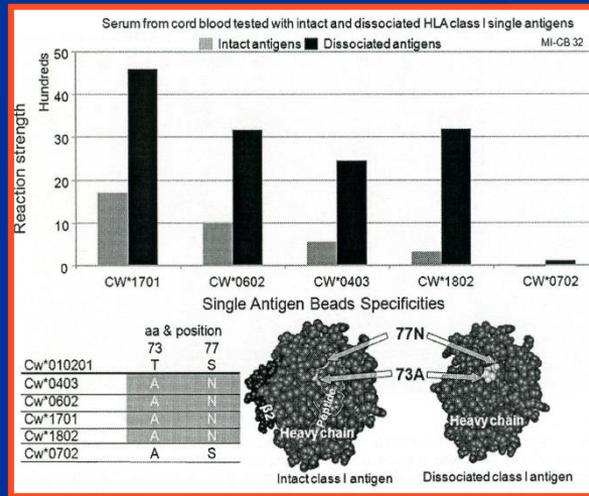
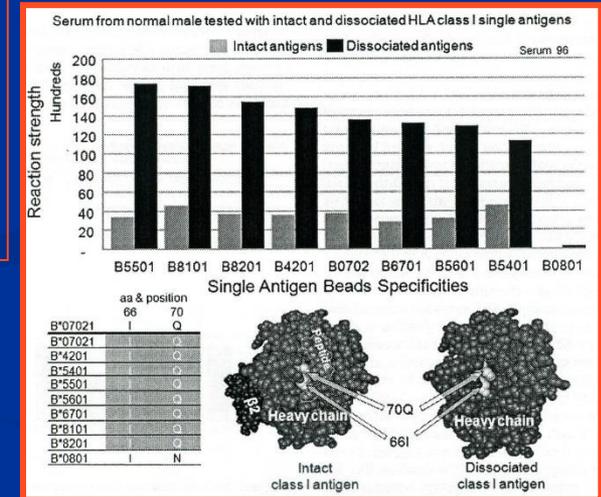
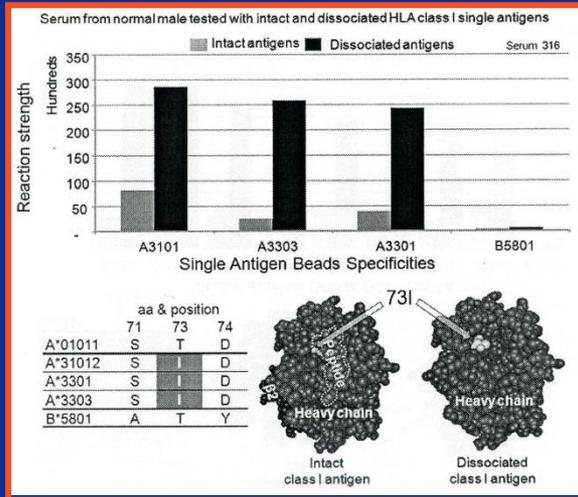
^e IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Department of Regenerative Medicine, North Italy Reference Center, Milan, Italy

306 Sieri maschi non alloimmunizzati, messicani
 95 Sieri maschi non alloimmunizzati, giapponesi
 18 Sieri sangue cordonale, italiani

Ab verso antigeni HLA denaturati:
 normale sopravvivenza graft

Ab verso antigeni HLA intatti:
 ridotta sopravvivenza graft

Cai, Terasaky et al. Transplantation 2009



Anti-HLA immuni: la gravidanza

- 24 out of 61 were Positive (39.3%)
 - 30% 1 pregnancy*
 - 70% 2 or more pregnancies*
- 37 out of 61 were Negative (60.7%)

Antibody Specificity:

- 8 Anti-HLA Class I
- 4 Anti-HLA Class II
- 12 Anti-HLA Class I and II

Anti-HLA immuni: la gravidanza

Strength of the antibody

Antibody anti-HLA	> 500 < 1000	>1000 <5000	> 5000
Class I n. 8	4	2	2
Class II n. 4	2	2	0
Class I Class II n. 12	2 0	5 5	5 7

Anti-HLA dopo stimolazione con GM-CSF

Anti-HLA by CDC: +30 after PBHSCT or BMT

All	PBHSCT	BMT	P
Anti-HLA IgG	5/24 (21%)	1/27 (4%)	.02
Anti-HLA IgM	8/24 (17%)	0/26	.04
Don neg Ab/Rec neg Ab			
Anti-HLA IgG	4/23 (33%)	0/27	.001
Anti-HLA IgM	8/24 (33%)	0/26	.001

Anti-HLA by flow cytometry: +30 after PBHSCT or BMT

All	PBHSCT	BMT	P
Anti-HLA Class I IgG	10/24 (42%)	3/27 (11%)	.02
Anti-HLA Class II IgG	5/24 (21%)	1/27 (4%)	.09
Don neg Ab/Rec neg Ab			
Anti-HLA Class I IgG	7/20 (35%)	0/20	.008
Anti-HLA Class II IgG	1/19 (5%)	0/22	.46

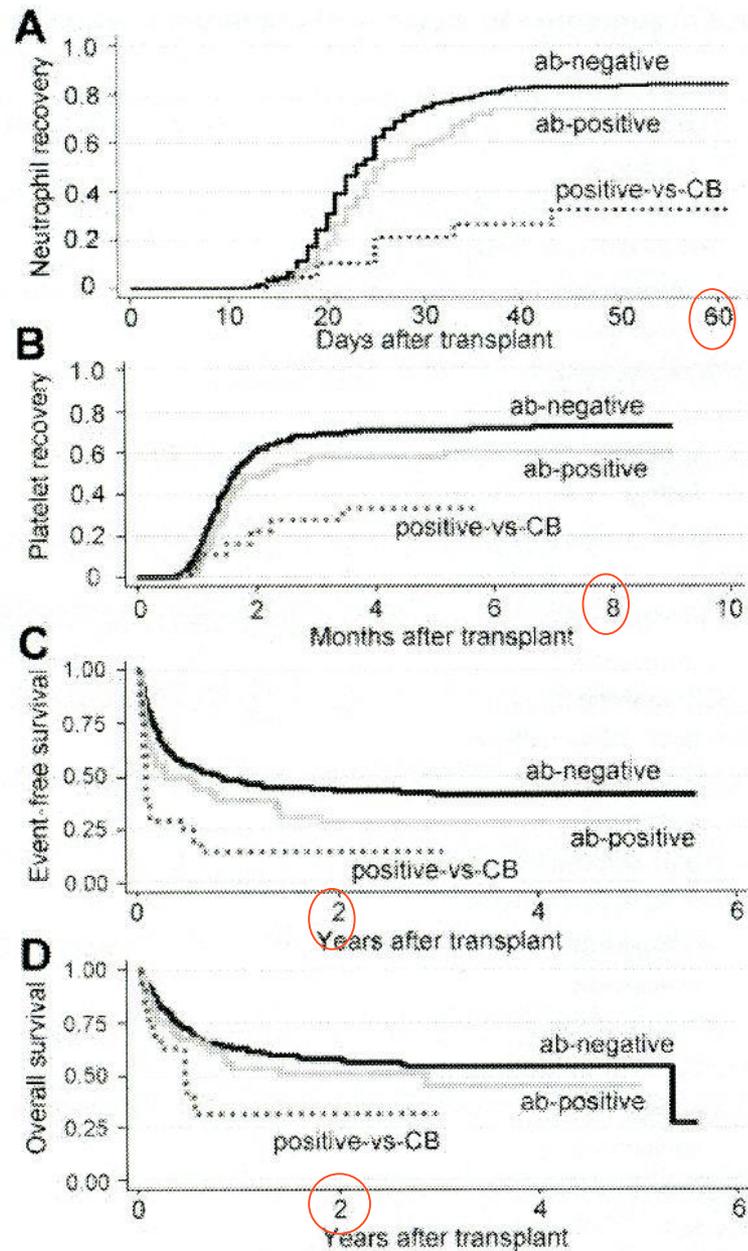
The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations

Minoko Takanashi,¹ Yoshiko Atsuta,² Koki Fujiwara,¹ Hideki Kodo,³ Shunro Kai,⁴ Hiroyuki Sato,⁵ Masatoshi Kohsaki,⁶ Hiroshi Azuma,⁷ Hidenori Tanaka,¹ Atsuko Ogawa,¹ Kazunori Nakajima,¹ and Shunichi Kato⁸

¹Japanese Red Cross Tokyo Blood Center, Tokyo, Japan; ²Department of HSCT Data Management, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan; ³Tokyo Cord Blood Bank, Tokyo, Japan; ⁴Department of Transfusion Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan; ⁵Japanese Red Cross Fukuoka Blood Center, Fukuoka, Japan; ⁶Japanese Red Cross Osaka North Blood Center, Osaka, Japan; ⁷Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center, Sapporo, Japan; and ⁸Department of Cell Transplantation & Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

Blood, 2010

- 386 casi studiati
 - 89 positivi per anticorpi anti-HLA (23,1%)
 - 69 positivi per anticorpi NON diretti verso il Cordone
 - 45 casi positivi per anticorpi anti HLA Classe I
 - 10 casi positivi per anticorpi anti HLA Classe II
 - 14 casi positivi per anticorpi anti HLA Classe I e II
 - 20 positivi per anticorpi diretti verso il Cordone
 - 15 casi positivi per anticorpi anti HLA Classe I
 - 5 casi positivi per anticorpi anti HLA Classe II



Ab-neg vs Ab-pos $p=.024$

Ab-pos vs pos-CB $p=.005$

Ab-neg vs Ab-pos $p=.05$

Ab-pos vs pos-CB $p=.062$

Ab-neg vs Ab-pos $p=.037$

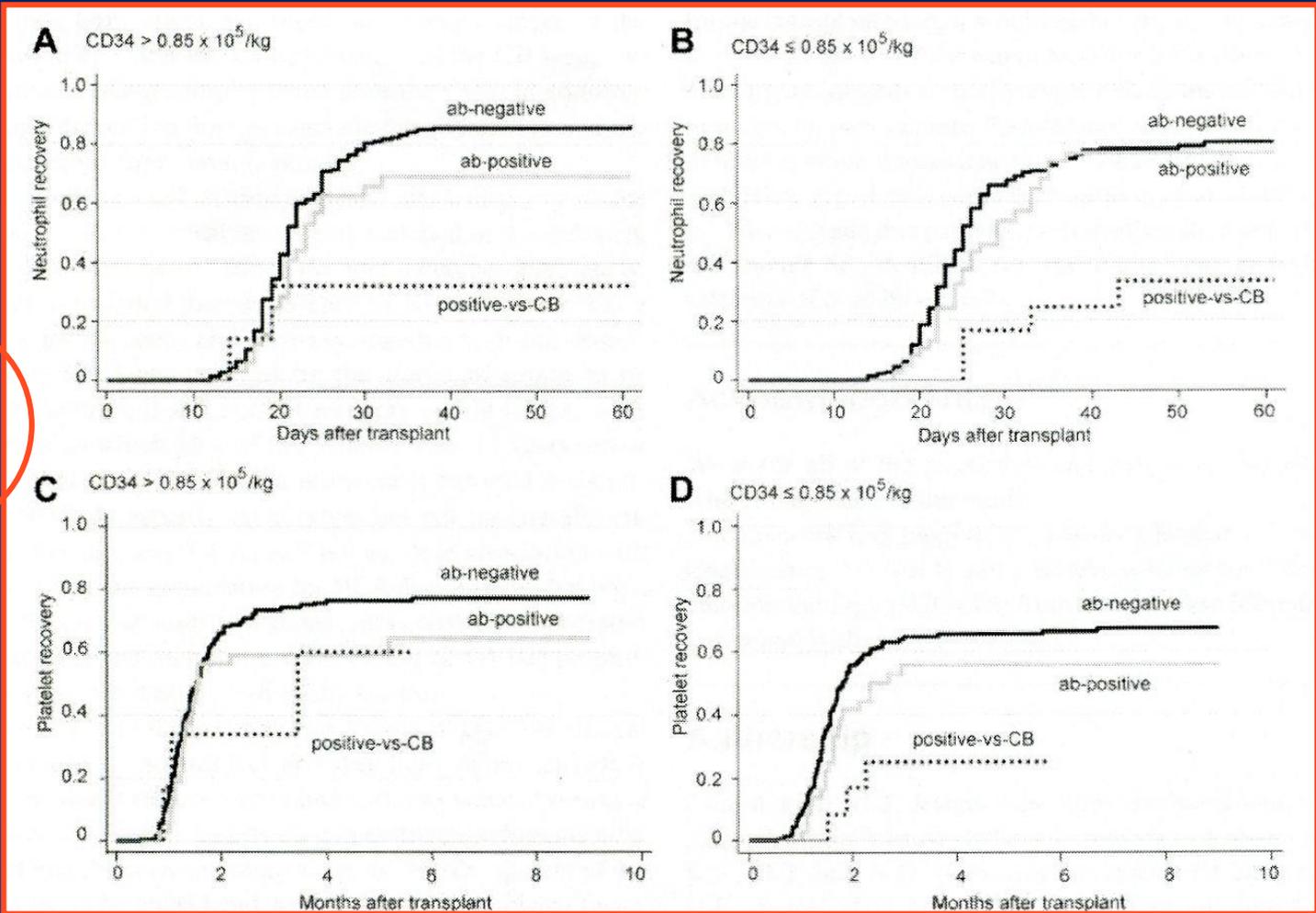
Ab-pos vs pos-CB $p=.016$

Ab-neg vs Ab-pos $p=.25$

Ab-pos vs pos-CB $p=.13$

Dose CD34+ e anticorpi anti-HLA

A-C
p=n.s



p=.0061

p=.020

POSITIVE SERUM CROSSMATCH AS PREDICTOR FOR GRAFT FAILURE IN HLA-MISMATCHED ALLOGENEIC BLOOD STEM CELL TRANSPLANTATION

HELLMUT D. OTTINGER,^{1,2} VERA REBMANN,¹ KERSTIN A. PFEIFFER,¹ DIETRICH W. BEELEN,² BERNHARD KREMENS,³ VOLKER RUNDE,² ULRICH W. SCHAEFER,² AND HANS GROSSE-WILDE^{1,4}

30 pazienti trapiantati di CSE (26 adulti e 4 pazienti pediatrici)
Periodo: dal 1985 al 2000

Tipizzazione HLA

Periodo dal 1985-1990: Tipizzazione sierologica e MLC

Periodo dal 1990-1996: Tipizzazione sierologica Classe I e Biologia molecolare
Bassa risoluzione Classe II

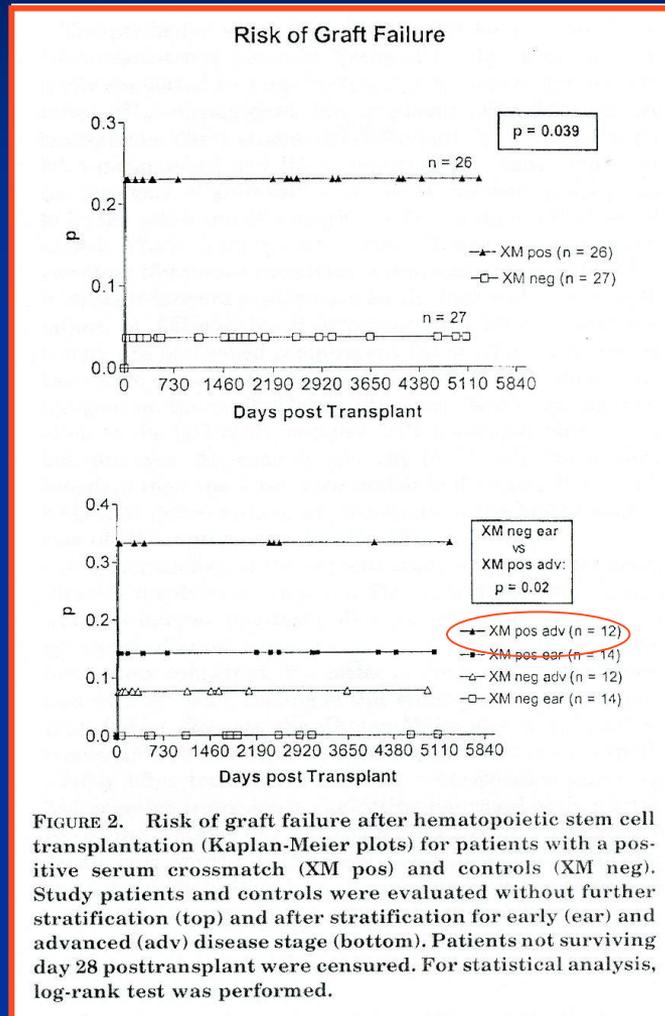
Periodo dal 1996: Biologia molecolare bassa risoluzione Classe I e alta
risoluzione Classe II

Cross-match (XM)

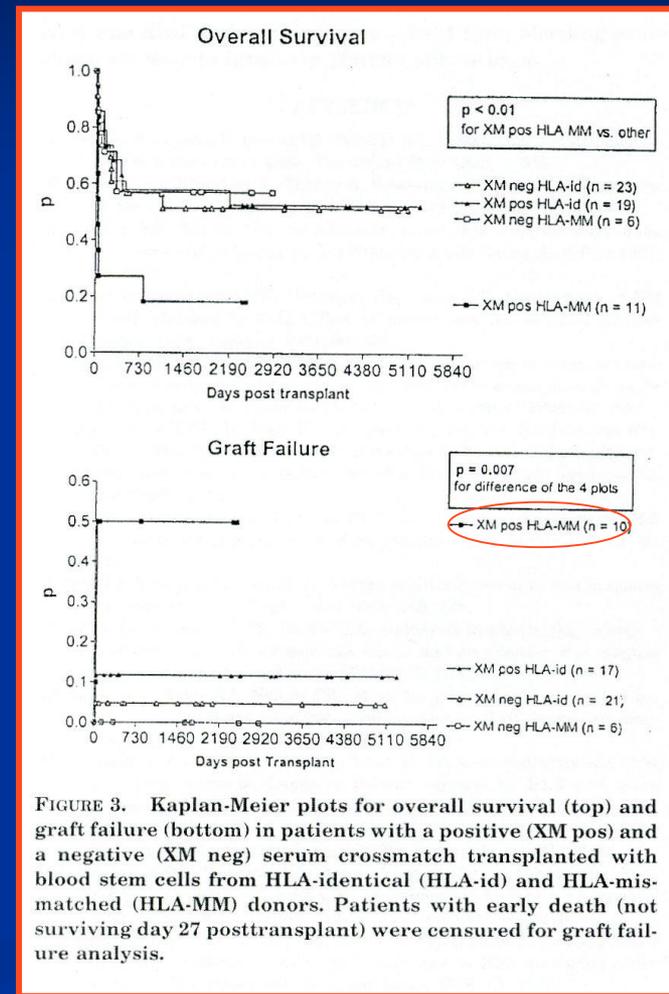
XM positivo per i linfociti B: 30 pazienti

XM positivo per i linfociti T: 14 pazienti

Cross-match Rigetto del graft



Cross-match numero di mismatch



Clinical Significance of Recipient Antibodies to Stem Cell Donor Mismatched Class I HLA Antigens

Marilyn S. Pollack and David Ririe

Human Immunology, 2004

TABLE 1 HLA haplotypes for the case report family

Patient	a= A*32, B*35, Cw*04, DRB1*11, DRB3 d/c= A*29, B*07, Cw*07, DRB1*01
Father:	a= A*32, B*35, Cw*04, DRB1*11, DRB3 b= A*24, B*38, Cw*NT, DRB1*14, DRB3
Mother:	c= A*68, B*07, Cw*07, DRB1*01 d= A*29, B*45, Cw*NT, DRB1*12, DRB3
Brother#1: (donor)	a= A*32, B*35, Cw*04, DRB1*11, DRB3 c= A*68, B*07, Cw*07, DRB1*01
Brother#2:	b= A*24, B*38, Cw*NT, DRB1*14, DRB3 c= A*68, B*07, Cw*07, DRB1*01
Sister:	a= A*32, B*35, Cw*04, DRB1*11, DRB3 d= A*29, B*45, Cw*NT, DRB1*12, DRB3

TABLE 2 Flow cytometry and PRA test results before and after transplant #1 and transplant #2

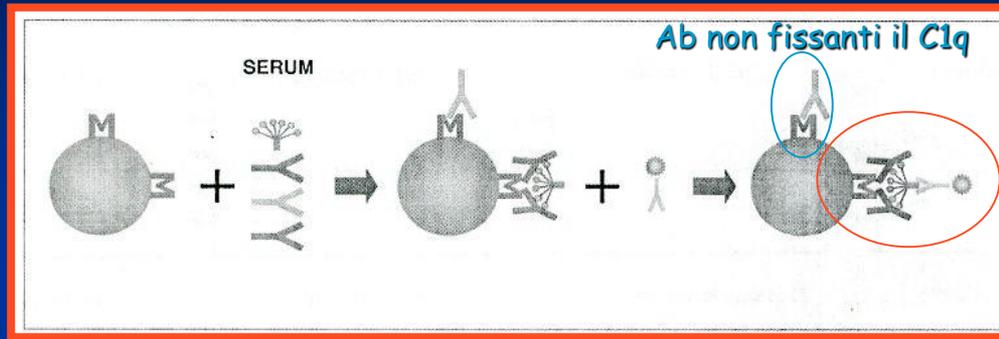
Sample date	Clinical status	PRA & AGH titer (antibody specificities)	Flow crossmatch shift/result A68 mismatch ^a	Flow crossmatch shift/result A2 mismatch ^a
6/25/03	Pretransplant #1	84%, (α A2,23,24,68)	119-Positive	115-Positive
7/8/03	19 Days post = TX #1	57%, α A68 Titer > 1:80 (α A2,23,24,68)	123-Positive	114-Positive
7/13/03	24 Days post = TX #1, immediately postplasmapheresis X3	NT	130-Positive	NT
7/21/03	32 Post=TX #1, preplasmapheresis + IVIG	α A68 titer > 1:80	157-Positive	NT
7/25/03	3 Days post=TX #2, immediately postplasmapheresis + IVIG X4	NT	33-Weak Positive	NT
7/31/03	9 Days post=TX #2; 6 days postplasmapheresis + IVIG X4	37%, (α A2,24)	12-Negative	NT
8/4/03	13 Days post=TX #2; 10 days postplasmapheresis + IVIG X4	29%, (α A2)	7-Negative	NT
8/11/03	20 Days post=TX #2; 17 days postplasmapheresis + IVIG X4	NT	5-Negative	110-Positive
10/16/03	86 Days post=TX #2; 83 days postplasmapheresis + IVIG X4	0%-no antibodies detected	NT	NT

^a Surrogate donors mismatched to the patient for A68 or A2, respectively, but not for any other major types (surrogate "recipient" cells matched to the recipient for all major types were negative in all cases [not shown]).

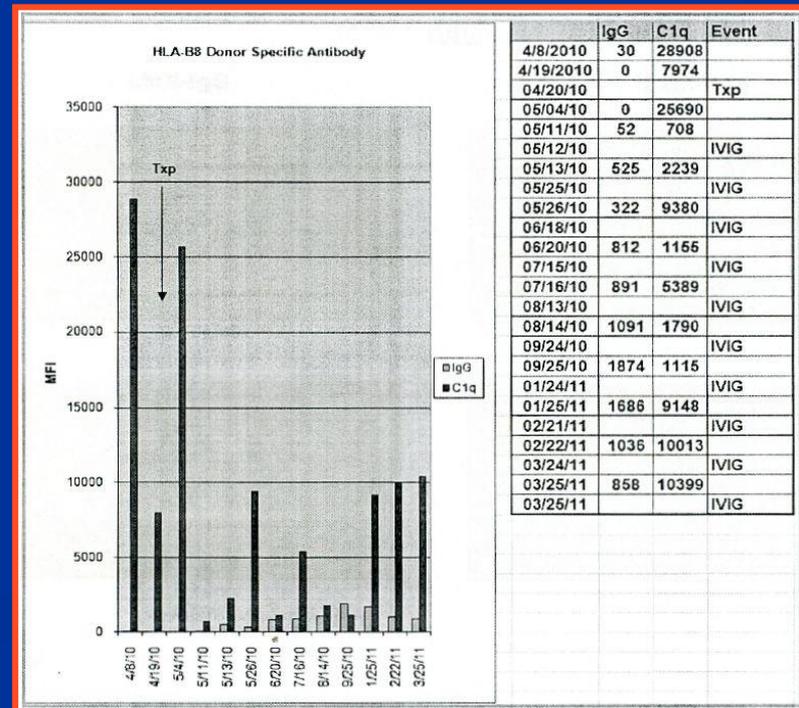
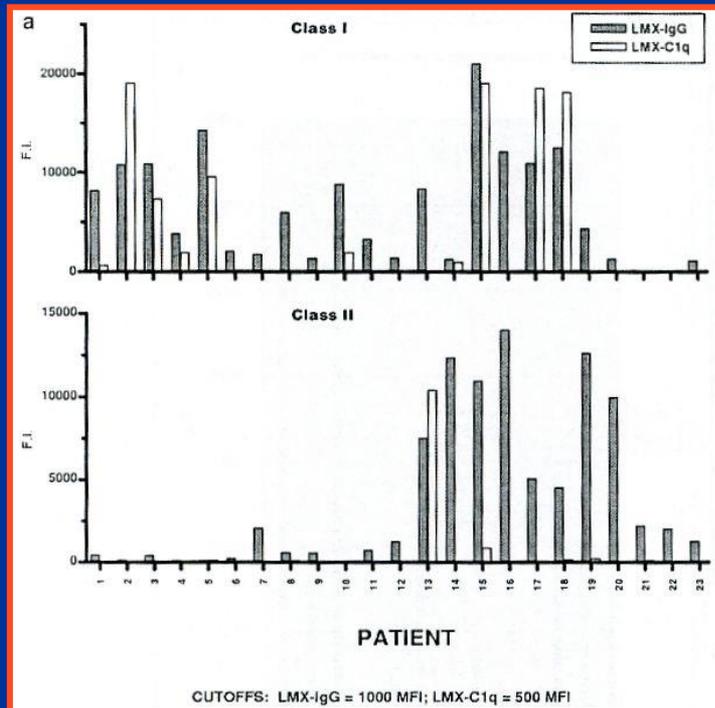
Abbreviations: AGH = anti-human globulin; IVIG = intravenous immunoglobulin; NT = not tested; TX = transplantation.

Anticorpi anti-HLA in Luminex: anticorpi fissanti il complemento

115 sieri: 22 uomini non trasfusi, 20 sieri positivi per anti-HLA, 6 EPT, 67 trapianti



Ab fissanti il C1q



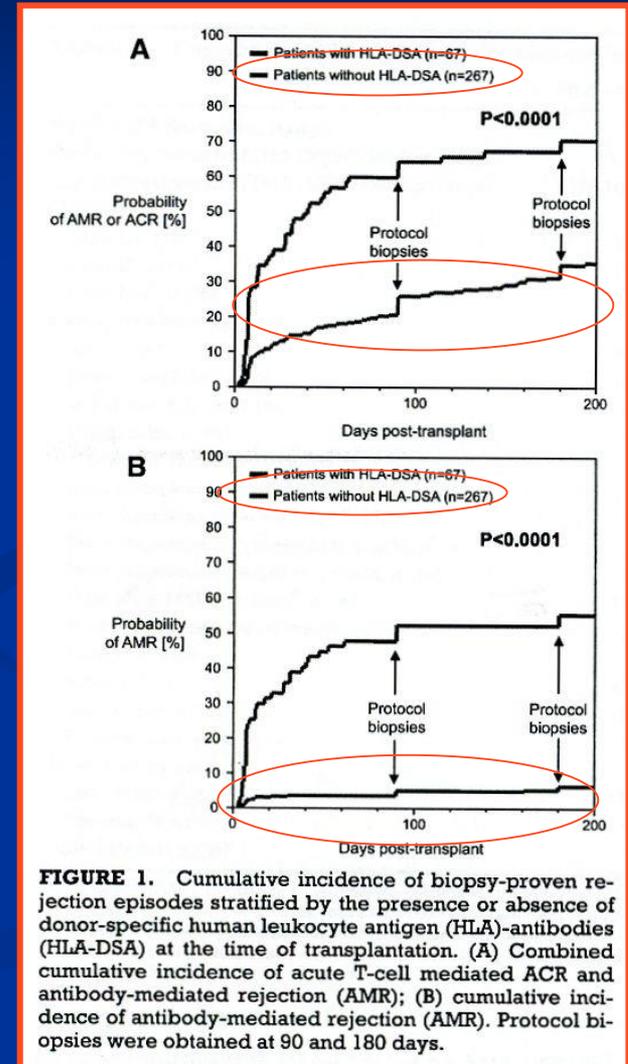
Il cross-match virtuale...

Clinical Relevance of Pretransplant Donor-Specific HLA Antibodies Detected by Single-Antigen Flow-Beads

Patrizia Amico,¹ Gideon Hönger,¹ Michael Mayr,¹ Jürg Steiger,¹ Helmut Hopfer,² and Stefan Schaub^{1,3}

Transplantation 2009

334 trapianti di rene



Cross-match virtuale e CSE da cordone

Prospective Monitoring for Alloimmunization in Cord Blood Transplantation: “Virtual Crossmatch” can be Used to Demonstrate Donor-Directed Antibodies

*Jonathan A. Gutman,^{1,2,4} Susan K. McKinney,³ Shalini Pereira,^{1,3} Sandra L. Warnock,³
Anajane G. Smith,^{1,3} Ann E. Woolfrey,^{1,2} John A. Hansen,^{1,2} and Colleen Delaney^{1,2}*

Transplantation 2009

46 pazienti studiati per lo screening anticorpale
4/46 (9%) pazienti con PRA+
Proposto algoritmo di selezione unità di SCO

- Paziente n.1 anti-HLA B49:** due unità di SCO B49 scartate, selezionato donatore 1 mm/locus B +26 attecchimento neutrofili
- Paziente n.2 anti-HLA DR 1:** selezionata una unità compatibile, +16 attecchimento neutrofili
- Paziente n.3 anti-DQ7:** unità di SCO DQB1*0301, Xm in CDC-, Xm in CF±, Leucemia resistente, infezione, +12 decesso senza evidenza di attecchimento
- Paziente n.4 anti-Bw6:** nessuna alternativa a unità SCO Bw6+, +21 attecchimento

Detection of Antibodies to HLA-DP in Renal Transplant Recipients Using Single Antigen Beads

Jianxin Qiu,¹ Junchao Cai,¹ Paul I. Terasaki,^{1,3} Nadim El-Awar,² and Jar-how Lee²

TABLE 2. Detection of DP antibodies with respect to the presence or absence of HLA Class I and/or DR DQ antibodies

Class I/DR, DQ antibodies	Functioning group		Rejected group	
	No. patients	DP antibody	No. patients	DP antibody
-/-	114	4 (3.5)	69	9 (13.0) ^b
-/+	7	1 (14.3) ^a	47	13 (27.7) ^a
+/-	10	0 (0)	23	4 (17.4)
+/+	7	2 (28.6) ^a	46	10 (21.7) ^a
Total	138	7 (5.1) ^a	185	36 (19.5) ^a

Data are n (%).

^a In patients with DP antibodies, 42.9% (3/7) and 63.9% (23/36) had DR/DQ antibodies in the functioning and rejected group.

^b In Class I/ DR DQ antibody negative patients, compared with the functioning group, the rejected group had more DP antibodies (P<0.05).

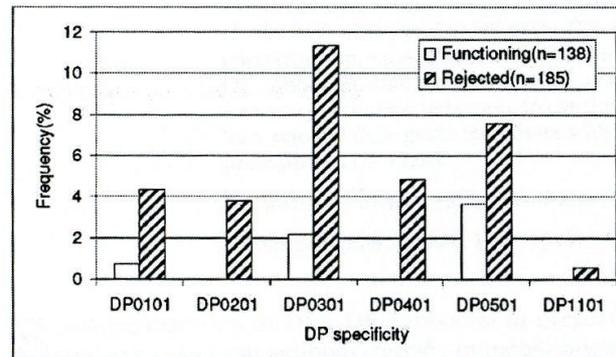


FIGURE 2. Frequency of HLA-DP antibody specificities.

Anti-HLA non DSA pre-trapianto di CSE

- Eurocord: trapianto singolo o doppio di CSE cordonali. 32 riceventi con anti-HLA non DSA vs 158 pz senza anticorpi: **nessuna differenza nel recupero dei granulociti neutrofili**
- Detrait et al.: Trapianto di CSE correlato e non correlato. 24 pz anti-HLA non DSA vs 83 pz senza anticorpi: **nessuna differenza nell'attecchimento.**
- Takanashi et al.: trapianto singolo o doppio di CSE cordonali. 35 riceventi con anti-HLA non DSA vs 250 pz senza anticorpi: **> 90% attecchimento CSE cordonali**

Anti-HLA non DSA: non influenzano l'attecchimento

Persistenza degli anticorpi HLA e produzione de novo nel TMO a ridotta intensità di condizionamento

RM Fasano, Br J Haematol 2014,166,425-434

- Valutazione dell'effetto degli anticorpi anti-HLA nel trapianto di CSE a ridotto regime di condizionamento.
- Pazienti alloimmunizzati: la persistenza degli anticorpi per lungo tempo (>100 gg) era associata ad MFI > 10000.
- Anticorpi de-novo post-trapianto: refrattarietà piastrinica e dimostrazione di anticorpi nei donatori
- Cut-off utilizzati: Positività Labscreen con **MFI >500**
Positività Single Antigen con **MFI >2000**

Esistono delle variabili sulle stesso siero ripetuto con lo stesso test?

- Variabilità MFI
- Siero versus siero
- Operatore versus operatore
- Variabilità dei controlli
- Densità dell'antigene sulle beads

Differenti punti di vista: quale MFI ?

Spellman et al. Blood 2010. TMO non correlato. DSA positivo MFI > 2000

Takanashi et al. Blood 2010. TMO da singolo cordone. DSA positivo MFI > 1000

Ciurea et al. Transplant 2009. TMO aploidentico. DSA positivo MFI > 1500

Yoshihara et al. BMT 2011. TMO aploidentico. DSA positivo MFI > 5000
DSA positivo MFI > 10000
(alto livello)

Cutler et al, Blood 2011. TMO da doppio cordone. DSA positivo MFI > 1000

Conclusioni

Definire il cut-off degli anticorpi anti-HLA nel TMO di CSE: uguale o differente dal trapianto d'organo solido ?

Quando studiarli ?

Studiarli nel paziente o anche nel donatore ?

Quali variabili possono influenzare l'effetto biologico dell'anticorpo ?

*Le risposte allo
Studio collaborativo AIBT....*

