



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Rivalutazione del rischio immunologico nel trapianto di fegato:
ruolo del crossmatch virtuale e degli anticorpi anti-HLA

Relatore:

Prof. Luisa Iamele

Correlatore:

Dott. Elena Longhi

Tesi Sperimentale di
Giulia Guerrisi

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1. Il trapianto di fegato	1
1.1. Evoluzione del trapianto	1
1.2. Indicazioni al trapianto	2
1.3. Modalità.....	2
2. Immunologia del trapianto di fegato	3
2.1. Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)	3
2.2. MHC di classe I: sviluppo, struttura e funzione	5
2.3. MHC di classe II: sviluppo, struttura e funzione	7
3. Il rigetto.....	8
3.1 Rigetto cellulare mediato da cellule T (TCMR)	10
3.2. Rigetto mediato da anticorpi (AMR)	11
4. Fattori di rigetto e danni del trapianto non correlati all'HLA	13
4.1. Gli antigeni non HLA	13
4.2. Anticorpi anti-cellule endoteliali AECA.....	14
4.3. Altri anticorpi non-HLA associati al trapianto di fegato	15
5. La valutazione immunologica del paziente	16
6.Virtual crossmatch (V-XM).....	21
7. Il laboratorio di Immunologia dei trapianti del Policlinico di Milano.....	24
7.1. Attività svolte dal Laboratorio di Immunologia dei Trapianti.....	25
2. SCOPO DEL LAVORO	26
3. MATERIALI E METODI	27
3.1. Trapianti e raccolta dati	27
3.2. Ricerca Di Anticorpi Con Metodologia Luminex (Bead Array Technique)	27
3.2.1. LUMINEX® FLEXMAP™ 3D	27
3.2.2. Metodica	29
3.2.3. Accensione Luminex® FLEXMAP™ 3D	30
3.2.4. Calibrazione e verifica	31
3.2.5. Acquisizione dei campioni	32
3.2.6. Shut down	32
3.2.7 Analisi dei risultati	33
3.2.8. Criteri di accettabilità del test	33

3.3. Tipizzazione HLA del donatore di organi mediante Real Time PCR-SSP	34
3.3.1. <i>Metodica</i>	34
3.3.2. <i>Amplificazione e melting su termociclatore Real Time QUANTstudio 6pro</i>	36
3.3.3. <i>Controllo tipizzazione HLA</i>	36
3.3.4. <i>Refertazione tipizzazione HLA del donatore</i>	37
3.4 Tipizzazione HLA del paziente con RSSO Luminex.....	37
3.4.1. <i>Amplificazione</i>	37
3.4.2. <i>Criteri di accettabilità dei campioni amplificati.....</i>	39
3.4.3. <i>Accensione dello strumento flexmap 3D</i>	40
3.4.4. <i>Ibridazione.....</i>	40
3.4.5. <i>Acquisizione dei campioni</i>	41
3.4.6. <i>Shut down</i>	41
3.4.7. <i>Interpretazione dei risultati.....</i>	41
3.4.8. <i>Criteri di accettabilità delle sessioni di lavoro</i>	43
3.4.9. <i>Criteri di accettabilità dei risultati</i>	43
3.5. Crossmatch in citotossicità	44
3.5.1. <i>Preparazione schema cross match standard e semina dei sieri.....</i>	44
3.5.2. <i>Sieri dei pazienti</i>	46
3.5.3. <i>Esecuzione del test e lettura</i>	47
3.5.4. <i>Lettura al microscopio</i>	47
3.5.5. <i>Validazione del test ed interpretazione dei risultati.....</i>	48
3.5.6. <i>Refertazione crossmatch</i>	49
3.6. Analisi statistica.....	49
4. RISULTATI.....	51
4.1. <i>Caratteristiche della casistica</i>	51
4.2. <i>Caratteristiche demografiche della popolazione.....</i>	51
4.2.1. <i>Caratteristiche dei riceventi</i>	51
4.2.2. <i>Caratteristiche dei donatori</i>	52
4.3. <i>Caratteristiche immunologiche e sensibilizzazione HLA in relazione al sesso del ricevente</i>	52
4.3.1. <i>PRA massimo.....</i>	52
4.3.2. <i>DSA preformati.....</i>	53
4.4. <i>Valutazione del risultato del crossmatch.....</i>	53

4.4.1. Presenza di DSA preformati in relazione all'esito del CDC-XM	54
4.4.2. Distribuzione dei DSA preformati per locus HLA in relazione all'esito del CDC-XM	54
4.4.3. Classe e MFI dei DSA preformati in relazione all'esito del CDC-XM	55
4.5. Rigetto post-trapianto e profilo immunologico pre-trapianto	56
4.5.1. Frequenza dei rigetti e associazione con CDC-XM e DSA preformati	56
4.5.2. Profilo immunologico pre-trapianto dei trapianti con rigetto	57
4.5.3. Distribuzione dei DSA preformati per locus HLA nei trapianti DSA-positivi con rigetto	58
5. DISCUSSIONE.....	60
6. CONCLUSIONI.....	66
7. BIBLIOGRAFIA.....	68

INTRODUZIONE

1. Il trapianto di fegato

1.1. Evoluzione del trapianto

Il trapianto di fegato è una procedura chirurgica che consiste nella rimozione e sostituzione di un fegato malato, o dalle funzionalità gravemente danneggiate, ma comunque caratterizzato da disfunzione d'organo terminale, con un fegato sano proveniente da un donatore compatibile (1). I primi tentativi di trapianto epatico furono condotti a partire dalla fine degli anni '50, quando gruppi di ricerca preclinica a Boston e Denver svilupparono tecniche sperimentali su modelli animali, in particolare sul cane. Tali studi, condotti per oltre quattro anni, portarono al primo tentativo di trapianto di fegato al mondo nell'uomo, effettuato da Starzl et al. il 1° marzo 1963 presso l'Università del Colorado. Il paziente era un bambino di tre anni con atresia biliare che però morì durante l'intervento a causa di un disturbo della coagulazione e di un'emorragia incontrollata. L'esito, dunque, fu negativo, così come quello dei successivi tentativi condotti tra il 1963 e il 1967 a Boston e Parigi, che si conclusero senza successo, determinando una temporanea sospensione dei programmi clinici. La svolta, che segna l'inizio dell'era clinica del trapianto epatico, avvenne il 23 luglio 1967, quando, grazie anche all'introduzione della globulina antitimocitaria, un agente immunosoppressore in grado di ridurre la risposta dei linfociti T, fu ottenuta la prima sopravvivenza significativa in un paziente umano, una bambina di un anno e mezzo affetta da carcinoma epatocellulare, che visse per oltre 13 mesi prima di morire per metastasi. A partire da questo risultato, negli anni successivi, il trapianto epatico iniziò a svilupparsi progressivamente, grazie ai continui miglioramenti nelle tecniche chirurgiche e soprattutto all'introduzione di terapie immunosoppressive e antinfettive sempre più efficaci. In particolare, nel 1979, il contributo di Roy Calne e dei suoi collaboratori, che utilizzarono per la prima volta la ciclosporina in due pazienti, fu fondamentale per lo sviluppo dell'immunosoppressione farmacologica, rendendo possibile il controllo del rigetto e quindi la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati. Sulla base dei risultati ottenuti in oltre 500 casi, nel 1983, i National Institutes, approvarono ufficialmente il trapianto di fegato per trattare patologie epatiche in fase terminale. Negli anni successivi, inoltre, i risultati clinici mostrarono un netto miglioramento, con una sopravvivenza a 1 e 5 anni rispettivamente del 73% e del 64% in un totale di 1.179 pazienti sottoposti a trapianto. Infine, un ulteriore avanzamento si ebbe nel 1990, quando, in sostituzione della ciclosporina, fu introdotto per la prima volta il tacrolimus, un agente immunosoppressore inizialmente impiegato nei pazienti con rigetto refrattario al trattamento

convenzionale e successivamente divenuto il principale agente immunosoppressore nel trapianto epatico. Negli ultimi decenni, i progressivi miglioramenti nelle tecniche chirurgiche nel controllo del rigetto e nella gestione delle complicanze infettive, hanno reso il trapianto di fegato una procedura consolidata, oggi considerata il trattamento di scelta per numerose malattie epatiche in stadio avanzato (2) (3).

1.2. Indicazioni al trapianto

Le cause associate a patologie epatiche possono essere molteplici tra cui infezioni virali, abuso cronico di alcol e malattie congenite, presenti, dunque, alla nascita. Il danno al fegato che ne deriva è in genere progressivo e determina un'alterazione nella normale architettura dell'organo, caratterizzata dalla formazione di noduli e dalla sostituzione del tessuto epatico danneggiato con tessuto fibrotico, formato da cellule che danno origine al tessuto connettivo. Non possedendo però le stesse capacità funzionali degli epatociti, tale tessuto determina un'alterazione delle funzioni sintetiche e metaboliche del fegato, determinando lo sviluppo della cosiddetta cirrosi epatica. Tra le principali cause delle malattie epatiche rientrano le epatiti virali, in particolare da virus dell'epatite B e C, l'abuso prolungato di alcol, le malattie da accumulo, tra cui la malattia di Wilson e l'emocromatosi e le patologie delle vie biliari, come la colangite biliare primitiva e la colangite sclerosante primitiva. Inoltre, la cirrosi epatica rappresenta la principale condizione predisponente per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare. L'insufficienza epatica può anche manifestarsi in forma acuta, come conseguenza di un danno massivo e rapido degli epatociti, dovuto a fenomeni di infiammazione e necrosi estesa, come ad esempio nel caso dell'avvelenamento da funghi. In questo contesto, il trapianto di fegato è raccomandato per il trattamento della cirrosi epatica, dell'insufficienza epatica acuta insorta su un fegato precedentemente sano e dell'epatocarcinoma in casi selezionati.

Per l'inserimento nella lista di attesa per il trapianto di fegato, il paziente deve essere sottoposto ad un rigoroso processo di valutazione volto ad analizzare sia le sue condizioni cliniche di salute, sia il suo stato psicologico. La limitata disponibilità di donazioni rispetto alle richieste, infatti, rende necessaria un'attenta valutazione dei candidati, che ha lo scopo di verificare l'idoneità del paziente al delicato intervento chirurgico, la consapevolezza del percorso che dovrà affrontare e infine l'aderenza alle terapie e ai controlli che dovrà seguire post-trapianto. In alcuni casi, come ad esempio in pazienti affetti da cirrosi epatica correlata all'abuso di alcol, è richiesto anche un percorso per il trattamento della dipendenza alcolica.

1.3. Modalità

Per eseguire un trapianto di fegato, le modalità sono principalmente tre e comprendono: il trapianto da donatore vivente ed il trapianto da donatore deceduto che può avvenire come intero organo oppure

mediante la tecnica split-liver. Nel primo caso, dal donatore vivente, viene prelevata una porzione di fegato, generalmente il lobo sinistro, e trapiantata nel ricevente malato. In questo modo entrambe le porzioni saranno in grado di rigenerarsi fino a raggiungere una completa funzionalità. Nel trapianto da donatore deceduto, il fegato viene prelevato da un soggetto che in vita abbia espresso il consenso alla donazione o, nel caso il deceduto non si sia espresso in merito, in assenza di opposizione da parte dei familiari aventi diritto e trapiantato in un paziente in lista di attesa. La tecnica split-liver, invece, consente di dividere chirurgicamente il fegato in due porzioni, emifegato sinistro e destro, generalmente destinate rispettivamente ad un ricevente pediatrico (di età inferiore o uguale a 17 anni) e a uno adulto, sebbene siano possibili anche altre possibilità.

Dal punto di vista chirurgico, l'intervento è composto da tre fasi principali: l'epatectomia, che consiste nella rimozione del fegato malato, la fase anepatica, in cui il paziente è temporaneamente privo di fegato e infine il trapianto di quello nuovo.

La maggior parte dei trapianti è eseguita utilizzando organi provenienti da donatore deceduto e in modalità cosiddetta ortotopica, ossia trapiantando il fegato nuovo nella stessa sede anatomica dell'organo rimosso (1).

2. Immunologia del trapianto di fegato

2.1. Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)

Il complesso maggiore di istocompatibilità è un complesso genico che codifica per una serie di glicoproteine di superficie la cui funzione è quella di legare frammenti peptidici dell'antigene e di esporli sulla superficie cellulare affinché vengano resi disponibili al riconoscimento da parte del sistema immunitario, in particolare dai recettori antigene-specifici dei linfociti T. Nell'uomo prende il nome di sistema HLA, da "Human Leukocyte Antigens" ed è codificato da geni distribuiti sul braccio corto del cromosoma 6 per circa 4 centimorgan di DNA, pari a circa 4×10^6 paia di basi (Fig.1) (4) (5). I geni seguono un'ereditarietà mendeliana semplice e sono espressi in maniera codominante; quindi, vengono espresse entrambe le copie ereditate dai genitori. Ciascun locus HLA è presente in duplice copia, una per ciascun cromosoma e può esistere in diverse varianti chiamate alleli. Se un soggetto possiede due copie uguali si parla di omozigosi, mentre se sono diverse si parla di eterozigosi. Tutti i loci sono poliallelici, quindi per ciascun locus esistono molte varianti possibili e poiché alleli di diversi loci possono associarsi tra loro in maniera casuale in diversi modi, si genera nella popolazione una grande varietà di combinazioni alleliche. L'insieme degli alleli presenti su ciascun cromosoma prende il nome di alotipo. Ogni individuo eredita dunque in blocchi due alotipi, uno di origine paterna e uno di origine materna. Le frequenze dei diversi alleli variano sia all'interno

della stessa popolazione sia, maggiormente, tra popolazioni diverse quindi di conseguenza anche gli aplotipi presentano frequenze diverse. Tuttavia, l'associazione tra alleli non è sempre completamente casuale: alcune combinazioni si osservano con una frequenza minore o maggiore rispetto a quanto ci si aspetterebbe. Questo fenomeno è chiamato *linkage disequilibrium* e comporta, all'interno di una determinata popolazione, presenza di aplotipi con frequenze decisamente diverse da quelle teoricamente attese (6).

Il sistema HLA si compone di tre regioni distinte: la regione di classe I in posizione telomerica, la regione di classe III nel mezzo e infine la regione di classe II in posizione centromerica.

La regione che contiene i geni HLA di classe I (HLA-A, -B, -C) codifica per l'intera catena pesante α delle molecole MHC di classe I, che comprende i segmenti extracellulari, la regione transmembrana e quella intracitoplasmatica per altre molecole MHC di minore importanza. La regione che contiene i geni HLA di classe II è costituita da una serie di sottoregioni codificanti per HLA-DP, -DQ e -DR, ciascuna contenente geni A e B che codificano rispettivamente per i due domini extracellulari delle catene proteiche α e β , per il segmento transmembrana e quello intracitoplasmatico. Infine, la regione di classe III, che si trova nel mezzo, non codifica per molecole MHC classiche, ma per diversi fattori coinvolti nella risposta immunitaria, come i componenti della via alternativa (Bf) e classica (C2, C4A, C4B) del sistema del complemento e molecole infiammatorie come le citochine TNF (Tumor Necrosis Factor) α e β . Inoltre, in prossimità della regione dei geni C4, sono presenti i geni della 21-idrossilasi, un importante enzima coinvolto nella biosintesi degli ormoni steroidei e due geni HSP che codificano per due heat shock proteins coinvolte nel trasporto intracellulare (7) (4).

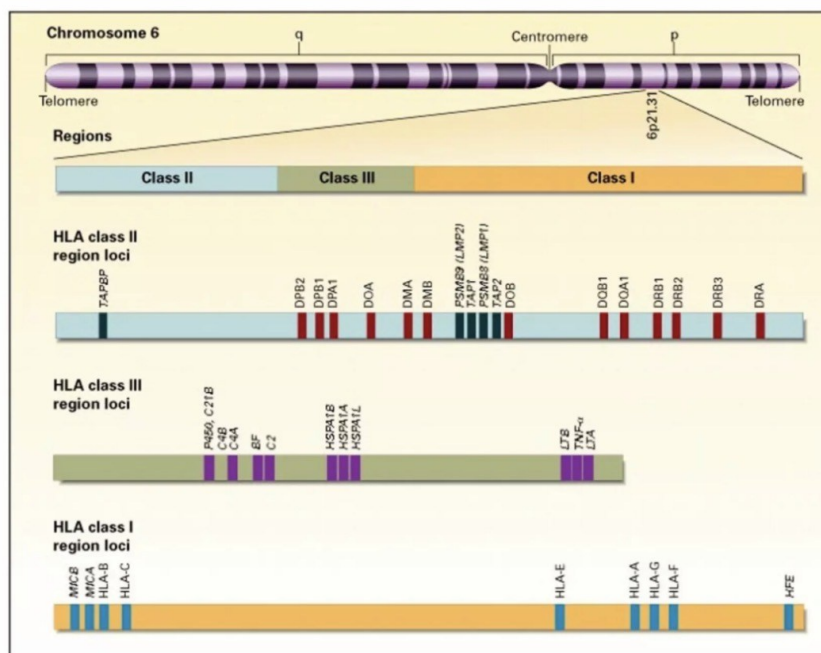


Figura 1- Mappa dell'MHC umano

2.2. MHC di classe I: sviluppo, struttura e funzione

Le molecole MHC di classe I, denominate HLA-A, HLA-B e HLA-C, sono glicoproteine di membrana presenti su tutte le cellule nucleate dell'organismo e sulle piastrine, ad eccezione degli eritrociti che, essendo anucleati, non esprimono molecole MHC. Un alto livello di espressione caratterizza le cellule del sistema immunitario, tra cui linfociti T e B, macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili, mentre è bassa nella maggior parte delle cellule somatiche, tra le quali gli epatociti. Dal punto di vista strutturale, l'MHC di classe I è un eterodimero costituito da due catene polipeptidiche non covalentemente associate: una catena pesante α di circa 45 kDa e una catena leggera β_2 -microglobulina di circa 12 kDa, non polimorfa e non glicosilata, non ancorata alla membrana plasmatica e codificata da un gene sul cromosoma 15 (7). La catena pesante α è costituita da una porzione extracellulare formata da tre domini α_1 , α_2 , α_3 , ciascuno lungo circa 90 amminoacidi codificati da esoni separati, una regione che attraversa la membrana cellulare di circa 25 residui idrofobici organizzati ad α elica e da una piccola porzione citoplasmatica di circa 30 amminoacidi C-terminale. I domini α_3 e la β_2 -microglobulina sono relativamente conservati e presentano una struttura caratterizzata da due foglietti β antiparalleli collegati da un legame disolfuro intracatenario che conferisce loro una struttura simile a quella delle immunoglobuline. I domini α_1 e α_2 , invece, sono quasi identici tra di loro nella struttura e formano la regione più importante della molecola a livello funzionale: si combinano a formare una piattaforma costituita da un foglietto β ad 8 strisce antiparallele, sormontato da due nastri di α eliche paralleli che formano una tasca centrale. Le

dimensioni della tasca, lunga circa 25 Å e larga 10 Å, permettono il legame di peptidi generalmente corti, di circa 8-10 amminoacidi in conformazione estesa e flessibile; questa struttura rappresenta il sito di legame peptidi derivati da proteine intracellulari che vengono presentati e riconosciuti dai linfociti T CD8. La presenza nella tasca sia di residui idrofobici che polari, consente l'interazione della molecola MHC con un'ampia gamma di peptidi, mantenendo comunque una specificità determinata dalla struttura della molecola stessa che presenta un'alta variabilità amminoacidica nella porzione centrale mentre i residui C ed N terminale sono altamente conservati (Fig.2). Dal punto di vista funzionale, le molecole MHC di classe I, svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento immunitario, presentando sulla superficie cellulare peptidi intracellulari ai linfociti T CD8+ ad attività citotossica. In particolare, i linfociti T sono in grado di distinguere un peptide antigenico solo se forma un complesso con una forma allelica di una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità, in un processo noto come “restrizione MHC”. Nel caso di difesa contro le infezioni virali, l'esposizione di peptidi virali, provoca la risposta dei linfociti T CD8+ che uccidono la cellula presentante l'antigene. Analogamente, nel contesto dei trapianti, ad essere riconosciute come non-self dal sistema immunitario del ricevente, possono essere molecole HLA estranee del donatore, che possono costituire un bersaglio e influenzare così il rigetto (8) (4).

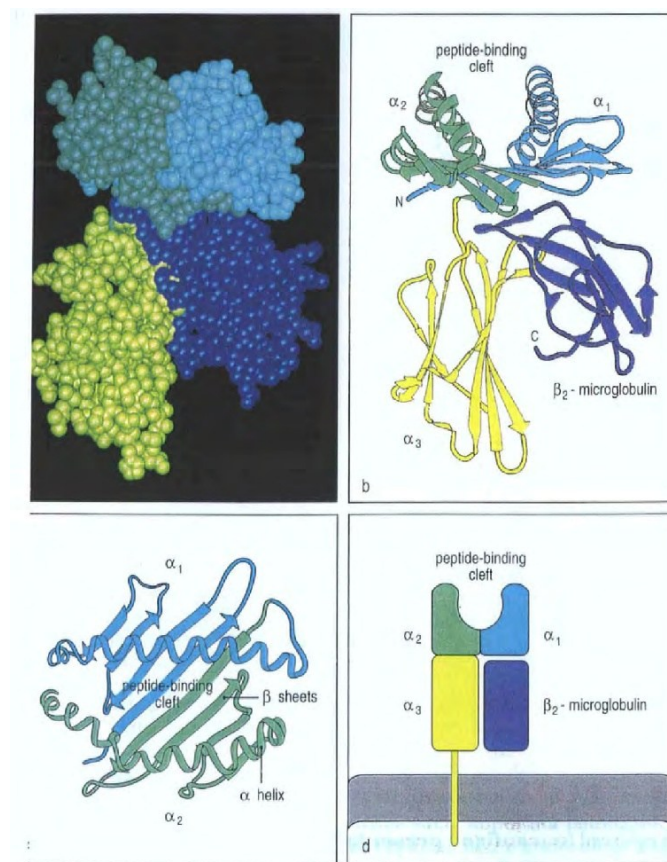


Figura 2- Struttura di una molecola MHC di classe I

2.3. MHC di classe II: sviluppo, struttura e funzione

Le molecole MHC di classe II sono glicoproteine di membrana presenti costitutivamente su linfociti T attivi, linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche, cellule di Langerhans della cute e cellule endoteliali (solo nell'uomo). I geni di classe II si trovano nella regione centromerica del sistema HLA e sono organizzati in tre sottoregioni altamente poligeniche: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR per ognuna delle quali esistono due loci codificanti per le catene α e β . Inoltre, questi geni sono accompagnati da altri geni che codificano per molecole non polimorfe come HLA-DM, che facilita il caricamento del peptide, HLA-DO che regola negativamente HLA-DM e la catena invariante (MHC Class II- Associated Invariant Chain), importante per un corretto assemblaggio della molecola. Dal punto di vista strutturale, l'MHC di classe II è un eterodimero costituito da due catene polipeptidiche transmembrana associate non covalentemente: una catena α e una catena β entrambe dal peso molecolare di circa 30 kDa ciascuna (la catena α è lievemente più pesante a causa di una maggiore glicosilazione) ed entrambe suddivise in due domini extracellulari di circa 90 amminoacidi ciascuno ($\alpha 1$ e $\alpha 2$ per la catena α , $\beta 1$ e $\beta 2$ per la catena β), una regione transmembrana costituita da circa 25 residui idrofobici e una coda citoplasmatica. Nel citoplasma, l'associazione con la catena invariante, impedisce l'interazione dell'eterodimero α/β con proteine o peptidi denaturate prima che raggiungano la vescicola endocitata che contiene materiale extracellulare. I residui polimorfici sono concentrati nelle regioni $\alpha 1$ e $\beta 1$ che, interagendo, formano una tasca all'interno della quale si lega il peptide. La tasca a livello strutturale è costituita da un foglietto β ad 8 strisce di foglietto β planare che fa da pavimento, sormontato da due α eliche; ognuno dei due domini forma una delle due eliche e quattro nastri del foglietto β . A differenza delle molecole di classe I, la tasca delle molecole MHC di classe II è aperta e ciò consente il legame con peptidi di dimensioni maggiori, generalmente compresi tra 13 a 25 amminoacidi (Fig.3). Dal punto di vista funzionale, le molecole MHC di classe II, legano peptidi derivati da proteine presenti nel microambiente extracellulare (antigeni esogeni), in un processo anch'esso caratterizzato da "restrizione MHC", che vengono riconosciuti dai recettori dei linfociti CD4+, solitamente ad attività helper, che intervengono attivando macrofagi e linfociti B per l'eliminazione degli agenti patogeni extracellulari. Nel contesto dei trapianti, gli antigeni MHC di classe II, rappresentano il bersaglio dei linfociti T helper CD4+ alloreattivi specifici (4) (9).

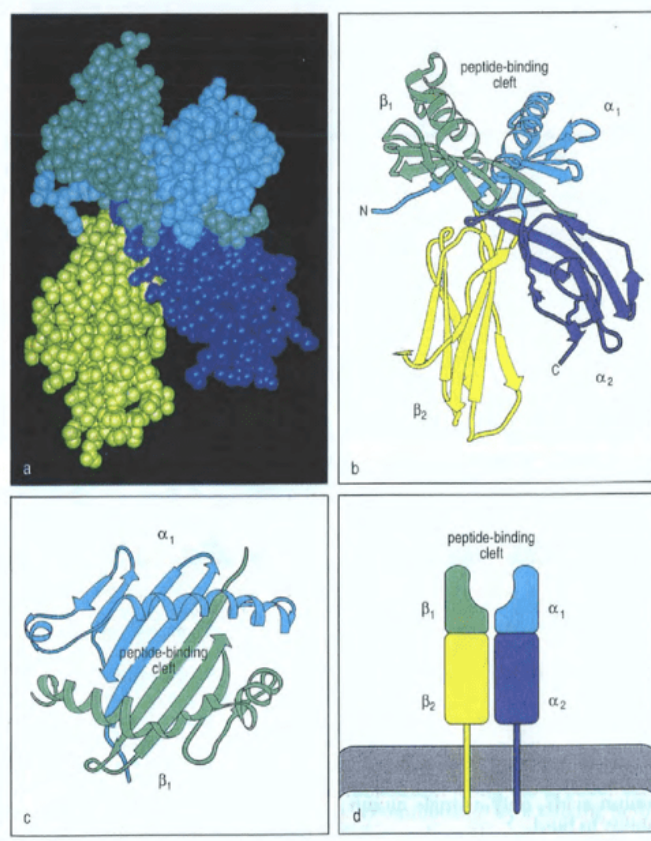


Figura 3- Struttura di una molecola MHC di classe II

3. Il rigetto

Il rigetto rappresenta una delle principali complicanze che può insorgere dopo il trapianto di fegato ed è dovuto all'attivazione del sistema immunitario del ricevente nei confronti dell'organo trapiantato che riconosce come "non-self". Sulla base dei meccanismi alla base e alle tempistiche di insorgenza, il rigetto viene classificato in tre forme principali: iperacuto, acuto e cronico.

Il rigetto iperacuto (Fig. 4) è una condizione rara nel trapianto epatico, ma molto grave che si manifesta nei primi minuti o ore dalla rivascolarizzazione dell'organo trapiantato. L'innescò è mediato dalla presenza di anticorpi preformati nel ricevente, già presenti, quindi, prima del trapianto, chiamati DSA (Donor-Specific Antibodies) diretti contro gli antigeni del donatore. Questi anticorpi possono legarsi all'endotelio dell'organo trapiantato, inducendo l'attivazione del sistema del complemento. Questo processo determina un danno endoteliale con conseguente aggregazione piastrinica, trombosi intravascolare e infine, nei casi più gravi, necrosi e perdita dell'organo trapiantato. La presenza dei DSA è spesso legata ad eventi sensibilizzanti come trapianti precedenti, trasfusioni o gravidanze. Per evitare questo tipo di rigetto, dunque, si verifica la compatibilità AB0 e si esclude la presenza di anticorpi anti HLA specifici diretti contro il donatore.

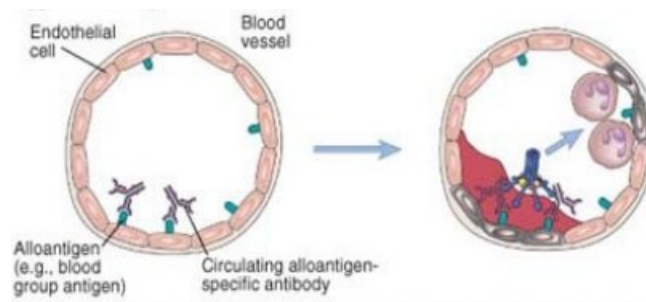


Figura 4-Rigetto iperacuto

Il rigetto acuto (Fig.5) è la condizione più comune, soprattutto nel contesto del trapianto epatico e si può manifestare in un periodo compreso tra una settimana e alcuni mesi dopo il trapianto (tipicamente tra il 4° e 21° giorno). Questo fenomeno è causato principalmente da due meccanismi immunologici: un processo mediato dai linfociti T, che genera un rigetto cellulare acuto e un processo mediato dai linfociti B, che dà origine a un rigetto umorale acuto. Dal punto di vista istologico, è caratterizzato dalla formazione di infiltrato nei tratti portal, presenza di linfoblasti, danno dei dotti biliari e nei casi più gravi, necrosi epatocitaria. Pur rappresentando una condizione comune, il rigetto acuto risponde in modo efficace alla somministrazione di farmaci immunosoppressori come corticosteroidi o nei casi più gravi anticorpi monoclonali, che abbassano drasticamente la percentuale di perdita dell'organo trapiantato.

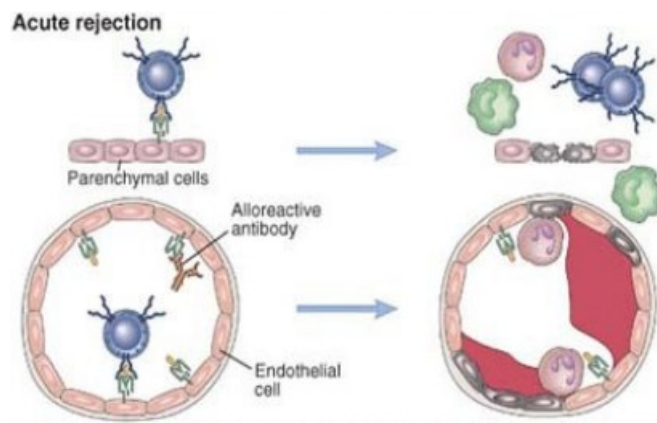


Figura 5- Rigetto acuto

Il rigetto cronico (Fig.6), infine, è una complicanza tardiva, si manifesta da alcuni mesi fino a diversi anni dal trapianto. È causato da una complessa interazione tra fattori di crescita e cellule immunitarie stimolati da linfociti T alloreattivi, che determinano una proliferazione delle cellule muscolari lisce, restringimento del lume vascolare, scomparsa dei dotti biliari e fibrosi, conducendo infine alla perdita dell'organo (10) (11).

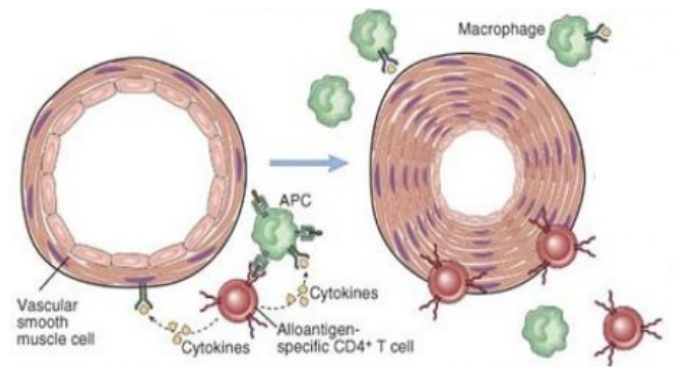


Figura 6- Rigetto cronico

3.1 Rigetto cellulare mediato da cellule T (TCMR)

Il rigetto mediato da linfociti T, o TCMR, è la forma più comune di rigetto e rientra principalmente nelle forme di rigetto acuto. Alla base del processo vi è il riconoscimento degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità tramite il recettore delle cellule T, noto come TCR (T cell receptor). In particolare, possiamo distinguere due popolazioni di linfociti T: i linfociti T CD4+, o linfociti T helper, che riconoscono antigeni presentati dalle molecole HLA di classe II, situate su cellule presentanti l'antigene (APC) come le cellule di Kupffer e i linfociti T CD8+, o linfociti T CD8+ citotossici che riconoscono antigeni presentati da molecole HLA di classe I, presenti su tutte le cellule nucleate. Al complesso TCR, inoltre, sono associati i corecettori CD4 e CD8, rispettivamente espressi dai linfociti T CD4+ e T CD8+, che stabilizzano l'interazione con le molecole MHC e favoriscono la trasduzione del segnale. Nelle fasi iniziali della risposta immunitaria, avviene il riconoscimento dell'antigene attraverso due modalità distinte:

- Diretta, in cui i linfociti T del ricevente riconoscono come estranee le molecole HLA del donatore. È una risposta intensa, tipica delle fasi precoci del trapianto
- Indiretta, in cui le cellule presentanti l'antigene del ricevente processano come normali proteine antigeniche gli antigeni HLA presenti sul fegato trapiantato e successivamente ne presentano i peptidi ai linfociti T del ricevente. È una risposta meno potente, ma più persistente, coinvolta principalmente nelle fasi tardive e nei fenomeni di rigetto cronico.

La completa attivazione dei linfociti T richiede, oltre all'interazione tra le molecole MHC e il recettore delle cellule T (TCR), anche segnali co-stimolatori e l'attivazione di diverse vie intracellulari, come la via della calcio-calceineurina o la via del fattore di trascrizione NFκB, che portano alla produzione di citochine proinfiammatorie e interleuchina 2 (IL-2), lo stimolo principale per la proliferazione e espansione clonale dei linfociti T. Una volta attivati, i linfociti T si differenziano in cellule effettrici e migrano verso l'allotrapianto epatico, in particolare: i linfociti T

CD8+, rilasciano proteine citotossiche come perforina e granzimi che inducono direttamente apoptosi delle cellule, mentre i linfociti T CD4+, secernono citochine per stimolare la proliferazione e il reclutamento di altre cellule del sistema immunitario come macrofagi e linfociti B. Questo processo riflette il quadro istologico tipico del TCMR, caratterizzato da un'inflammatione a livello portale con infiltrato denso cellulare e danno diffuso all'epitelio biliare, all'endotelio vascolare ed epatociti (Fig.7,8) (12) (13).

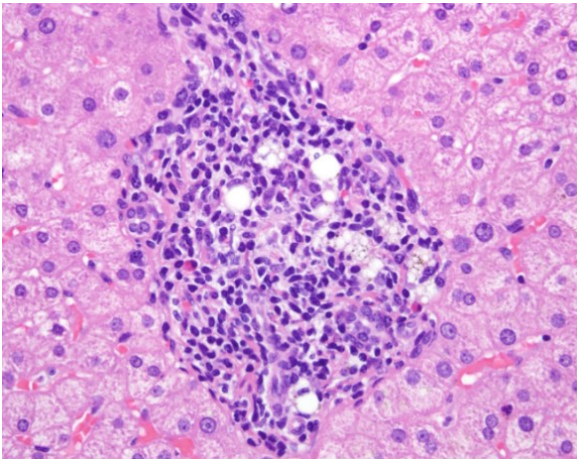


Fig. 7- Infiammazione portale (18)

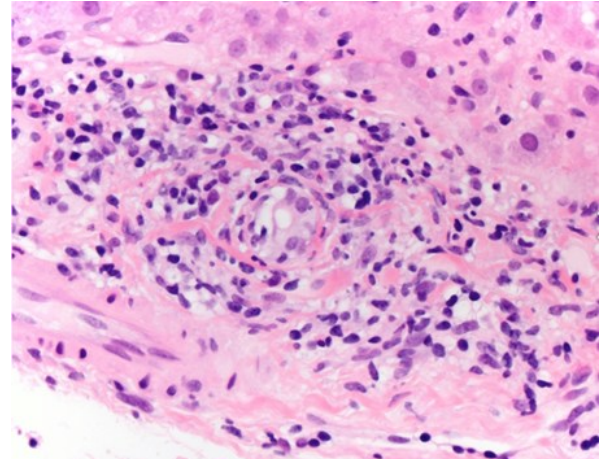


Fig. 8- Danno dell'epitelio biliare (18)

3.2. Rigetto mediato da anticorpi (AMR)

Il rigetto umorale mediato da anticorpi, o AMR, la cui forma più grave è il rigetto iperacuto, nel trapianto epatico viene considerato un evento raro e associato a incompatibilità AB0, che può portare a insufficienza epatica entro poche ore o giorni dal trapianto. Alla base del processo vi è la produzione di DSA, che possono essere preesistenti o svilupparsi de novo, diretti contro le molecole HLA del donatore. La loro produzione de novo avviene quando i recettori dei linfociti B naive (BCR) riconoscono gli antigeni del donatore e in presenza di segnali infiammatori, internalizzano e processano l'antigene che viene presentato su molecole MHC di classe II. Questo, insieme alla presenza di segnali co-stimolatori e citochine, permette l'interazione del complesso con cellule T helper che, attivandosi, inducono la proliferazione e differenziazione delle cellule B in plasmacellule, capaci di produrre anticorpi specifici del donatore e cellule della memoria che contribuiscono a risposte successive più rapide. A questo punto gli anticorpi prodotti legano le molecole MHC alle cellule endoteliali del donatore, determinando l'attivazione della cascata del complemento con produzione di mediatori dell'inflammatione e conseguente danno endoteliale. Nel fegato, la diagnosi di rigetto umorale, richiede la combinazione di criteri sierologici, immunoistochimici e istologici: in particolare, è richiesta la presenza di un quadro istologico caratterizzato da edema portale,

microvasculite, reazione duttulare biliare e ipertrofia endoteliale, causata dalla presenza di DSA nel siero e deposizione del complemento C4d a livello dei vasi di piccolo calibro (Fig.8,9) (12)(13).

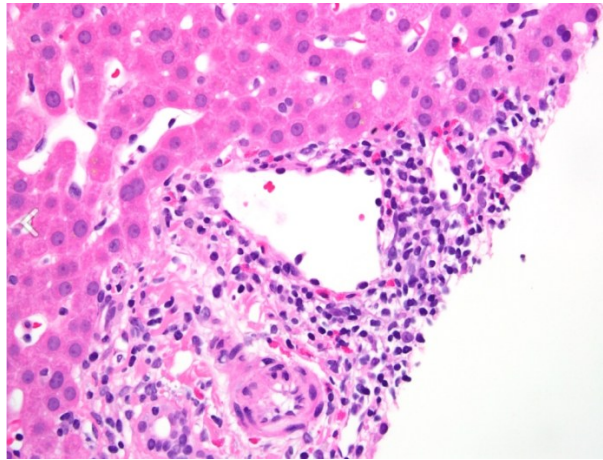


Figura 9- Danno endoteliale (18)

Il trapianto di fegato, rispetto ai trapianti allogenici di altri organi vascolarizzati, si distingue per una maggiore capacità di recupero al rigetto iperacuto e per una minore predisposizione al rigetto cronico. Questa caratteristica è da attribuire alle particolari proprietà del fegato, considerato ormai da tempo un organo immunologicamente privilegiato. Questa condizione dipende sia dalla sua particolare architettura anatomica, sia dalla presenza di numerose cellule immunitarie durante il trapianto (32). A livello anatomico, il fegato riceve una doppia vascolarizzazione dalla vena porta e dall'arteria epatica, che confluiscono entrambe nei sinusoidi epatici, caratterizzati da bassa pressione, endotelio fenestrato e espressione di molecole di adesione. Questi fenomeni favoriscono l'interazione tra le cellule immunitarie residenti, gli antigeni trasportati attraverso la circolazione portale e le cellule T, consentendo un controllo continuo della risposta immunitaria. Nel microambiente epatico sono presenti numerose cellule, provenienti sia dalla linea mieloide sia a quella linfoide, che svolgono un ruolo attivo, modulando la risposta immunitaria, piuttosto che amplificarla. Ad esempio, le cellule endoteliali sinusoidali, le cellule dendritiche e le cellule di Kupffer esprimono anche molecole HLA e costimolatorie quindi possono presentare antigeni ai linfociti T, ma esprimono bassi livelli di queste molecole e producono citochine proinfiammatorie, in particolare l'interleuchina 10, contribuendo allo stato di tolleranza immunologica. Le cellule stellate epatiche e le cellule stromali mesenchimali modulano la risposta immunitaria ed esprimono molecole inibitorie come PD-L1, che inattiva le cellule T attivate (32). A questi meccanismi, si aggiunge la presenza di elevate quantità di molecole solubili di classe I, che si suppone abbiano un importante effetto immunomodulatore. In condizioni fisiologiche, l'espressione di antigeni HLA di classe I e II risulta limitata su epatociti, dotti biliari e

cellule endoteliali del fegato, mentre, studi sulla distribuzione tissutale hanno dimostrato che infezioni e reazioni di rigetto post-trapianto ne inducono una marcata up-regolazione. Un'ulteriore peculiarità del fegato, rispetto ad organi come reni e cuore, è la sua capacità rigenerativa e dal fenomeno del microchimerismo. Le cellule di Kupffer del donatore infatti, post-trapianto vengono progressivamente sostituite in sei settimane dalle cellule reticolo-endoteliali del ricevente. Grazie ai progressi nelle tecniche di conservazione degli organi, nelle tecniche chirurgiche, nelle cure postoperatorie, nei protocolli immunosoppressivi e nella gestione operatoria, la sopravvivenza dopo il trapianto epatico è significativamente migliorata e sebbene il rigetto acuto rappresenti ancora una criticità, l'incidenza del rigetto cronico è sì è abbassata molto (13) (14) (32).

4. Fattori di rigetto e danni del trapianto non correlati all'HLA

Per diversi anni, nel contesto del trapianto di fegato, l'attenzione si è concentrata sull'alloimmunità correlata all'HLA, considerando la presenza di DSA una delle cause principali responsabili di rigetto anticorpo-mediato con conseguente perdita dell'organo trapiantato (23). Tuttavia, negli ultimi anni, l'osservazione di casi in cui il danno al fegato trapiantato non risultava spiegabile dalla sola presenza di DSA, ha portato a ipotizzare che non solo gli anticorpi anti-HLA, ma anche la risposta immunitaria contro antigeni non-HLA possa contribuire al rischio di rigetto. In particolare, la presenza di anticorpi non-HLA, ha assunto una maggiore importanza dopo aver osservato casi di rigetto anticorpo mediato anche in trapianti effettuati tra fratelli HLA identici, suggerendo il possibile coinvolgimento di altri bersagli immunologici responsabili del danno. Nel 2003, in un'analisi retrospettiva dei dati del registro UNOS (25), Terasaki suggerì addirittura che i fattori immunologici non-HLA fossero responsabili del fallimento del trapianto più degli stessi anticorpi anti-HLA, attribuendo circa il 40 % delle perdite dell'organo a meccanismi non-HLA, contro il 20% associato agli anticorpi HLA (24). Tutto questo, dunque, ha portato alla conclusione che l'immunità non-HLA possa contribuire in modo significativo alla perdita dell'organo trapiantato, sottolineando un ruolo clinico molto più rilevante rispetto al passato (26).

4.1. Gli antigeni non HLA

Gli antigeni non-HLA possono svilupparsi in due diverse modalità: nel primo caso, analogamente a quanto accade contro gli antigeni HLA, il ricevente sviluppa anticorpi contro antigeni polimorfici espressi dal donatore, inducendo una risposta alloimmune. Nel secondo caso, invece, si sviluppa una vera e propria risposta autoimmune e questo perché i bersagli diventano autoantigeni presenti normalmente all'interno delle cellule e non accessibili al sistema immunitario ma che, in condizioni

di infiammazione, danno cellulare, danno o apoptosi, vengono esposti sulla superficie cellulare (24). Negli ultimi anni, il progresso di numerose tecniche avanzate di laboratorio ha permesso di individuare numerosi antigeni non-HLA coinvolti nel danno del trapianto di fegato e nel rigetto (22).

4.2. Anticorpi anti-cellule endoteliali AECA

L'endotelio vascolare riveste un ruolo centrale nel contesto del trapianto di fegato e questo perché esso costituisce la prima barriera biologica tra la circolazione del ricevente e il tessuto vascolare dell'organo trapiantato. Le cellule endoteliali, infatti, esprimono numerosi antigeni non-HLA che possono diventare il bersaglio di specifici anticorpi e contribuire al rischio di rigetto. Gli anticorpi anti-cellule endoteliali sono tra gli anticorpi più studiati e rappresentano una popolazione estremamente eterogenea di anticorpi, che possono appartenere sia alla classe IgM sia alla classe IgG. Questi, sono diretti contro diversi antigeni presenti sulla superficie delle cellule endoteliali e sono in grado di: attivare il complemento con conseguente danno cellulare diretto, attivare le cellule endoteliali, che richiamano cellule infiammatorie nel sito del trapianto e indurre apoptosi. Attraverso questi meccanismi, gli AECA (in particolare le sottoclassi IgG2 e IgG4) contribuiscono allo sviluppo del rigetto anticorpo-mediato. Tra gli AECA più studiati vi sono gli anticorpi diretti contro due recettori espressi a livello endoteliale, accoppiati a proteine G: gli anticorpi anti-recettore dell'angiotensina II di tipo 1 (AT1R) e gli anticorpi anti-recettore dell'endotelina A (ETAR). Numerosi studi hanno associato entrambi a infiammazione microvascolare, arterite, vasculopatia e peggioramento della sopravvivenza dell'organo con conseguente rigetto anticorpo-mediato non HLA (22) (24).

- **Anticorpi anti-AT1R:** emergono tra gli anticorpi non-HLA maggiormente studiati, poiché rappresentano un esempio significativo di anticorpi non-HLA ad attività patogenetica. Questi, possono comportarsi come agonisti funzionali del recettore AT1R, attivandolo, a differenza della maggior parte degli anticorpi che si limita a legare il proprio antigene bersaglio. Questa attivazione favorisce lo sviluppo di diversi eventi tra cui: la deposizione del complemento, un aumento nell'espressione di molecole proinfiammatorie, il reclutamento delle cellule immunitarie e danno del microcircolo del fegato trapiantato. Nel contesto del trapianto epatico, infatti, elevati livelli di questi anticorpi sono stati correlati a forme di rigetto moderato o severo mediato dai linfociti T, le quali sembrano aumentare progressivamente con la concentrazione sierica degli anticorpi, suggerendo l'esistenza di una relazione dose-risposta (23).
- **Anticorpi anti-ETAR:** questi vengono spesso rilevati in associazione agli anticorpi anti-AT1R, con i quali condividono molti effetti biologici, tra cui infiammazione microvascolare

e ridotta sopravvivenza dell'organo trapiantato. Per questo motivo, risulta difficile distinguere il contributo patogenetico indipendente di ETAR. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che la presenza di DSA anti-HLA, associata alla presenza di anticorpi anti-AT1R o anti-ETAR aumenta significativamente la probabilità di sviluppare forme severe o moderate di rigetto (23) (24).

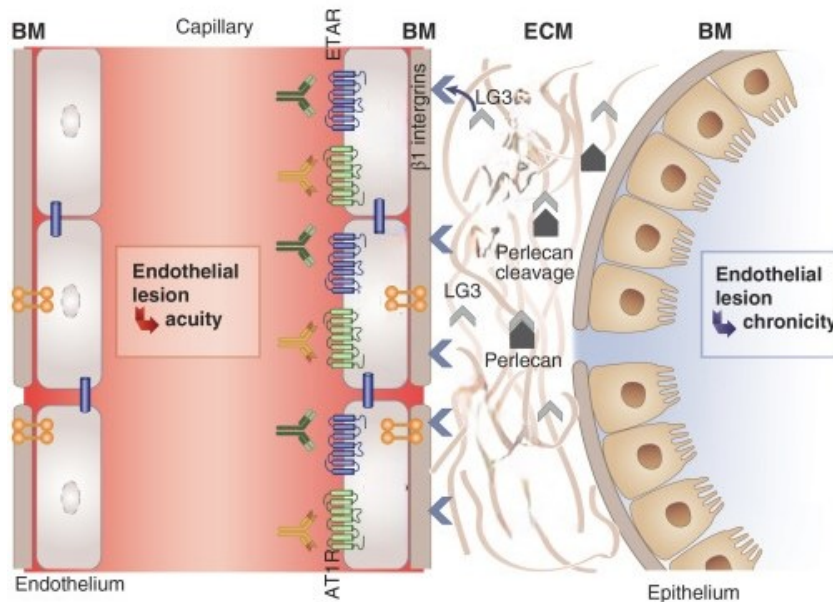


Figura 10- Anticorpi anti-AECA

4.3. Altri anticorpi non-HLA associati al trapianto di fegato

Oltre agli antigeni espressi dalle cellule endoteliali, numerosi studi hanno identificato ulteriori antigeni non-HLA coinvolti nella risposta immunitaria del trapianto di fegato. Tra questi troviamo antigeni derivanti dalle componenti della membrana basale e dalla matrice extracellulare come il frammento **LG3** (dominio globulare del perlecan) che viene rilasciato in vescicole extracellulari dalle cellule endoteliali quando vanno incontro ad apoptosi. Diversi esperimenti hanno dimostrato che queste vescicole possono stimolare la produzione di autoanticorpi specifici che, in associazione con DSA anti-HLA e anticorpi anti-AT1R sembra essere correlata a una ridotta sopravvivenza del fegato trapiantato (23) (24).

Oltre agli antigeni di membrana, anche numerosi antigeni intracellulari sono stati identificati come possibili bersagli della risposta anticorpale. Tra questi assumono particolare importanza: l'enzima **GSTT1**, implicato nei processi di detossificazione cellulare, **ARHGDIB**, coinvolto nell'organizzazione del citoscheletro delle cellule stellate epatiche, la proteina **SNRPB**, coinvolta nella maturazione dell'RNA, l'**actina**, una delle principali proteine strutturali nel citoscheletro e l' α

enolasi, un enzima citoplasmatico noto per il suo coinvolgimento in diverse malattie autoimmuni. Questi, in seguito a condizioni di infiammazione cronica o a danno cellulare, possono essere esposti al sistema immunitario, che induce una risposta anticorpale diretta contro questi antigeni che può favorire la progressione del danno tissutale e la perdita del fegato trapiantato. I geni che codificano per GSTT1 e ARHGDIB sono altamente polimorfici per cui le differenze genetiche tra donatore e ricevente possono favorire lo sviluppo di anticorpi determinando una risposta alloimmune non-HLA contro gli antigeni del donatore, evidenziata sia in pazienti pediatriche che adulti. Tali anticorpi, inoltre, soprattutto quelli anti-GSTT1 risultano essere spesso associati a perivenulite centrale, un'infiammazione che si sviluppa attorno alle vene centrali del fegato, coinvolgendo anche le strutture vascolari del fegato trapiantato. La presenza di anticorpi diretti contro GSTT1, SNRPB e actina, in uno studio recente (27), ha evidenziato un'associazione tra la loro presenza e lo sviluppo di rigetto mediato da linfociti T. Questa stessa associazione è stata successivamente confermata in una coorte di pazienti adulti, ma solo per gli anticorpi anti-SNRPB e anti-GSTT1, escludendo quelli anti-actina. Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che gli anticorpi anti-actina sono spesso associati all'epatite autoimmune, una malattia che colpisce soprattutto bambini o giovani adulti. Infine, la presenza di anticorpi anti- α **enolasi**, enzima coinvolto in numerose malattie autoimmuni, associata allo sviluppo di forme moderate o severe di rigetto mediato da anticorpi, suggerisce l'esistenza di meccanismi condivisi tra autoimmunità e alloimmunità, sebbene il suo ruolo patogenetico non sia ancora stato completamente chiarito (22) (23).

Per diversi anni, la scoperta dei DSA (Donor-Specific Antibodies) diretti contro gli antigeni del donatore, ha contribuito alla visione secondo cui il sistema HLA sia il principale, se non l'unico, responsabile dei fenomeni di rigetto del trapianto. Tuttavia, l'osservazione di fenomeni di rigetto anche in assenza di DSA rilevabili e in condizioni di elevata compatibilità HLA, hanno modificato questa visione tradizionale, spostando l'attenzione sugli antigeni non-HLA e relative risposte anticorpali. Nel trapianto di fegato, in particolare, le evidenze riportate in precedenza, sottolineano l'importanza degli anticorpi non-HLA, che svolgono un ruolo determinante nella patogenesi del rigetto, estendendo il concetto di alloimmunità non solo agli antigeni HLA (24).

5. La valutazione immunologica del paziente

La valutazione immunologica pre-trapianto di fegato è una fase cruciale del percorso per l'inserimento in lista d'attesa. Lo scopo di questo processo è monitorare la condizione del sistema immunitario del paziente e valutare la compatibilità tra donatore e ricevente. Si articola in diverse fasi:

1. **Determinazione del gruppo sanguigno AB0:** gli antigeni AB0 sono residui di carboidrati espressi dalle cellule endoteliali e dagli epatociti del parenchima epatico. Possono rappresentare un bersaglio degli anticorpi naturali anti-AB0 del ricevente. L'incompatibilità tra gruppi sanguigni è associata a rigetto umorale iperacuto. Tuttavia, negli ultimi anni, i progressi nelle terapie immunosoppressive e di desensibilizzazione, hanno reso possibile, in casi isolati, l'esecuzione di trapianti di fegato anche in condizioni di incompatibilità AB0. Numerosi studi hanno però dimostrato che il trapianto AB0 compatibile rimane associato a un rischio immunologico di molto inferiore rispetto a quello incompatibile, che deve essere riservato a situazioni particolari, quando il beneficio atteso supera il rischio immunologico associato (15) (19).
2. **Tipizzazione HLA:** i candidati al trapianto di fegato possono essere sottoposti a tipizzazione HLA, per determinare gli antigeni HLA di classe I e II nei principali loci sulla superficie cellulare. Per il fegato, tuttavia, a differenza di quanto osservato in altri organi solidi, la presenza di mismatch HLA è considerata storicamente meno rilevante, grazie alla sua maggiore capacità di tollerare incompatibilità immunologiche. Diversi studi, in particolare, hanno dimostrato che anche in presenza di numerosi mismatch HLA, numerosi pazienti non sviluppano complicanze significative nel breve termine. Tuttavia, da analisi più recenti è emerso che alcuni loci e in particolare DQ, hanno un ruolo più rilevante rispetto ad altri, essendo associati più frequentemente allo sviluppo di risposte anticorpali significative (16) (17) (19).
3. **Screening degli anticorpi anti HLA:** permette di valutare la presenza di anticorpi anti-HLA preformati (DSA) e monitorare la comparsa di anticorpi de novo post trapianto. Anche in questo caso, studi recenti hanno dimostrato che, a differenza di quanto avviene ad esempio nel trapianto di rene, la presenza di DSA pre-trapianto non è associata in modo costante né al rigetto né a un peggioramento delle condizioni cliniche del paziente, ma anzi, nella maggior parte dei casi tali anticorpi tendono a scomparire post trapianto rafforzando l'ipotesi che vede nel fegato la capacità di neutralizzare gli anticorpi circolanti (20). Diversa è la questione per gli anticorpi de novo che, nonostante si siano sviluppati in una percentuale ristretta di pazienti, dal punto di vista prognostico, si sono dimostrati più impattanti. A differenza degli anticorpi diretti contro gli antigeni di classe I che tendono a scomparire nel tempo, quelli diretti contro la classe II, in particolare HLA-DQ, persistono nel tempo. È ipotizzabile che le molecole MHC di classe I secrete o liberate dal fegato trapiantato abbiano un effetto tollerogenico. Al

contrario, l'overespressione di antigeni MHC di classe II da parte dell'epitelio biliare e delle cellule endoteliali in risposta al danno immunologico, può favorire l'attivazione delle cellule T reattive piuttosto che indurre tolleranza nei confronti dell'organo trapiantato. Lo screening degli anticorpi viene eseguito sui campioni di siero al primo ingresso in lista, mediante tecnica citofluorimetrica in fase solida (Bead Array Technique Luminex). L'analisi garantisce un'accurata caratterizzazione e valutazione degli anticorpi anti-HLA, limitando così il rischio immunologico (16) (17) (19). Un indicatore molto importante del grado di sensibilizzazione del paziente è rappresentato dal PRA (Panel Reactive Antibodies) che rappresenta, dal punto di vista clinico, la percentuale dei potenziali donatori verso cui il ricevente presenta anticorpi anti-HLA. Maggiore è il valore del PRA, maggiore sarà la sensibilizzazione del paziente e di conseguenza, sarà minore la probabilità di trovare un donatore compatibile (19).

4. **Crossmatching:** è una tecnica in vitro, eseguita in genere prima del trapianto, che consente di verificare direttamente se nel siero di un potenziale ricevente sono presenti anticorpi preformati, anti-HLA noti dallo screening eseguito in preparazione al trapianto o non anti HLA non noti, diretti contro il donatore. In particolare, vengono fatti reagire il siero del paziente ed i linfociti B e T del donatore ottenute dal linfonodo o dal sangue periferico. Le principali tecniche utilizzate per eseguire il crossmatch sono la citotossicità complemento dipendente (CDC-XM) e la citofluorimetria (FC-XM):

- **CDC-XM:** test cellulare in cui vengono incubati in micropiastre i linfociti del donatore (T e B) con il siero del ricevente, seguito dall'aggiunta del complemento e di un colorante vitale, che consente di verificare la presenza di eventuali anticorpi DSA, che innescheranno citotossicità cellulare e morte dei linfociti. Un risultato di crossmatch CDC positivo indica la presenza di anticorpi nel siero del ricevente che, legandosi ai linfociti del donatore, attivano il complemento, provocandone la lisi. Storicamente può prevedere il rigetto iperacuto mediato da anticorpi, tuttavia, presenta una sensibilità ridotta, poiché in grado di rilevare solamente anticorpi ad alto titolo, ed una bassa specificità, in quanto potrebbe dare risultati falsamente positivi, anche per anticorpi non anti-HLA.

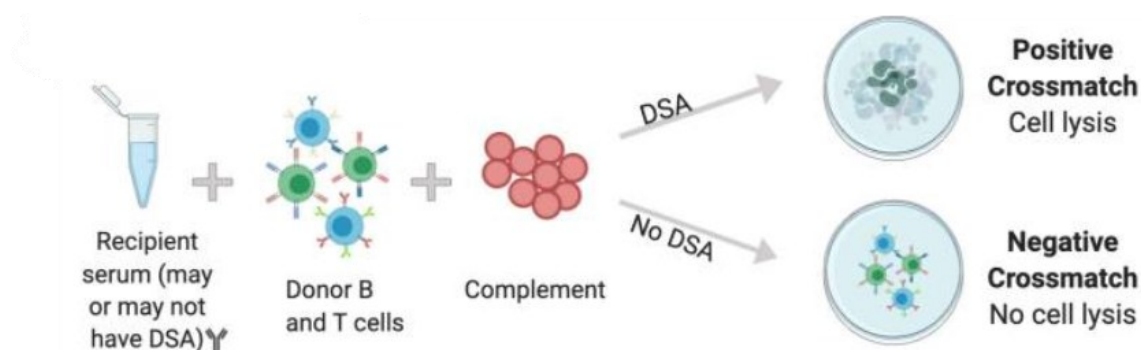


Figura 11- CDC Crossmatch

- FC-XM:** in questo caso, l'incubazione dei linfociti T e B del donatore con il siero del ricevente, è seguita dall'aggiunta di anticorpi anti-IgG marcati con un fluorocromo, la fluoresceina, che si legano agli anticorpi presenti sulla superficie delle cellule, se presenti. La positività del test viene valutata utilizzando tecniche di citometria a flusso, attraverso la fluorescenza emessa dell'anticorpo secondario ed è definita dal superamento di una soglia prestabilita espressa come MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome). Questa metodica è molto più sensibile rispetto al crossmatch CDC poiché consente di identificare, non solo gli anticorpi citotossici donatore specifici (DSA) ad alto titolo, ma tutti quelli presenti anche non in grado di attivare il complemento (31).

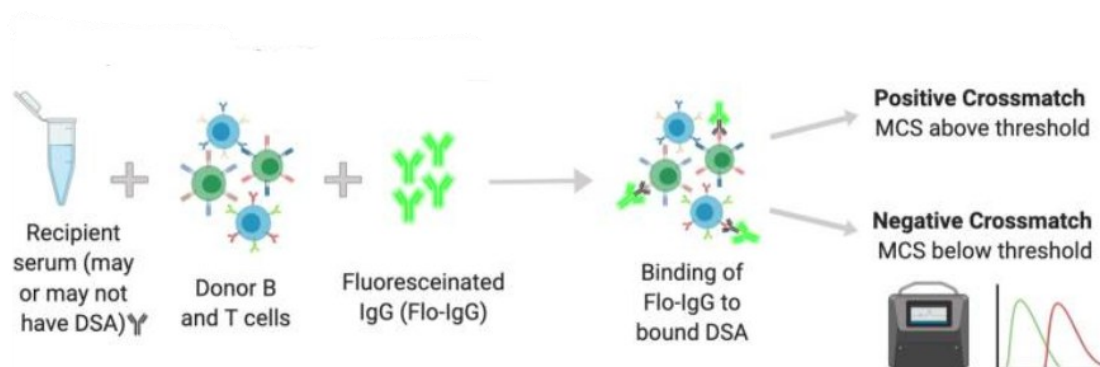


Figura 12-FC Crossmatch

Nell'ambito della valutazione immunologica del paziente pre-trapianto, diversi studi, hanno contribuito a rivisitare il rischio immunologico associato al trapianto di fegato, ridefinendo il significato clinico degli anticorpi diretti contro il donatore. Uno studio, in particolare, nel 2019 ha riportato osservazioni frequentemente riscontrate in pratica clinica: in presenza di candidati a trapianto di fegato con DSA nei confronti del donatore, anche con valori di MFI molto elevati e quindi associati probabilmente a un crossmatch positivo, si osserva una rapida scomparsa degli anticorpi anti-HLA nel primissimo periodo post-trapianto, seguita da una successiva stabilizzazione del follow

up immunologico. Questo fenomeno risulta più marcato per gli anticorpi di classe I rispetto a quelli di classe II; in particolare, gli anticorpi rivolti contro HLA-DR7 mostrano inizialmente una riduzione progressiva, mantenendosi positivi per un periodo e riducendosi ulteriormente nel tempo (Fig.13)

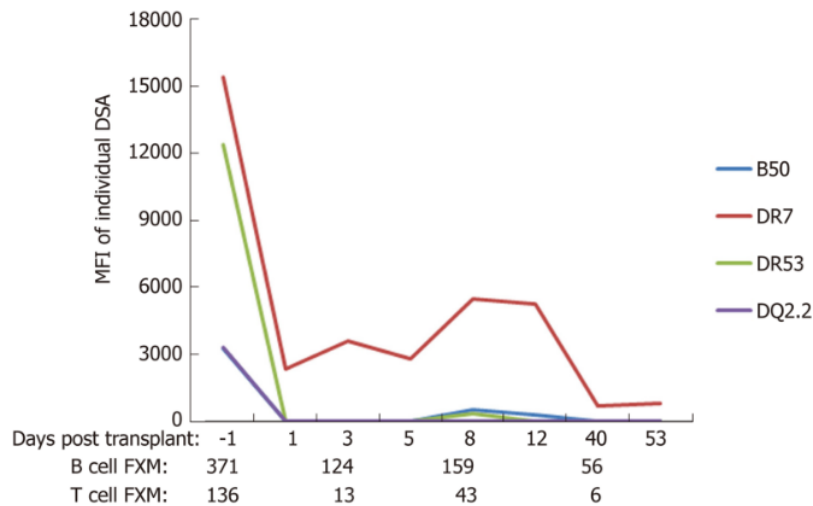


Figura 13- Andamento dei DSA (MFI) e del crossmatch post trapianto (FC-XM)

Tali studi, sottolineano che, nel trapianto di fegato, l'importanza della presenza di DSA possa avere nella maggior parte dei casi una rilevanza marginale. Diversamente, nel follow-up post trapianto, l'elemento più impattante risulta la comparsa di anticorpi DSA de novo. In questo caso è stata evidenziata un'associazione con un aumentato rischio immunologico associato all'HLA, soprattutto se gli anticorpi de novo appartengono alla classe II. Questo stesso lavoro, inoltre, evidenzia la capacità immunomodulante del fegato anche nei trapianti combinati (fegato e altri organi), andando a sottrarre in qualche modo anche anticorpi ad elevato MFI. Questo fenomeno è particolarmente evidente per gli anticorpi di classe I, in quanto nel fegato, oltre a generare un effetto immunomodulante, sono espressi in quantità più elevate antigeni di classe I secreti rispetto ad altri organi. Questi antigeni, non sono quindi adesi all'epatocita ma vengono secreti nel microambiente e possono legare gli anticorpi DSA, sottraendoli dalla circolazione e eliminandoli senza causare un effettivo danno tissutale (32). Queste evidenze hanno contribuito a rivalutare l'approccio alla valutazione immunologica del paziente nel contesto del trapianto epatico, ridefinendo il significato dei DSA nella stratificazione del rischio immunologico e favorendo l'introduzione del crossmatch virtuale.

6.Virtual crossmatch (V-XM)

Sebbene storicamente la valutazione immunologica del paziente pre-trapianto si sia basata principalmente sull'esecuzione del crossmatch in citotossicità e in citofluorimetria, tali metodiche presentano anche alcune importanti difficoltà logistiche, che possono causare un prolungamento dei tempi di ischemia fredda con possibili effetti dannosi sulla ripresa funzionale dell'organo e sull'esito a lungo termine del trapianto. Bisogna considerare, inoltre, il rischio di esiti falsamente positivi, che comporterebbero un'erronea esclusione di trapianti che in realtà sono caratterizzati da un rischio immunologico standard in modo particolare per quanto riguarda il trapianto di fegato il cui esito, come spiegato sopra, è meno influenzato rispetto a quello di altri organi dalla presenza di eventuali anticorpi anti HLA donatore specifici. Negli ultimi anni, soprattutto in seguito da un alto alla disponibilità di test che permettono di definire con sempre maggiore precisione il profilo anticorpale anti HLA dei pazienti in lista di attesa e dall'altro alla possibilità di eseguire in tempi rapidi la tipizzazione del donatore a tutti i loci HLA, è stato dimostrato che è possibile ottenere risultati sovrapponibili al crossmatch reale prospettico eseguendo un crossmatch cosiddetto "virtuale" (V-XM). In questo caso, la compatibilità tra donatore e ricevente viene valutata in maniera "virtuale" appunto, analizzando la possibile interazione tra gli anticorpi anti HLA presenti nel siero del ricevente e gli antigeni HLA espressi sull'organo proposto. Prima di procedere con il trapianto, dunque, saranno indispensabili sia il profilo anticorpale del ricevente, sia la tipizzazione HLA del donatore, che ci permetterà di definire se tali anticorpi siano rivolti contro gli antigeni del donatore; tali anticorpi donatore specifici, DSA appunto, sono ovviamente quelli su cui va posta particolare attenzione. L'impiego del crossmatch virtuale si è progressivamente affermato nella pratica clinica, prima in Nord America e nel Regno Unito, rendendo possibile una riduzione dei tempi di ischemia fredda e dell'incidenza di *delayed graft function*, senza evidenziare un aumento di rischio di rigetto acuto né compromettere la sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato (21).

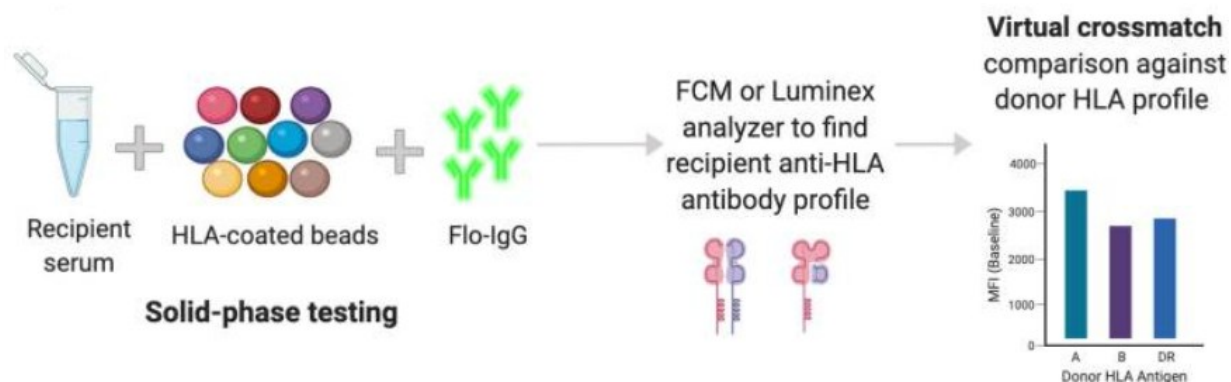


Figura 14-Virtual Crossmatch

A partire da dicembre 2025, nel trapianto di fegato, è stato introdotto l'uso del crossmatch virtuale come principale strumento di valutazione immunologica nel paziente adulto. La presenza di anticorpi specifici contro il donatore (DSA), a differenza di quanto avviene in altri trapianti di organi solidi, non rappresenta una controindicazione assoluta al trapianto epatico, grazie alla particolare tolleranza immunologica del fegato. Il rischio immunologico, dunque, viene stratificato sulla base del valore massimo di MFI (intensità media di fluorescenza) dei DSA, in particolare:

- Valori inferiori a 5000 sono associati a un rischio lievemente aumentato
- Valori compresi tra 5000 e 10000 sono considerati indicativi di rischio aumentato, con minore rilevanza ai DSA rivolti contro il locus C
- Valori massimi superiori a 10000 sono correlati a rischio elevato, ulteriormente rafforzato da un eventuale CDC positivo.
- In assenza di anticorpi DSA, il crossmatch CDC non viene eseguito e il crossmatch virtuale risulta negativo, in questo caso il rischio immunologico viene definito standard
- Se il siero del paziente è più vecchio di un anno o non è stato ancora studiato, il CDC crossmatch non viene eseguito e il crossmatch virtuale non viene ritenuto valutabile. In questo caso è necessario verificare se il paziente ha avuto eventi immunizzanti nell'ultimo anno e successivamente chiedere l'invio di un siero basale al momento del trapianto, sul quale sarà eseguito e refertato lo screening anticorpale in Luminex. La valutazione, dunque, sarà retrospettiva e il rischio immunologico non è considerato valutabile perché non si può escludere eventualmente la presenza di DSA.
- Il crossmatch reale CDC non viene più eseguito se non in casi particolari su espressa richiesta del clinico. In presenza di DSA e di un eventuale crossmatch positivo, il rischio immunologico diventa sempre elevato.

In presenza di DSA multipli o diretti contro antigeni HLA di classe I e II, questa stratificazione assume una maggior rilevanza e deve essere chiaramente riportata al clinico. In questi casi, il crossmatch in citotossicità complemento dipendente (CDC) non viene eseguito di routine, ma solo su richiesta del centro trapianti, mentre la valutazione finale sul rapporto rischio/beneficio rimane di competenza del clinico, che conosce la condizione clinica complessiva del paziente. La valutazione finale deve anche tenere in considerazione il fatto che il trapianto di fegato ha sempre carattere di trapianto salvavita, pertanto la valutazione rischio/beneficio deve considerare le conseguenze cliniche sul paziente della scelta trapianto/non trapianto (ossia attendendo un altro donatore che non è garantito arrivi nei tempi utili per il paziente); inoltre, in ragione della scarsità degli organi utili in rapporto al numero dei pazienti che ne beneficerebbero, la scelta dovrebbe sempre anche tenere in considerazione il buon

utilizzo della risorsa organo, trapiantando il paziente che in quel momento trarrebbe il maggior beneficio dal trapianto stesso.

In un sistema così complesso e per un organo in cui, come scritto sopra, l'aspetto immunologico legato all'HLA può avere un ruolo spesso marginale ed in relazione allo status clinico del paziente, è giustificata la scelta di andare a trapianto anche in presenza di DSA ed a crossmatch positivo, cosa impensabile con altri organi.

Per i pazienti pediatrici, l'approccio è più prudente e la valutazione del rischio immunologico si basa sull'interpretazione combinata del CDC crossmatch e del crossmatch virtuale, tenendo sempre conto della presenza di eventuali DSA.

- Nel caso in cui il siero sia più vecchio di un anno o il paziente non sia stato ancora studiato, il crossmatch virtuale viene considerato non valutabile. In queste condizioni, come per i pazienti adulti, è necessario valutare la presenza di eventi immunizzanti recenti e richiedere l'invio di un siero fresco, sul quale eseguire un CDC crossmatch su linfociti T e B, seguito dallo screening anticorpale in Luminex retrospettivo. Qualora il crossmatch risultasse positivo, il trapianto è sconsigliato mentre, in caso sia negativo, il rischio immunologico rimane non valutabile, perché non è possibile escludere la presenza di eventuali DSA.
- In assenza di DSA, il crossmatch virtuale risulta negativo. Il CDC crossmatch viene eseguito sui linfociti T: se risulta negativo, il rischio immunologico viene definito standard, mentre se risulta positivo, è necessario ripetere il test trattando il siero con DTT per eliminare l'eventuale effetto mascherante dovuto alla presenza di anticorpi di classe IgM, influenti ai fini del trapianto. Confermata la positività, trattandosi di un risultato inatteso, deve essere comunicato al centro trapianti e al laboratorio. In questo caso il rischio immunologico non è valutabile a causa dell'incongruenza del dato.

Nel caso di presenza di eventuali DSA diretti contro qualsiasi locus, il crossmatch virtuale può essere considerato non valutabile oppure positivo sulla base del valore dell'MFI dei DSA, mentre il CDC crossmatch viene eseguito su linfociti T e B.

L'interpretazione varia sulla base dei risultati ottenuti combinati:

- Se il crossmatch risulta negativo sia per i linfociti B che T (T neg / B neg), il rischio immunologico viene considerato lievemente aumentato e se si decide di andare a trapianto è consigliato un monitoraggio immunologico post-trapianto, che diventa necessario se il crossmatch risulta negativo per i linfociti T e positivo per i B (T neg / B pos), una situazione di rischio aumentato.

- Se il crossmatch è positivo per entrambe le popolazioni di linfociti T, (T pos / B pos), il trapianto è controindicato dal punto di vista immunologico e si procede solo in situazioni di emergenza. È necessario valutare il valore dell'MFI degli anticorpi DSA e condividere con il clinico l'alto rischio di rigetto. Qualora comunque si decidesse di procedere con il trapianto, è consigliato uno stretto monitoraggio del paziente post-trapianto.

7. Il laboratorio di Immunologia dei trapianti del Policlinico di Milano

Il laboratorio di Immunologia dei Trapianti della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico rappresenta la sede del centro regionale di riferimento (CRR) della regione Lombardia dedicata all'organizzazione e all'immunologia del trapianto d'organi. A partire dal 1976, le regioni Liguria, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, provincia autonoma di Trento e Marche sono entrate a far parte del Nord Italia Transplant program (NITp), che gestisce le attività di donazione e trapianto di organi, favorendo una stretta collaborazione tra i vari centri trapianto. Attualmente il NITp coordina una rete di circa 20 milioni di abitanti, costituita da 129 unità di terapia intensiva, tra cui 80 attive nella segnalazione dei potenziali donatori d'organi e 35 unità di trapianto, comprendenti 14 centri per il trapianto di rene, 9 per il fegato, 6 per il cuore e 4 per i polmoni. Il Policlinico di Milano svolge un ruolo fondamentale all'interno di questa rete, coordinando le attività di donazione e supporto immunologico ai programmi di trapianto, assicurando una corretta allocazione degli organi, prevenendo il rischio di rigetto (28). Il processo di donazione e trapianto è in attività continua, per cui la centrale operativa del CRR NITp è attiva 24 ore su 24, 7 giorni su 7 (30). Il centro trapianti Lombardia-NITp del Policlinico di Milano è organizzato in quattro aree funzionali:

1. Segreteria Organizzativa, che si occupa delle attività amministrative e di supporto.
2. Centrale Operativa di Coordinamento, nella quale lavorano medici e infermieri, coadiuvati da biologi, riceve le segnalazioni e valuta l'idoneità dei potenziali donatori, coordina la logistica dei trasporti degli organi e ne gestisce l'allocazione secondo i protocolli in uso, nazionali e NITp. Ospita inoltre il servizio di Psicologica per dare assistenza a famiglie e supporto agli operatori.
3. Gestione Analisi e Dati, per la raccolta e la successiva elaborazione dei dati relativi al trapianto.

4. Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, in cui lavorano biologi e tecnici di laboratorio, che si occupa della valutazione e compatibilità immunologica nei trapianti di organi, tessuti e cellule per la Regione Lombardia e, qualora previsto dalle convenzioni in vigore, per le altre regioni appartenenti al NITp.

7.1. Attività svolte dal Laboratorio di Immunologia dei Trapianti

Il laboratorio di immunologia dei trapianti svolge numerose attività a supporto delle procedure di trapianto di organi, cellule e tessuti. Le principali comprendono:

- Tipizzazione tissutale HLA e ricerca di anticorpi anti-HLA, eseguite sia in modo programmato sia in urgenza, con operatività 365 giorni l'anno, 24 ore su 24, per pazienti in lista d'attesa, pazienti trapiantati, donatori e riceventi di trapianto da donatore vivente, donatori volontari di cellule staminali emopoietiche, iscritti al registro nazionale donatori IBMDR e relativi familiari, pazienti sottoposti a trapianto di sangue cordonale e pazienti con richiesta di specifiche malattie.
- Prova di compatibilità (crossmatch) programmata oppure urgente per trapianti da donatore deceduto o da donatore vivente e svolge il monitoraggio degli anticorpi anti HLA, il follow-up immunologico dei pazienti post trapianto di organi solidi e il monitoraggio del microchimerismo dopo il trapianto.
- Tra le attività di laboratorio rientrano anche la gestione della lista d'attesa per tutti i pazienti che devono sottoporsi a trapianto di organi solidi nell'area NITp, la gestione del Registro Nazionale dei donatori di cellule staminali emopoietiche e infine la gestione dell'archivio biologico, costituito da circa 100000 campioni di buffy coat e DNA e 36000 campioni di siero, necessari alle attività di diagnostica e di trapianto.

Il laboratorio è accreditato secondo gli standard della European Federation for Immunogenetics (EFI), garantito grazie alla qualità e all'affidabilità delle attività diagnostiche svolte. Il mantenimento dell'accreditamento EFI richiede, periodicamente, una verifica degli standard previsti garantito annualmente dalla spedizione della documentazione relativa alle attività svolte e alle competenze del personale, mentre ogni tre anni è prevista una visita ispettiva con lo scopo di verificare e valutare l'organizzazione delle attività, dei laboratori, attrezzature, formazione qualificazione del personale (28).

2. SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni, numerose evidenze scientifiche hanno portato ad una progressiva rivisitazione del rischio immunologico associato al trapianto di fegato. Tali studi evidenziano come, l'eventuale presenza di anticorpi preformati anti HLA diretti contro il donatore (DSA), anche se associati a elevati livelli di MFI, non sia associata necessariamente ad un aumentato rischio di rigetto. Il fegato, infatti, possiede particolari proprietà immunomodulanti che sembrano svolgere un ruolo nella rapida riduzione dei DSA nel periodo immediatamente successivo al trapianto. Questo ha permesso di ridimensionare il valore predittivo del crossmatch tradizionale ed ha favorito l'introduzione del crossmatch virtuale. Inoltre, è emerso il ruolo di possibili altri fattori coinvolti nella risposta immunitaria, tra cui gli anticorpi non-HLA, il cui possibile coinvolgimento negli episodi di rigetto è oggi argomento di crescente attenzione.

Sulla base di queste premesse, il nostro lavoro si propone di analizzare in maniera retrospettiva i trapianti di fegato eseguiti in area NITp tra gennaio 2019 e dicembre 2025, per correlare il risultato dei CDC cross match eseguiti e l'eventuale presenza di DSA preformati agli episodi di rigetto nel breve termine e di conseguenza confermare o confutare con una casistica NITp la revisione della policy di cross match nel trapianto di fegato ed il conseguente inserimento del cross match virtuale esclusivo eseguita ad ottobre 2025 sulla base della letteratura internazionale, rivalutando quindi il ruolo del crossmatch reale nella pratica clinica del laboratorio riferimento dell'area NITp.

Lo scopo è quello di favorire una comprensione più ampia dei meccanismi immunologici alla base del rigetto nel trapianto di fegato, evidenziando il ruolo sempre più marginale della presenza di DSA preformati, suggerendo che tale processo sia il risultato di un'interazione tra diversi fattori immunologici, compreso il potenziale contributo degli anticorpi non-HLA.

In questo contesto, considerando la limitata rilevanza predittiva del crossmatch tradizionale nel trapianto epatico riportata in letteratura, il nostro lavoro intende fornire ulteriori evidenze a supporto dell'impiego del crossmatch virtuale come strumento di valutazione pre-trapianto anche presso il laboratorio del NITp che invece ha sempre eseguito il cross match reale pretrapianto prospettico con metodica CDC.

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Trapianti e raccolta dati

Sono stati inclusi nello studio i trapianti di fegato eseguiti, nel periodo compreso tra gennaio 2019 e dicembre 2025, presso i centri trapianto afferenti in area NITp: Ospedale Riuniti di Ancona, Ospedale Riuniti di Bergamo, Ospedale Policlinico San Martino di Genova, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, Azienda Ospedale-Università di Padova, Ospedale Santa Maria della Misericordia di Udine e Ospedale Borgo Trento di Verona. Per ciascun trapianto sono stati estratti e raccolti mediante gestionale TRAPNET, i dati relativi al valore massimo di PRA per la classe I e la classe II degli antigeni HLA, l'eventuale presenza di anticorpi donatore-specifici e se possibile, l'eventuale comparsa di DSA de novo nel follow-up post trapianto. La valutazione immunologica pre-trapianto è stata eseguita presso il laboratorio di Immunologia dei trapianti della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

3.2. Ricerca Di Anticorpi Con Metodologia Luminex (Bead Array Technique)

3.2.1. LUMINEX® FLEXMAP™ 3D

Il Luminex® FLEXMAP™ 3D è un citofluorimetro in grado di acquisire campioni allestiti in piastre da 96 pozzetti. È dotato di due laser che gli permettono di identificare contemporaneamente la microsfera analizzata e l'intensità della fluorescenza emessa dal fluorocromo:



- Un laser di classificazione rosso, con una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 635 nm ed emissione a 675 nm e >712 nm.
- Un laser reporter verde, con lunghezza d'onda di eccitazione pari a 532 nm ed emissione a 575 nm $\pm$ 12nm.

Figura 15- Sistema di rilevazione Luminex

La lettura dei test LABScreen® viene effettuata mediante lo strumento Luminex® FLEXMAP™ 3D, utilizzato per la ricerca e caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA.



Figura 16-Luminex® FLEXMAP™ 3D

Lo strumento utilizza microsfere fluorescenti (xMAP®) di polistirene, ciascuna caratterizzata da una specifica miscela di coloranti fluorescenti. Ogni popolazione di microsfere è rivestita con antigeni HLA purificati di classe I o II e può rappresentare un bersaglio specifico per gli anticorpi presenti nel siero del paziente. La tecnologia Luminex xMAP® combina componenti chiave di rilevamento xMAP®, come le microsfere xMAP® a principi di citometria a flusso permettendo l'analisi di numerose specificità anticorpali in una sola reazione contemporaneamente.

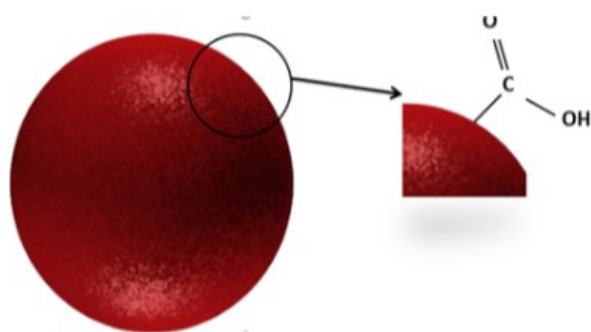


Figure 17 e 18- Funzionamento microsfere xMAP® di polistirene carbossilato.

La tecnologia Luminex xMAP® consente di identificare contemporaneamente diverse popolazioni di microsfere e fluorescenza emessa dall'anticorpo secondario. Durante l'analisi, un sistema fluidico allinea le microsfere in fila indiana così da essere intercettate singolarmente dal sistema ottico dello strumento. Il laser rosso eccita i coloranti all'interno delle microsfere per determinare gli antigeni

HLA di classe I e II presenti sulla superficie attraverso la loro fluorescenza intrinseca, quello verde eccita la ficoeritina legata all'anticorpo secondario, misurando l'intensità del segnale emesso.

I Kit LABScreen® One Lambda applicano la tecnologia Luminex per la ricerca degli anticorpi anti-HLA di classe I e classe II. L'analisi dei sieri viene eseguita utilizzando microsferes fluorescenti rivestite con antigeni HLA purificati. Nella fase di incubazione, il siero viene messo a contatto con le microsferes e di conseguenza eventuali anticorpi anti-HLA presenti si legano agli antigeni corrispondenti sulle microsferes. Successivamente, viene aggiunto un anticorpo secondario anti-IgG umano marcato con R- Ficoeritina per la rilevazione degli anticorpi. I prodotti non legati vengono rimossi mediante lavaggi per centrifugazione e il segnale fluorescente emesso viene rilevato dal sistema ® FLEXMAP™ 3D. In ciascuna seduta di lavoro, viene incluso anche un siero di controllo negativo per stabilire il background di fluorescenza e determinarne i valori di positività o negatività.

3.2.2. Metodica

Esistono diversi kit per diverse valutazioni:

- LABScreen Mixed, impiegato per la ricerca di anticorpi anti-HLA IgG o IgM di classe I o/e II.
- LABScreen PRA1 e LABScreen PRA2, per la determinazione della percentuale di PRA e per una prima definizione della specificità anticorpale.
- LABScreen Single Antigen (SA) Classe I e Classe II, per individuare le specificità anticorpali e per il calcolo del PRA.
- LABScreen Single Antigen C1q, utilizzato in casi selezionati per identificare anticorpi anti-HLA che fissano il complemento.

L'interpretazione dei risultati è supportata dal software di analisi HLA Fusion™ 4.2.

La metodica manuale è eseguita secondo il seguente protocollo:

1. Preparazione del foglio di lavoro (FDL) nel gestionale Trapnet, inserendo il codice dell'esame da eseguire. In ogni sessione di lavoro inserire nel primo pozzetto del FDL un controllo negativo K.
2. Mettere per qualche minuto una boccetta di wash buffer 10X in stufa per sciogliere eventuali cristalli presenti sul fondo e diluire in acqua distillata fino ad ottenere una concentrazione 1X. In una bottiglia da 500 ml di acqua distillata, eliminare 50 ml di acqua e aggiungere 50 ml di WB. Conservare a 4 °C.
3. Centrifugare tutti i sieri e seminare 20 µl di siero in ogni pozzetto della piastra blue a 96 pozzetti.

4. Aggiungere 5 µl di biglie per LSM e PRA e 10 µl di biglie SA1 explex e SA2 explex precedentemente diluite in 120 µl di Sheat Fluid.
5. Sigillare con strisce adesive e vorticare.
6. Incubare per 30 minuti al buio sull'agitatore.
7. Dopo l'incubazione aggiungere 150 µl di soluzione di lavaggio 1X in ogni pozzetto e vorticare.
8. Centrifugare a 2800 rpm per 5 min.
9. Rimuovere la soluzione di lavaggio capovolgendo in modo deciso la piastra e asciugare su carta bibula.
10. Aggiungere 200 µl di soluzione di lavaggio e ripetere dal punto 7 per due volte.
11. Aggiungere 100 µl di PE *Anti-Human* IgG o IgM 100X con wash buffer fino ad ottenere una concentrazione 1X: diluire l'anticorpo 100X con soluzione di lavaggio 1X fino ad ottenere una concentrazione 1X.
12. Coprire la piastra con strisce adesive e vorticare.
13. Incubare per 30 minuti al buio sull'agitatore.
14. Centrifugare a 2800 rpm per 5 min.
15. Rimuovere il PE anti-human PE capovolgendo la piastra.
16. Eseguire 2 lavaggi con la soluzione di lavaggio 1X come al punto 10.
17. Risospendere le biglie con 60 µl di PBS 1X.
18. Acquisire gli eventi al citometro entro 24 ore.

3.2.3. Accensione Luminex® FLEXMAP™ 3D

1. Accendere lo strumento premendo l'interruttore sul lato destro dell'apparecchio.
2. Firmare il foglio di manutenzione Luminex (M.188-580) in corrispondenza della dicitura "Accensione" sotto la data del giorno di utilizzo.
3. Accendere il computer ed aprire il software x-PONENT digitando il proprio nome nella casella User Id per effettuare il log In.
4. Verificare che il tappo dello Sheat fluid sia chiuso e quello dello scarto sia allentato. Il "WARMUP" viene avviato automaticamente all'accensione dello strumento e richiede 30 minuti, mentre se il sistema è rimasto inattivo per quattro ore o più, utilizzare il comando "WARMUP".
5. Aprire la pagina *Maintenance* e quindi la scheda *Cmds & Routines*.
6. Selezionare il tipo di piastra utilizzata per fare la verifica i/o la calibrazione dello strumento (*Labscreen plate*).

7. La calibrazione dello strumento viene eseguita ogni settimana ed ogni volta che lo strumento viene spostato, quando si rileva una differenza di temperatura o si problemi di acquisizione dei campioni e ogni volta che si sostituisce lo sheat fluid.
8. Selezionare, dalla finestra “*Routine Name*”, il protocollo CALIBRAZIONE E VERIFICA.
9. Il software assegna la posizione delle biglie di calibrazione/verifica nei pozzetti A1 (F3DCAL1), B1 (F3DeCAL1), C1 (F3DCAL2), D1 (F3DCAL1), A2 (F3DVER1), B2 (F3DeVER1), C2 (F3DVER2), D2(Fluidics1), E2 (Fluidics2) della piastra.
10. Almeno 20 minuti prima dell'utilizzo, togliere le biglie di calibrazione e/o verifica dal frigorifero e sonicarle o vorticarle per almeno 30 secondi. Dispensare tre gocce di ogni biglia di calibrazione/verifica nell'apposita posizione della piastra a 96 pozzetti.
11. Controllare il numero del lotto in uso. Qualora fosse diverso da quello segnalato, inserire il CD presente nella scatola di calibrazione/verifica, entrare nella scheda “LOT Management” da Maintenance e selezionare “*import kit*”. Le informazioni del lotto saranno importate in automatico, ma se non sarà possibile, sarà necessario importare i dati manualmente.
12. Aggiungere al serbatoio esterno alla piastra (Reservoir) l'acqua deionizzata ed etanolo al 70% usando il diagramma del pannello.
13. Selezionare *Eject* per aprire la piattaforma del FLEXMAP 3D ed inserire nello strumento il serbatoio e la piastra.
14. Premere *Run* in basso a destra.
15. Verificare che sulla scheda “*Maintenance*” non venga rilevato nessun errore. Le voci CAL/VER devono essere verdi e la data ed ora devono corrispondere a quelle della calibrazione. L'eventuale presenza di un errore verrà indicata in rosso.
16. Al termine della calibrazione è eseguito in automatico un lavaggio con “sheat fluid”.

3.2.4. Calibrazione e verifica

La verifica viene eseguita tutte le volte che si accende il Luminex Flexmap 3D.

1. Aprire il software “XPONENT” e premere invio.
2. Selezionare la voce “MAINTENANCE”
3. Sul lato a sinistra cliccare su “CMDS E ROUTINE”: si aprirà una finestra a tendina e bisogna selezionare la voce desiderata (verifica/calibrazione Luminex)
4. Dispensare 4 gocce di ogni biglia nelle strip e posizionarle come indicato dal software
5. Seguire le istruzioni date dal software.

3.2.5. *Acquisizione dei campioni*

1. Selezionare *Eject* al centro della barra degli strumenti “system monitor”, e mettere la piastra con i campioni da leggere sulla piattaforma in modo che il pozzetto A1 sia in alto a sinistra.
2. Selezionare *Retract*.
3. Aprire la pagina *Batches* e cliccare sull'icona “*Create a New Batch from an existing protocol*”.
4. Digitare il nome del FDL nel riquadro “*Batch Name*”.
5. Evidenziare il protocollo che si desidera utilizzare nell'elenco “*Select a Protocol*” e fare clic su “*Next*”.
6. Nella scheda “*Plate Layout*”, evidenziare i campioni presenti e selezionare il pozzetto giallo “*Unknown*”.
7. Cintare su “*Import list*” e selezionare “*All files*” (*,*) dalla finestra in basso a destra.
8. Importare il FDL esportato da “TRAPNET” da My Batches ([\\vm-fusion](#))(M:)/File/Liste Luminex 100.
9. Fare clic su “*Run Batch*” per avviare l’acquisizione del batch o fare clic su “*Save*” per salvare le informazioni del batch nell'elenco “*Pending Batch*” da eseguire in un secondo momento.
10. Tutti i campioni verranno letti e salvati automaticamente.
11. Per creare un multibatch aprire la pagina “*Batches*” e cliccare sull'icona “*Create a New Multi-Batch*”.
12. Selezionare il batch in sospeso dalla finestra di dialogo “*Select Pending Batch*”.
13. Una volta selezionato un *batch*, fare clic su OK.
14. Sulla schermata successiva, selezionare la posizione del pozzetto per il *batch* successivo e fare clic su “*Add*”.
15. Una volta creati i *batch*, fare “*Save*” per salvare il *multibatch*, e fare clic su “*Run*” per acquisire i dati.
16. Finita l'acquisizione, cliccare su “*copy my batches*”

3.2.6. *Shut down*

1. Selezionare *Eject* dalla barra degli strumenti e riempire il serbatoio esterno in alto a sinistra con acqua deionizzata, in basso a sinistra con alcool 70%, in alto a destra con NaOH e in basso a destra con ipoclorito di sodio al 20%.
2. Selezionare *Retract* per aprire la piattaforma del “FLEXMAP 3D” e inserire il serbatoio esterno nello strumento.
3. Cliccare su “*Maintenance*” e successivamente su “*Cmds & Routines*”.
4. Selezionare dalla finestra “*Routine Name*” il protocollo “*Stringent Clean*”.

5. Premere *Run* in basso a destra.
6. Spegnerlo lo strumento quando compare la finestra "*Routine Stringent clean completed*".
7. Ricordarsi di firmare il modulo (M 188-580) in corrispondenza della dicitura "*Spegnimento*".

3.2.7 Analisi dei risultati

1. Aprire il programma Fusion 4.2.
2. Cliccare su *Labscreen*.
3. Nella maschera che si apre mettere il flag su "*include imported*".
4. Importare le sessioni di lavoro seguendo il percorso M:/Flexmap 3D.
5. Aggiungere il flag al campione che si vuole considerare come negativo oppure selezionare il controllo negativo Onelambda, cliccare su *import*.
6. Viene presentata l'analisi.
7. Passare al campione successivo cliccando "save".

In generale il risultato di un test di screening LABScreen Mixed è dubbio per valori di ratio compresi tra 2,5 e 3 e positivo per valori di ratio maggiori di 3 e prevede l'inserimento da parte dell'operatore di una richiesta di test aggiuntivo per la definizione dell'eventuale specificità degli anticorpi anti HLA. Tali test aggiuntivi possono essere PRA Classe I e/o II, oppure il test identificativo Single Antigen Classe I e/o II se ratio maggiori di 10.

Nel caso si riscontri una positività nel test PRA è sempre necessario proseguire con il test SA per poter attribuire una specificità e un valore % di PRA.

Con il test del SA, identificativo appunto, si attribuisce una reazione positiva contro l'antigene HLA specifico con MFI maggiore di 1000 e relativo valore % di PRA calcolato sulla popolazione di donatori inseriti nel database Fusion.

3.2.8. Criteri di accettabilità del test

I parametri seguenti devono essere controllati per ogni campione acquisito e se qualcuno di essi non è rispettato, il risultato del test deve essere considerato non attendibile:

- Il numero totale di biglie che sono state analizzate. Tale numero dovrebbe essere superiore a 100. Se le biglie analizzate sono tra 50 e 100 generalmente è possibile concludere il test. Se sono inferiori a 50 il test non è affidabile ed è da ripetere.
- L'intensità di fluorescenza della biglia positiva deve essere maggiore di 1500 per tutti i Kits.
- L'intensità di fluorescenza della biglia negativa non deve essere superiore a 500 per il kit LSM12 e 1500 per i Kit LS1PRA, LS2PRA, SA1 Explex e SA2 Explex.

Un valore superiore potrebbe essere indice di presenza d'impurità nel siero: in questo caso ripetere il test dopo aver trattato il siero con le biglie di assorbimento.

- Il rapporto tra la fluorescenza della biglia positiva e la fluorescenza biglia negativa deve essere maggiore di 2.

3.3. Tipizzazione HLA del donatore di organi mediante Real Time PCR-SSP

La tipizzazione HLA del donatore di organi viene eseguita con metodica Real Time PCR-SSP perché ad oggi è la metodica che consente di ottenere risultati maggiormente affidabili ed ad una risoluzione accettabile nei tempi estremamente brevi che una donazione di organi consente.

Tale metodica viene eseguita mediante Real Time PCR-SSP (Sequence- Specific Primers) e consente la tipizzazione a bassa risoluzione dei loci HLA di classe I e II dei campioni di donatori di organi e tessuti, utilizzando il kit LinkSeq. Questo kit, utilizza la tecnologia Real Time PCR, basata sull'amplificazione del DNA mediante primer a sequenza specifica e sulla successiva quantizzazione del DNA, rilevata mediante la misurazione della fluorescenza emessa dal colorante SYBR Green, che si intercala nella doppia elica del DNA durante la fase di annealing.

La presenza o assenza dei prodotti di amplificazione viene rilevata dallo strumento mediante l'analisi dei dati di fluorescenza in relazione alla temperatura di melting in ciascun pozzetto di reazione, dove sono presenti i primer specifici e una coppia di primer per il controllo interno dell'amplificazione. Le curve di melting ottenute vengono analizzate dal software che identifica i picchi positivi e negativi rispetto ai controlli presenti nella piastra.

3.3.1. Metodica

1. Prendere dal congelatore tampone LS, DNA Polimerasi e piastra LinkSeq in modo che raggiungano la temperatura ambiente.
2. Stampare un set di etichette riportante i dati anagrafici del donatore, su cui non bisogna riportare scritte o segni con penne o pennarelli. Contrassegnare la piastra attaccando l'etichetta per piastre sul lato destro più corto della piastra con il codice campione, cognome e data.
3. Misurare la concentrazione di DNA del campione e calcolare la quantità di DNA da utilizzare per ottenere 3700 ng di DNA nella soluzione finale.
4. Aggiungere al tampone, nello stesso flaconcino, il volume di H₂O calcolato e 92 µL di Taq polimerasi.
5. Miscelare delicatamente per inversione senza mai vortexare.
6. Dispensare 10 µL di soluzione nell'ultimo pozzetto (P24), che servirà da controllo negativo.

7. Aggiungere al tampone la quantità di DNA calcolata e versare il contenuto nella vaschetta monouso, facendo in modo che non si formino bolle d'aria.
8. Dispensare in ogni pozzetto 10 μ L con pipetta a 12 canali automatica dispenser. Aspirare con la pipetta 1600 μ L e dispensare con la prima aspirazione le 12 colonne dispari. Con la seconda aspirazione si dispensano le 12 colonne pari facendo attenzione, arrivati all'ultima riga di pozzetti, di togliere l'ultimo puntale (nell'ultimo pozzetto è già stato dispensato il controllo negativo).
9. Accertarsi che ogni pozzetto contenga la miscela di reazione.
10. Coprire la piastra con il foglio adesivo contenuto nel kit, specifico per la piastra ottica. Aiutarsi con l'applicatore apposito per favorire l'adesione premendo sui bordi e sulla superficie di copertura, evitando di toccare la pellicola con le dita. Rimuovere i margini sporgenti perforati, aiutandosi con l'applicatore.
11. Effettuare uno spin della piastra fino a 2000 g con centrifuga Eppendorf 5430 nel locale PRE- PCR.
12. Togliersi il camice del PRE e passare nella stanza POST-PCR. Mettere la piastra nello strumento QuantStudio 6PRO e far partire il programma di amplificazione e melting dal pc.



Figura 19- Termociclatore QUANTstudio 6pro

3.3.2. Amplificazione e melting su termociclatore Real Time QUANTstudio 6pro

1. Accendere uno dei due termociclatori QUANTStudio 6PRO disponibili in laboratorio, e mediante touchscreen inserire la password e aprire lo sportello in cui sistemare la piastra con la scritta identificativa rivolta verso l'operatore. Accendere il PC ed attivare il programma dal pc.
2. Il processo di amplificazione e melting sarà terminato quando sullo screen del termociclatore comparirà la scritta *COMPLETE-Transfer File* (dura 1 ora e 16 minuti). A questo punto passare a lavorare sul pc.
3. Eseguire l'analisi e al termine, dopo aver stampato il referto, spegnere il pc e i termociclatori.
4. Contrassegnare il referto con l'etichetta riportante nome, cognome e data di nascita.
5. Inserire il risultato della tipizzazione nella determinazione esami in Trapnet.
6. Firmare e consegnare al coordinamento.

3.3.3. Controllo tipizzazione HLA

I risultati di tutte le tipizzazioni vengono validati sia nel programma di gestione TrapNet sia nel sistema Donor Manager CIR.

La documentazione delle tipizzazioni validate viene firmata dal supervisore e archiviata nei rispettivi verbali di segnalazione.

Nel caso in cui si riscontrino:

- risultati dubbi o presenza di ambiguità comuni, la tipizzazione deve essere ripetuta con un'altra metodica
- errori di tipizzazione sia tecnici, che clericali, si modifica l'inserimento errato in trapnet e in Donor manager. Va inoltre segnalato il risultato discrepante sul "Modulo di raccolta delle non conformità" e al responsabile di settore, si verificano eventuali implicazioni sull'assegnazione degli organi e nel caso, si ripete la tipizzazione con un'altra metodica.

Se, a causa dell'errore di tipizzazione, vengono persi eventuali mismatches proibiti, il responsabile del coordinamento viene avvisato e si provvede ad informare il Centro Trapianti del paziente coinvolto nella selezione errata.

Nei casi di discrepanze o errori, lo si segnala nel campo note del donatore di organi sul sistema TrapNet.

3.3.4. Refertazione tipizzazione HLA del donatore

Il referto della tipizzazione HLA deve essere stampato da Trapnet, dalla funzione di stampa veloce del donatore di organi, poi firmata dal dirigente biologo di turno o qualcuno del settore di biologia molecolare ed inviata al CNTo o a chi ne ha fatto richiesta.

3.4 Tipizzazione HLA del paziente con RSSO Luminex

La tipizzazione HLA dei pazienti in lista per trapianto di fegato viene eseguita solo in caso di trapianto in regime di urgenza (per poter disporre di tutti i dati utili al momento dell'eventuale assegnazione di un organo) o in caso di pazienti che siano risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti HLA. La metodica scelta questa volta è la PCR-RSSO (Reverse Sequence-Specific Oligonucleotide) su piattaforma Luminex perché molto processiva ed economica e perché per questa categoria di pazienti non si richiede normalmente una tipizzazione ad alta risoluzione. Il sistema è composto dal citofluorimetro FLEXMAP 3D, che rileva l'intensità luminosa emessa da ciascuna microsfera, un computer server che raccoglie le informazioni e dieci computer client che conducono l'analisi dei dati. Il principio base prevede l'amplificazione del DNA mediante PCR con primer locus specifici biotilinati. Il prodotto di amplificazione viene denaturato e le singole eliche ottenute, vengono ibridate a sonde di oligonucleotidi legate a microsfere fluorescenti. Dopo l'ibridazione, viene aggiunta R-ficoeritrina coniugata alla Streptavidina (SAPE) che lega la biotina sul DNA amplificato legato alle microsfere, producendo un segnale luminoso.

3.4.1. Amplificazione

Per i loci HLA-A, B, C, DRB345, DQA1 e DQB1 vengono amplificati gli esoni 2 e 3, mentre per i locus HLA-DRB1, DPA1 e DPB1, l'esone 2.



Figura 20- Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler

Tutte le fasi di lavoro devono essere eseguite nel laboratorio PRE-PCR.

1. Preparare il foglio di lavoro (FDL) inserendo un controllo negativo in ogni fila o un campione a tipizzazione nota.
2. Accendere il thermal cycler.
3. Portare a temperatura ambiente la D-Mix (primers e dNTPs) relativa a ciascun locus almeno 30 minuti prima di essere aliquotati e vorticarli per circa 10 secondi.
4. Contrassegnare la prima e l'ultima provetta di ogni strip come riportato sul Foglio di lavoro (FDL) Trapnet e tutti i controlli negativi.
5. Preparare, per ogni specifico locus, la soluzione di amplificazione (Master Mix) utilizzando 6,0 µl di D-Mix, 11,8 µl di acqua e 0,2 µl di Taq DNA polimerasi (5 U/MI) , prevedendo due campioni in più rispetto al numero dei campioni da testare.
6. Vorticare la Master Mix preparata e dispensare 18 µl di soluzione d'amplificazione, utilizzando lo stesso puntale, in ogni provetta.
7. Da questo punto è necessario l'intervento di un secondo operatore, che deve aprire il file "CONTROLLOEXPORT-IMPORT TRAPNET-FLEXMAP xls" sul desktop del pc. All'apertura del file si apre una finestra: scegliere l'opzione "Attiva macro". Nominare la griglia con il codice del FDL Trapnet nella casella 1E, e posizionarsi sulla casella vuota 2B.
8. Il secondo operatore procede con il passaggio di ogni singolo campione al barcode per registrare ciascun ID nel foglio Excel. La provetta registrata viene poi passata al primo

operatore il quale, secondo l'ordine del FDL, procederà a dispensare 2µl di DNA, cambiando il puntale ogni volta, in ogni tubo di amplificazione, ad eccezione dei controlli negativi. Il secondo operatore salva il file, nella cartella "*FDL LUMINEX*" situata sul Desktop, con il nome del FDL Trapnet e una coppia in *My_batches/immucor/FDL IMMUCOR*.

9. Mettere le provette nel Thermal-cycler ed avviare il programma di amplificazione "*IMMUCOR PCR*".
10. Aprire il software gestionale Trapnet e selezionare, dalla barra degli strumenti, *Funzioni, Export/Import, Export FDL*.
11. Inserire il numero del FDL semplice, aprire la tendina collegamento, e selezionare la voce *LUMINEX Flexmap3D*.
12. Fare clic su Export e verificare che il file LumFlexmap_XXXX_fdl sia stato salvato in *My_batches(M:) File da TRAPNET*.
13. Aprire il file LumFlexmap XXXX, copiare l'elenco dei codici campioni esportati da trapnet ed incollarli nella prima colonna del file "*CONTROLLOEXPORT-IMPORT TRAPNET-FLEXMAP.xls*" salvato in *My_batches/immucor/FDL IMMUCOR* dove, in precedenza, sono stati caricati i Barcode di tutti i campioni del foglio di lavoro (il file verifica in automatico l'assenza di discrepanze).
14. Salvare e stampare la griglia excel del foglio di lavoro, porre la firma e pinzarla al foglio di lavoro trapnet.

Le fasi di seguito riportate devono avvenire nel Laboratorio POST-PCR

15. Cicli di amplificazione: il programma comprende una denaturazione iniziale a 95° C per 3 minuti, seguita da 12 cicli di denaturazione (95°C, 15 s), annealing (60°C, 30 s) ed estensione (72°, 30s). successivamente vengono effettuati 28 cicli con denaturazione a 95 °C per 10 s, annealing a 63 °C per 30 s ed estensione a 72 °C per 30 s. La PCR termina con un'estensione finale a 72 °C per 2 minuti e con il mantenimento dei campioni a 4 °C fino al recupero.
16. Controllare l'avvenuta amplificazione su gel di agarosio al 2% seminando nei pozzetti del gel una miscela di 2,5µl di tampone 2X con colorante più 2,5µl di 1 campione per fila di ogni locus amplificato, tutti i controlli negativi e il marker. Far correre a 300V per 20 minuti.

3.4.2. Criteri di accettabilità dei campioni amplificati

1. Controllare che nessun controllo negativo si sia amplificato; in caso contrario, segnalare al supervisore ed eventualmente scartare l'intero set di amplificazione.
2. Controllare che siano presenti le bande specifiche nei campioni amplificati:

- HLA-A: circa 420bp (doppio filamento), circa 240 bp (singolo filamento)
- HLA-B: circa 370bp, 340bp (doppio filamento), circa 200 (singolo filamento)
- HLA-C: circa 476bp, 447bp (doppio filamento), circa 250 bp, 200bp (singolo filamento)
- HLA-DRB1: circa 280bp (doppio filamento), circa 180bp (singolo filamento)
- HLA-DRB3: circa 260bp
- HLA-DRB4: circa 351bp
- HLA-DRB5: circa 260bp, 264bp
- HLA-DQA1: circa 240bp EXON 2, 276bp EXON 3
- HLA-DQB1: circa 160bp EXON 2, 258bp EXON 3
- HLA-DPA1: circa 239bp
- HLA-DPB1: circa 278bp EXON 2, 327bp EXON 3

Le bande di amplificazione del singolo filamento sono più deboli di quella del doppio filamento e non è possibile distinguere le bande a singolo e doppio filamento per i loci DQA1/DQB1, DPA1/DPB1 e DRB345. Controllare che l'intensità della banda amplificata sia uguale a quella del peso più vicino al marker.

3.4.3. Accensione dello strumento flexmap 3D

Vedere paragrafo 3.2.3.

3.4.4. Ibridazione

1. Accertarsi che la soluzione di diluizione (DS) sia ben sciolta. Una volta ricevuto il kit riscaldare la soluzione nel termoblocco per 5 minuti a 45°C. Segnare data di apertura, firma e conservare a temperatura ambiente.
2. Prendere una piastra da PCR a 96 pozzetti e segnare con un pennarello nero i diversi FDL.
3. Controllare che le posizioni delle provette di PCR, corrispondano con quelle del FDL.
4. Scaldare le biglie a 56°C su blocco riscaldato per almeno 5 min.
5. Sonicare per 15 s, poi vorticare energicamente ogni provetta contenente le biglie per 15 s ed aliquotare 15 µl di biglie in ogni pozzetto. Miscelare le biglie dopo ogni 8-12 pozzetti.
6. Aggiungere 5 µl di campione amplificato con la pipetta multicanale 5-50 µl, cambiando i puntali ogni volta, seguendo lo schema del FDL. Miscelare con il puntale.
7. Controllare il volume d'amplificato rimasto nelle provette di PCR.
8. Sigillare la piastra con la pellicola Costar termoresistente e vorticarla a bassa velocità.
9. Accendere il thermal cycler, coprirlo con un tappetino (PCR PAD) in dotazione e far partire il programma "SSO ibridazione". Il programma prevede un'incubazione a 97 °C per 2 minuti,

seguita da 47 °C per 10 minuti, 56 °C per 8 minuti e infine un mantenimento a 56 °C fino al termine della procedura.

10. Preparare una miscela 200:1 di soluzione di ibridazione e PE Streptavidina (SAPE) e per compensare eventuali perdite provocate dal pipettamento è consigliato preparare una miscela sufficiente di diluzione per n+1 campioni ogni 24 test.
11. Diluire i campioni, mentre sono a 56°C, con 170 ml di miscela di Diluzione/PE Streptavidina con l'aiuto di una multicanale e lasciarli in incubazione per almeno 3 min.
12. Rimuovere la piastra dei campioni del thermalcycler e portarla allo strumento FLEXMAP 3D.

A questo punto i campioni sono pronti per essere letti dallo strumento. Acquisire i campioni entro 30 minuti dopo la diluzione, altrimenti conservare la piastra a 4° C al buio, tenendo presente che il segnale potrebbe perdere di intensità. Ricordarsi di miscelare con una multicanale i campioni prima della lettura.

3.4.5. Acquisizione dei campioni

Vedere paragrafo 3.2.5.

3.4.6. Shut down

Vedere paragrafo 3.2.6.

3.4.7. Interpretazione dei risultati

1. Aprire il programma MATCH IT! TM DNA 1.3.2.3 inserendo il proprio Login Name e Password.
2. Selezionare  della barra di strumenti MATCH IT! TM DNA in alto a sinistra dello schermo.
3. Aprire la sottocartella FlexMap3D presente nel server in *My Batches (M)/Flexmap 3D* e selezionare la cartella del foglio di lavoro che si desidera analizzare.
4. Fare un doppio clic sull'output CSV*.
5. Dopo qualche secondo, appare in alto nella scheda DNA.
6. Fare clic sul segno  accanto al codice del FDL importato e visualizzare la tabella riassuntiva della sessione. L'istantanea del batch ("snapshot") mostra una visione generale della sessione di lavoro e fornisce lo stato di ogni singolo campione all'interno di un batch, codificato con un colore in base al tipo di corrispondenza:
 - Verde: Exact match
 - Arancione: se sono presenti false reazioni

- Giallo: quando il software è in grado di identificare solo un allele
- Rosso: evidenza l'impossibilità di suggerire un risultato
- Blu: amplificazione non riuscita.

Lo stato di ciascun campione all'interno di un batch viene visualizzato in base ai seguenti tasti:

- None: Il campione è stato caricato nel software.
- Viewed: Il campione è stato importato e visualizzato nel software.
- Typed: Il campione è stato analizzato dal software MATCH IT! DNA.
- Completed: Il campione è stato analizzato dal tecnico di laboratorio.
- Approved: Il campione è stato confermato dal supervisor.
- Reported: Il campione è stato segnalato come da refertare.

7. Fare doppio click sul primo campione del FDL per aprire il foglio d'analisi per ogni singolo campione.
8. Controllare i valori delle conte ed i suoi controlli.
9. Controllare nell'istogramma la posizione dei rombi, che rappresentano il valore del cut off, in corrispondenza di ogni colonna, che rappresenta ogni singola biglia. Nella finestra "*Sample Analysis*" il software spunta le sonde positive con un segno "√" e le negative senza spunta. Le caselle colorate in verde indicano un valore del 10% maggiore o minore dal punto medio della soglia positiva di cutoff. Per modificare il valore del cutoff cliccare nella casella di ogni singola biglia. Qualsiasi sonda riassegnata dall'utente viene visualizzata con un triangolo (▲).
10. Cliccare su "*Retype Sample*" per tipizzare di nuovo il campione in base al cambiamento della sonda.
11. Segnalare nella finestra "*User Comments/Reviewer Info*" i campioni da ripetere e le modifiche fatte e salvare.
12. Premere il tasto "*Complete*" una volta finito l'analisi verificando che il codice campione in alto a sinistra sia in grassetto.
13. Una volta verificato tutto, consegnare il foglio di lavoro al biologo per la sua conferma.
14. Dopo la conferma selezionare "*Confirm For Reporting*" nella finestra Messaging per bloccare l'analisi.
15. Stampare la Snapshot Summary del foglio di lavoro e pinzarla al FDL di trapnet.
16. Aprire il software MatchCOMXL per assegnare la sierologia e per refertare i risultati.

17. L'assegnazione in Matchcomxl è fatta dai biologi. I tecnici sono solo abilitati alla stampa dei report che precedentemente siano stati assegnati da un biologo ed alla consulta delle statistiche.
18. Selezionare Batches nella finestra centrale "Typing".
19. Inserire in Batch il codice del FDL di Trapnet e cliccare *Search*. Verificare che sotto la colonna NMDP ci siano le tipizzazioni a bassa risoluzione seguite dal suo codice NMDP. La presenza di una tipizzazione seguita di XX indica ambiguità a bassa risoluzione. Cliccare sulla lente e selezionare la combinazione più frequente E sottolineare nel campo note la combinazione scartata.
20. Una volta verificato i risultati a bassa risoluzione assegnare con il tasto l'alta risoluzione più frequente, considerando il catalogo Cwd come referente. Questo viene fatto per assegnare l'antigene sierologico e non è da considerare per refertare. Nel caso ci siano presenti più di un allele Cwd nelle proposte segnalo nel campo note.
21. Le sonde FP e FN vengono salvate in automatico sul software MatchCOMXL e inserite dopo un'analisi accurata nell'apposito modulo.
22. Selezionare il foglio di lavoro singolo e fare l'export dei risultati. I File di export vengono salvati in automatico.
23. Stampare i fogli di lavoro. Selezionando *Print/Report*.
24. Importare i file, con i risultati delle tipizzazioni, nel gestionale TRAPNET (I.O.261).

3.4.8. Criteri di accettabilità delle sessioni di lavoro

- Accertarsi che il valore dell'intensità di fluorescenza dei controlli negativi, inseriti nel foglio di lavoro, sia inferiore a 200 MFI; nel caso in cui fosse superiore, segnalare al supervisore ed eventualmente scartare l'intera fila o l'intero foglio di lavoro.
- Verificare la conferma della tipizzazione dei controlli positivi; in caso contrario, segnalare al supervisore ed eventualmente scartare l'intera fila o l'intero foglio di lavoro.

3.4.9. Criteri di accettabilità dei risultati

I parametri da controllare per ciascun campione acquisito sono:

- Il numero totale di biglie analizzato che dovrebbe essere maggiore di 40. Tuttavia, per i kit SSO, se il numero è compreso tra 30-40 è possibile comunque concludere il test indicando il numero minimo di conte nei commenti. Mentre, se il numero di biglie è inferiore a 30 il test non è affidabile e bisogna segnalare la cosa al supervisore.

- L'intensità di fluorescenza dei controlli positivi, il cui valore deve essere superiore al valore soglia minimo definito dal produttore in base al lotto. Un valore inferiore a 300 negli esoni 2 e 3 può essere dovuto a inadeguata quantità e/o qualità del DNA, bassa efficienza del test o essere causato dallo strumento. In questi casi il test va ripetuto.

In presenza di sonde false positive e/o negative bisogna valutare la loro eventuale segnalazione nel libretto di istruzioni relativo al Kit in uso. In questo caso il risultato del test può essere accettato. La modifica del cut-off d'una biglia non può superare un intervallo del 20% salvo precedente validazione in laboratorio della reattività della sonda. Se più di una biglia dovesse risultare falsa positiva e/o falsa negativa il risultato va controllato da due operatori ed eventualmente il test va ripetuto.

3.5. Crossmatch in citotossicità

Il crossmatch pre-trapianto in citotossicità complemento-dipendente rappresenta una metodica fondamentale per la valutazione della compatibilità immunologica tra donatore e ricevente nei pazienti che non soddisfano i criteri per l'esecuzione del crossmatch virtuale. Tale metodica consente di evidenziare la presenza, nel siero del ricevente, di anticorpi anti-HLA preformati diretti contro gli antigeni anti HLA espressi sui linfociti del donatore.

3.5.1. Preparazione schema cross match standard e semina dei sieri

1. Rilevare sul verbale di trapianto la posizione del siero dei riceventi selezionati che devono essere sottoposti a cross match.
2. Prendere dai congelatori tutti i sieri dei candidati al trapianto (tranne i sieri dei pazienti valutati con crossmatch virtuale) e trasferirli in uno stativo verificando la corrispondenza tra i campioni e i pazienti selezionati.
3. Controllare che per i pazienti immunizzati siano disponibili i due sieri con la maggiore percentuale di anticorpi oltre al più recente.
4. Mettere lo stativo in termostato a +40°C fino a completo scongelamento dei sieri (circa 10 min); nel caso ci fossero trattamenti DTT/PBS lasciarli scongelare a temperatura ambiente.
5. Scongellare a temperatura ambiente i controlli necessari AB, ALS e anti-HLA. Nel caso in cui fossero necessari i controlli trattati DTT/PBS recuperarli nel congelatore e scongelare a temperatura ambiente una provetta di ognuno.
6. Disporre su uno stativo una provetta con acqua distillata e una provetta con fisiologica per lavaggio Hamilton.

7. Disporre altre due provette di plastica da 10 ml contenenti fisiologica e una provetta contenente HBSS' con calcio e magnesio per le diluizioni dei sieri.
8. Preparare lo schema di semina dei campioni di siero prendendo i nomi dal verbale donatore cadavere o dalla documentazione per il donatore vivente e registrarli sull'apposito modulo.
9. Prendere, per ogni schema di lavoro, due piastre Terasaki da 60 pozzetti inyaselinate e contrassegnarle con l'apposita etichetta riportante i dati del donatore. Sul lato maggiore delle piastre scrivere il tipo di cross match, e lateralmente identificare la piastra alfa-numericamente; indicare con il pennarello nero T se il crossmatch è eseguito con i linfociti T, in rosso B se è eseguito con i linfociti B.



Figura 21 – Piastra Terasaki

10. Seminare i controlli negativi indiluiti e diluiti 1:4 nelle posizioni indicate dallo schema.
11. Prendere, come da schema di semina, il primo campione di siero e controllare ID anagrafico, cognome e data del siero del soggetto, capovolgere la cartuccia almeno un paio di volte ed aspirare 15 μ l di siero con una siringa Hamilton da 50 μ l.
12. Fare tre scatti a vuoto sulla bibula per controllare l'erogazione e seminare 1 μ l di siero nel pozzetto corrispondente di entrambe le piastre (siero indiluito).
13. Riporre il campione di siero sullo stativo nella prima posizione lasciata libera secondo le modalità indicate precedentemente.
14. Immergere la punta della Hamilton nelle prime due provette contenenti fisiologica e aspirare dalla terza provetta contenente HBSS' con calcio e magnesio 30 μ l per ottenere la diluizione 1:4 del siero.
15. Trasferire e mescolare il contenuto della Hamilton in una provetta Beckman, prelevarne circa 20 μ l, fare due scatti a vuoto e seminare nel pozzetto corrispondente di entrambe le piastre.

16. Svuotare la siringa Hamilton, sciacquarla 2 volte in distillata e 2 volte in fisiologica e proseguire con la semina dei sieri, controllando ogni volta che i dati riportati sulle provette corrispondano allo schema di semina.
17. Dopo aver seminato il siero dell'ultimo paziente, sciacquare la siringa Hamilton e seminare i controlli positivi nelle posizioni definite.
18. Risciacquare e riporre la siringa Hamilton piena di acqua distillata.

3.5.2. Sieri dei pazienti

I sieri dei pazienti positivi per la presenza di anticorpi DSA anti-HLA devono essere testati nel cross match utilizzando anche i linfociti B. Se in sieroteca tali sieri non sono trattati con DTT, eseguire il trattamento descritto di seguito:

1. Accendere il bagnetto termostato.
2. Centrifugare i sieri per 5 minuti a 12000 rpm, eliminando, se presenti, coaguli di fibrina con un puntale monouso.
3. Per ciascun siero da trattare stampare le etichette corrispondenti dal sistema gestionale Trapnet e contrassegnarle con DTT (scritto in nero) e PBS (scritto in rosso); prendere una provetta Beckman contenente 10µl di DTT 0,05M dal congelatore e una provetta Beckman contenente 10 µl di PBS 1X etichettandole con le relative etichette.
4. Ad ogni provetta Bekman aggiungere 90 µl di siero.
5. Verificare che il siero si sia unito al DTT e PBS, mescolare accuratamente su Vortex e incubare in bagno termostato a 37°C per 45 minuti.
6. Centrifugare i sieri trattati per 5 minuti a 12000 rpm mettendo le beckman nelle apposite provette da 2 ml poste nello stativo “Bilanci” posto sopra la centrifuga.

In alcuni pazienti in attesa di trapianto è stata dimostrata la presenza di una miscela di anticorpi di classe IgG e IgM. Seminare i sieri di questi pazienti, presenti in archivio o già trattati, con i linfociti T in assenza di DSA, e con i linfociti T e B in presenza di anticorpi DSA.

La sieroteca DTT intesa come archivio di pazienti renali con ricerca di anticorpi Luminex sempre negativa, ma con reattività identificata esclusivamente in CDC per presenza nel siero di Abs JgM, andrà progressivamente a esaurirsi. Infatti, dal 2021 la ricerca di anticorpi viene effettuata solo con metodica Luminex e per questa tipologia di pazienti è previsto il crossmatch virtuale. Nel caso in cui si riscontri una positività inattesa al cross match reale, i campioni verranno trattati e il test riallestito come descritto sopra.

3.5.3. Esecuzione del test e lettura

1. Dopo aver accuratamente risospeso la sospensione cellulare del donatore, seminarne 1µl in ogni pozzetto delle piastre che contengono i sieri dei pazienti.
2. Controllare, ponendo la piastra sull' agglutinoscopio, che sia avvenuto il rimescolamento tra siero e cellule. In caso contrario unire le gocce con una siringa Hamilton avendo l'accortezza, dopo ogni mescolamento, di pulire accuratamente l'ago della siringa immergendolo in una provetta contenente HBSS' con calcio e magnesio.
3. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente i linfociti T e nel termostato a 20°C i linfociti B. Scongellare le aliquote di complemento.
4. Aggiungere 5 µl di complemento di coniglio standard per i linfociti T e 5 µl di complemento.
5. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente i linfociti T e nel termostato a 20°C i linfociti B.
6. Aggiungere 5 µl di soluzione colorante Fluoroquenck per pozzetto,.
7. Leggere dopo almeno 5 minuti con il microscopio a fluorescenza 183439 le piastre dopo aver favorito la sedimentazione delle cellule usando un magnete.

3.5.4. Lettura al microscopio

La lettura delle piastre avviene con un microscopio a fluorescenza e obiettivo 10X e consiste nella valutazione delle reazioni. Il microscopio deve permettere la valutazione di un intero pozzetto in un solo campo microscopico. Alle reazioni è attribuito uno score dato dalla percentuale di cellule morte presenti in un pozzetto, come riportato nella seguente tabella:

% CELLULE MORTE	SCORE	INTERPRETAZIONE
0-10	1	NEGATIVO
11-20	2	DUBBIO NEGATIVO
21-50	4	DEBOLE POSITIVO
51-80	6	POSITIVO
81-100	8	FORTE POSITIVO
?	0	NON LEGGIBILE
ASSENZA DI CELLULE	X	POSIZIONE VUOTA

Sono attribuibili anche gli score intermedi: 2/4, 4/6, 6/8. Le cellule vive appaiono verdi, le cellule morte appaiono rosse.

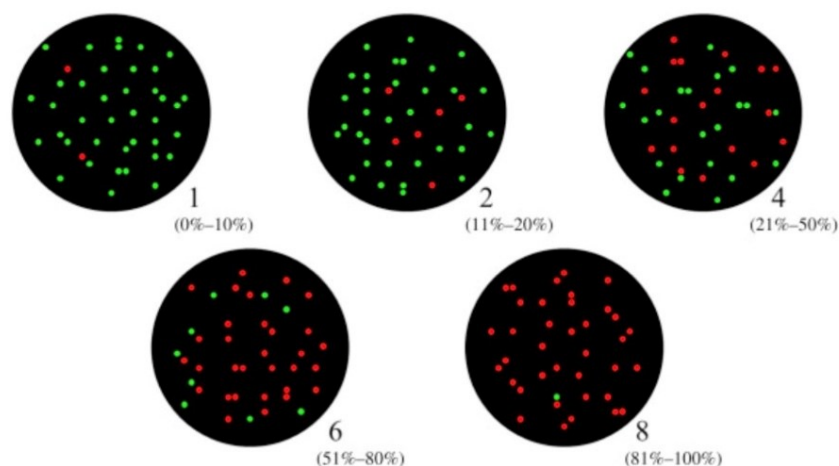


Figura 22- Schema di lettura CDC.

Lo schema di semina del cross match deve essere identificato con ID anagrafico, cognome e nome del donatore, la categoria di appartenenza dei pazienti seminati nel crossmatch, la vitalità cellulare, il lotto del complemento utilizzato e i sieri dei pazienti testati.

Riportare gli score di reazione, la data di esecuzione della lettura e la firma del lettore; la firma di chi ha eseguito il test ed eventuali note.

Prima di procedere alla lettura del crossmatch è necessario verificare il risultato ottenuto nei pozzetti in cui sono stati seminati i controlli (la percentuale di mortalità delle cellule del donatore contro i sieri dei pazienti deve essere valutata confrontandola con il controllo negativo).

Riportare gli score di reazione sullo schema di semina e riportare i risultati sul verbale di allocazione degli organi nello specifico spazio, firmare e allegare il foglio di lettura firmato.

Quando i sieri sono trattati con DIT e PBS i risultati vanno interpretati nel seguente modo:

SIERO NON TRATTATO	SIERO + DTT	SIERO + PBS	EXITO X-MATCH
POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

3.5.5. Validazione del test ed interpretazione dei risultati

Il risultato del test è da ritenersi valido quando:

- La vitalità cellulare è superiore al 80%
- Almeno uno dei sieri di controllo positivo ha fornito risultato atteso in entrambe le piastre. Se i controlli positivi non dovessero aver reagito, almeno un siero di un paziente deve essere positivo. In alternativa, il test deve essere ripetuto.

Contattare sempre il Biologo di supporto se i controlli positivi hanno fornito risultato negativo oppure la vitalità cellulare ha una percentuale di mortalità elevata $\geq 50\%$.

Ripetere il cross match quando:

- Non è possibile valutare le piastre seminate a causa della presenza di fibrina nel siero o la mancata semina dei linfociti.
- Nel caso di scarsa vitalità cellulare ripetere il cross match con dei linfociti ottenuti da una nuova separazione su gradiente di densità Ficoll. Se anche in questo caso la sospensione linfocitaria ha un'elevata mortalità, richiedere un nuovo prelievo alla rianimazione di provenienza del donatore.
- In caso di risultati inattesi del crossmatch, confermati anche sulla ripetizione del test, trattare il siero del paziente con DTT; ripetere il crossmatch e se dopo trattamento il cross-match risulta negativo, il personale del laboratorio provvederà a spostare il siero del paziente nella sieroteca DTT. Qualora risulti ancora positivo, il caso viene segnalato in laboratorio.
- Consultare l'allegato "gestione cross match pre-trapianto".

Nel caso di trapianto di rene, cuore, polmoni e pancreas, la positività del cross match dovuta ad alloanticorpi è una controindicazione assoluta al trapianto.

Nel caso di trapianto di fegato, la positività del cross match non costituisce una controindicazione assoluta.

3.5.6. Refertazione crossmatch

Il risultato del crossmatch va inserito nel campo apposito di Trapnet. E' possibile scegliere il risultato corretto dal menù a tendina. Sempre da Trapnet deve essere stampato il verbale del crossmatch, che deve essere inviato in qualità di referto al centro trapianti titolare dell'organo. Insieme all'invio, a meno di accordi diversi presi volta per volta con i centri trapianto, deve essere fatta anche comunicazione telefonica del risultato, specificando provenienza del donatore, nome del paziente, risultato del crossmatch ed eventuale presenza di anticorpi DSA.

3.6. Analisi statistica

Le variabili categoriche sono state descritte mediante frequenze assolute e percentuali, mentre le variabili quantitative sono state riportate come mediana e intervallo interquartile (Q1–Q3). Le associazioni tra variabili categoriche sono state valutate mediante test del chi-quadrato (χ^2) di Pearson, mentre in presenza di basse frequenze attese è stato utilizzato il test esatto di Fisher. Per il confronto

di variabili quantitative tra due gruppi indipendenti è stato impiegato il test non parametrico di Mann–Whitney. È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Jamovi.

4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche della casistica

La casistica comprende un totale di 3548 trapianti di fegato eseguiti nel periodo compreso tra gennaio 2019 e dicembre 2025 presso i centri trapianto afferenti in area NITp.

La distribuzione dei trapianti nei diversi centri è risultata la seguente: 303 trapianti (8,5%) eseguiti presso l'Ospedale Riuniti di Ancona, 543 (15,3%) presso l'Ospedale Riuniti di Bergamo, 147 (4,2%) presso l'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino di Genova, 718 (20,2%) presso l'ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, 366 (10,3%) presso l'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, 248 (7,0%) presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, 716 (20,2 %) presso l'Azienda Ospedale-Università di Padova, 190 (5,4%) presso l'Ospedale Santa Maria della Misericordia di Udine e infine 317 (8,9%) presso l'Ospedale Borgo Trento di Verona.

Distribuzione dei trapianti per centro, n (%)	
AN - Ospedali Riuniti	303 (8,5)
BG - Riuniti di Bergamo	543 (15,3)
GE - San Martino	147 (4,2)
MI - Niguarda	718 (20,2)
MI - Policlinico	366 (10,3)
MI - Tumori	248 (7,0)
PD - AO Padova	716 (20,2)
UD - S.M. Misericordia	190 (5,4)
VR - Borgo Trento	317 (8,9)

Tabella 1- Distribuzione dei trapianti di fegato nell'area NITp in relazione al centro trapianti

4.2. Caratteristiche demografiche della popolazione

4.2.1. Caratteristiche dei riceventi

Nella casistica complessiva, comprendente 3548 trapianti, 2542 riceventi (71,6%) erano di sesso maschile e 1006 (28,4%) di sesso femminile. L'età mediana al momento del trapianto era di 59 anni (Q1-Q3: 51-64 anni). I riceventi adulti (≥ 18 anni) erano 3345 (94,3%), mentre i riceventi pediatrici (< 18 anni) erano 203 (5,7%) .

Caratteristiche del ricevente	
Maschi, n (%)	2542 (71,6)
Femmine, n (%)	1006 (28,4)
Età al trapianto, mediana (Q1-Q3), anni	59 (51-64)
Adulti (≥ 18 anni), n (%)	3345 (94,3)
Pediatrici (< 18 anni), n (%)	203 (5,7)

Tabella 2- Caratteristiche demografiche dei riceventi

4.2.2. Caratteristiche dei donatori

Tra i donatori, 1999 erano di sesso maschile (56,3%) e 1549 (43,7%) di sesso femminile. L'età mediana al decesso era di 64 anni (Q1-Q3: 51-75 anni) (tabella 3).

Caratteristiche del donatore	
Maschi, n (%)	1999 (56,3)
Femmine, n (%)	1549 (43,7)
Età al decesso, mediana (Q1-Q3), anni	64 (51-75)

Tabella 3- Caratteristiche demografiche dei donatori

4.3. Caratteristiche immunologiche e sensibilizzazione HLA in relazione al sesso del ricevente

4.3.1. PRA massimo

Il PRA massimo era pari allo 0% in 2805 casi (79,1%), compreso tra 1% e 49% in 446 casi (12,6%), tra il 50% e 79% in 126 casi (3,6%) e infine tra l'80% e il 100% in 171 casi (4,8%).

PRA massimo, n (%)	
0%	2805 (79,1)
1-49%	446 (12,6)
50-79%	126 (3,6)
80-100%	171 (4,8)

Tabella 4- Distribuzione dei riceventi in relazione al PRA massimo

La distribuzione delle categorie di PRA è risultata differente in relazione al sesso del ricevente. In particolare, un PRA massimo pari allo 0% è stato osservato in 644 riceventi di sesso femminile (64,0%) e in 2161 di sesso maschile (85,0%). Valori compresi tra 1% e 49% sono stati rilevati rispettivamente in 162 (16,1%) e 284 casi (11,2%), valori compresi tra 50% e 79% in 74 (7,4%) e 52 casi (2,0%) e infine valori compresi tra 80% e 100% in 126 (12,5%) e 45 casi (1,8%).

Variabile	Femmine (n=1006) n (%)	Maschi (n=2542) n (%)	χ^2 (gdl)	p
PRA massimo			284,33 (3)	<0,001
0%	644 (64,0)	2161 (85,0)		
1-49%	162 (16,1)	284 (11,2)		
50-79%	74 (7,4)	52 (2,0)		
80-100%	126 (12,5)	45 (1,8)		

Tabella 5- Distribuzione del PRA massimo in relazione al sesso del ricevente

4.3.2. DSA preformati

Per quanto riguarda la presenza di DSA preformati al momento del trapianto, in 3181 casi (89,6%), non erano presenti. Tra i restanti 367 trapianti in cui erano presenti, la categoria di MFI, definita sulla base del DSA con il valore MFI più elevato in caso di presenza di più DSA, era <5000 in 144 casi (4,1%), compresa tra 5000 e 10000 in 71 casi (2,0%) e >10000 in 152 (4,3%).

DSA preformati per categoria di MFI, n (%)	
Nessun DSA	3181 (89,6)
MFI <5000	144 (4,1)
MFI 5000-10000	71 (2,0)
MFI >10000	152 (4,3)

Tabella 6 - Distribuzione dei riceventi in relazione alla presenza di DSA preformati

Anche la distribuzione della presenza di DSA preformati è risultata differente in relazione al sesso del ricevente: i DSA erano assenti in 799 riceventi femmine (79,4%) e in 2382 maschi (93,7%), mentre erano presenti rispettivamente in 207 (20,6%) e 160 casi (6,3%).

Variabile	Femmine (n=1006) n (%)	Maschi (n=2542) n (%)	χ^2 (gdl)	p
DSA preformati			158,53 (1)	<0,001
Assenti	799 (79,4)	2382 (93,7)		
Presenti	207 (20,6)	160 (6,3)		

Tabella 7 - Distribuzione dei DSA preformati in relazione al sesso del ricevente

4.4. Valutazione del risultato del crossmatch

La valutazione del crossmatch è stata eseguita nella maggior parte dei casi mediante CDC-XM, effettuato in 3463 casi (97,6%), ottenendo esito negativo in 3391 casi (97,9%) e positivo in 72 casi (2,1%). In 38 casi (1,1%) è stato eseguito un crossmatch virtuale con esito negativo, mentre in 47 casi (1,3%) non è stata effettuata alcuna valutazione.

Valutazione del crossmatch, n (%)	
CDC-XM	3463 (97,6)
Virtuale negativo	38 (1,1)
Non testato	47 (1,3)
Esito del CDC-XM, n (%)	
Negativo	3391 (97,9)
Positivo	72 (2,1)

Tabella 8- Distribuzione dei trapianti in relazione all'esito del CDC-XM

4.4.1. Presenza di DSA preformati in relazione all'esito del CDC-XM

L'associazione tra la presenza di DSA preformati e l'esito del crossmatch è stata valutata considerando esclusivamente i 3463 trapianti in cui il CDC-XM è stato effettivamente eseguito. Nei trapianti con DSA preformati assenti, il crossmatch è risultato negativo in 3090 casi (99,5%) e positivo in 14 casi (0,5%). Nei trapianti con presenza di DSA preformati, il CDC crossmatch è risultato negativo in 301 casi (83,8%) e positivo in 58 casi (16,2%). È stata rilevata un'associazione statisticamente significativa tra la presenza di DSA preformati e l'esito del crossmatch ($p < 0,001$).

	CDC-XM negativo n (%)	CDC-XM positivo n (%)	χ^2 (gdl)	p
DSA preformati			389,84 (1)	<0,001
Assenti	3090 (99,5)	14 (0,5)		
Presenti	301 (83,8)	58 (16,2)		

Tabella 9- Associazione tra presenza di DSA preformati ed esito del CDC-XM

4.4.2. Distribuzione dei DSA preformati per locus HLA in relazione all'esito del CDC-XM

Nei 359 trapianti con presenza di DSA preformati e crossmatch eseguito, la distribuzione dei DSA è stata valutata in relazione al locus HLA verso cui erano diretti e all'esito del crossmatch. I DSA erano diretti verso HLA-DQB1 in 153 casi (42,6%), verso HLA-A in 130 casi (36,2%), verso HLA-B in 121 casi (33,7%), verso HLA-DRB1 in 93 casi (25,9%), verso HLA-C in 58 casi (16,2%) e verso HLA-DPB1 in 33 casi (9,2%).

Considerando la distribuzione dei trapianti con DSA diretti verso ciascun locus in base all'esito del CDC- XM, per il locus A il CDC-XM è risultato negativo in 89 casi (68,5%) e positivo in 41(31,5%). I corrispondenti valori per il locus B sono risultati pari a 81 (66,9%) e 40 (33,1%), per il locus C a 42 (72,4%) e 16 (27,6%), per il locus DRB1 a 73 (78,5%) e 20 (21,5%), per DQB1 a 128 (83,7%) e 25 (16,3%) e infine per il locus HLA-DPB1 a 24 (72,7%) e 9 (27,3%), rispettivamente.

Trapianti DSA positivi (N=359)	CDC-XM negativo n (%)	CDC-XM positivo n (%)	Totale n (%)
Locus coinvolto			
HLA-A	89 (68,5)	41 (31,5)	130 (36,2)
HLA-B	81 (66,9)	40 (33,1)	121 (33,7)
HLA-C	42 (72,4)	16 (27,6)	58 (16,2)
HLA-DRB1	73 (78,5)	20 (21,5)	93 (25,9)
HLA-DQB1	128 (83,7)	25 (16,3)	153 (42,6)
HLA-DPB1	24 (72,7)	9 (27,3)	33 (9,2)

Tabella 10- Distribuzione dell'esito del CDC-XM in relazione al locus HLA dei DSA preformati

4.4.3. Classe e MFI dei DSA preformati in relazione all'esito del CDC-XM

Nei 359 trapianti con DSA preformati e crossmatch eseguito, la distribuzione della classe dei DSA e dei relativi valori di MFI è stata valutata in relazione all'esito del CDC-XM. Considerando la classe dei DSA, nei trapianti con DSA esclusivamente di classe I, il CDC-XM è risultato negativo in 120 casi (81,1%) e positivo in 28 casi (18,9%). Nei trapianti con DSA esclusivamente di classe II, il CDC-XM è risultato negativo in 131 casi (94,9%) e positivo in 7 casi (5,1%). Nei trapianti in cui erano presenti sia DSA di classe I che di classe II, il CDC-XM è risultato negativo in 50 casi (68,5%) e positivo in 23 casi (31,5%). La distribuzione della classe dei DSA in relazione all'esito del CDC-XM è risultata statisticamente significativa ($p < 0,001$).

Considerando la categoria di MFI massimo, nei trapianti con MFI inferiore a 5000 il CDC-XM è risultato negativo in 135 casi (97,8%) e positivo in 3 casi (2,2%), nei trapianti con MFI compreso tra 5000 e 10000, è risultato negativo in 64 casi (91,4%) e positivo in 6 casi (8,6%) e infine nei trapianti con MFI superiore a 10000, è risultato negativo in 102 casi (67,5%) e positivo in 49 (32,5%). Anche la distribuzione delle categorie di MFI massimo in relazione all'esito del CDC-XM è risultata statisticamente significativa ($p < 0,001$).

Il valore di MFI cumulativo, calcolato come somma dei valori di MFI di tutti i DSA preformati presenti nello stesso trapianto, era pari a 7180 (Q1-Q3: 3.098–19.212) nei trapianti con CDC-XM negativo e a 29.185 (Q1-Q3: 17.013–70.120) nei trapianti con CDC-XM positivo.

Trapianti DSA positivi (N=359)	CDC-XM negativo (n=301)	CDC-XM positivo (n=58)	Statistica	p
Classe dei DSA, n (%)			$\chi^2 = 26,05$ (2 gdl)	<0,001
Solo classe I	120 (81,1)	28 (18,9)		
Solo classe II	131 (94,9)	7 (5,1)		
Classe I + II	50 (68,5)	23 (31,5)		
Categoria MFI massimo, n (%)			$\chi^2 = 52,49$ (2 gdl)	<0,001
MFI <5000	135 (97,8)	3 (2,2)		
MFI 5000–10000	64 (91,4)	6 (8,6)		
MFI >10000	102 (67,5)	49 (32,5)		
MFI cumulativo, mediana (Q1–Q3)	7.180 (3.098–19.212)	29.185 (17.013–70.120)	U= 3308,5	<0,001

Tabella 11- Classe e MFI dei DSA preformati in relazione all'esito del CDC-XM

4.5. Rigetto post-trapianto e profilo immunologico pre-trapianto

4.5.1. Frequenza dei rigetti e associazione con CDC-XM e DSA preformati

L'associazione tra l'esito del CDC-XM, la presenza di DSA preformati e gli episodi di rigetto post-trapianto è stata valutata nei diversi intervalli temporali considerati, per i soli pazienti di cui si dispone ad oggi del dato clinico (N:???) .

- Considerando il rigetto umorale entro i primi 3 mesi dal trapianto, sono stati osservati 11 casi su 750 trapianti valutabili (1,5%) nel gruppo con crossmatch negativo e nessun caso tra i 13 trapianti con crossmatch positivo (p=1000). Considerando la presenza di DSA preformati, nel gruppo con DSA assenti sono stati osservati 12 casi di rigetto su 709 trapianti valutabili (1,7%) e 1 caso su 74 (1,4%) nel gruppo con DSA preformati presenti (p=1000).
- Per il rigetto cellulare entro i primi 3 mesi, sono stati osservati 62 casi su 750 trapianti valutabili (8,3%) nel gruppo con crossmatch negativo e 2 casi su 13 (15,4%) nel gruppo con crossmatch positivo (p=0,299). Nei trapianti con DSA preformati assenti, sono stati osservati 61 casi su 709 (8,6%), mentre nei trapianti con DSA preformati presenti, sono stati osservati 7 casi su 74 (9,5%; p=0,828).
- Per quanto riguarda il rigetto umorale tra 3 e 12 mesi dal trapianto, è stato osservato in 2 casi su 732 trapianti valutabili (0,3%) nel gruppo con crossmatch negativo e in nessun caso tra i 13 trapianti con CDC-XM positivo (p=1,000). Nel gruppo con DSA preformati assenti, sono

stati osservati 2 casi su 691 (0,3%), mentre non sono stati osservati casi tra i 71 trapianti con DSA preformati presenti (p=1,000).

- Per il rigetto cellulare tra 3 e 12 mesi dal trapianto, infine, sono stati osservati 11 casi su 733 trapianti valutabili (1,5%) nel gruppo con crossmatch negativo e 2 casi su 13 (15,4%) nel gruppo con crossmatch positivo (p=0,020). Nei trapianti con DSA preformati assenti, sono stati osservati 11 casi su 692 (1,6%), mentre nei trapianti con DSA preformati presenti, sono stati osservati 2 casi su 71 (2,8%; p=0,345).

Outcome di rigetto	CDC - XM			DSA preformati		
	Negativo n/N (%)	Positivo n/N (%)	p	Assenti n/N (%)	Presenti n/N (%)	p
Umorale 0–3 mesi	11/750 (1,5)	0/13 (0,0)	1,000	12/709 (1,7)	1/74 (1,4)	1,000
Cellulare 0–3 mesi	62/750 (8,3)	2/13 (15,4)	0,299	61/709 (8,6)	7/74 (9,5)	0,828
Umorale 3–12 mesi	2/732 (0,3)	0/13 (0,0)	1,000	2/691 (0,3)	0/71 (0,0)	1,000
Cellulare 3–12 mesi	11/733 (1,5)	2/13 (15,4)	0,020	11/692 (1,6)	2/71 (2,8)	0,345

Tabella 12- Associazione tra esito del CDC-XM, DSA preformati e rigetto post trapianto

4.5.2. Profilo immunologico pre-trapianto dei trapianti con rigetto

Il profilo immunologico pre-trapianto è stato quindi descritto per i trapianti in cui è stato osservato un episodio di rigetto, considerando il PRA massimo e la presenza di DSA preformati, stratificati in base alla categoria di MFI massimo.

- Tra i 13 casi di rigetto umorale osservati entro i primi 3 mesi post-trapianto, 11 (84,6%) presentavano un PRA massimo pari allo 0%, mentre un caso (7,7%) presentava una PRA compreso tra l'1% e il 49% e un caso (7,7%) tra il 50% e il 79%. 12 casi (92,3%) non presentavano DSA preformati, mentre in un caso (7,7%) erano presenti DSA con MFI inferiore a 5000.
- Tra i 68 casi di rigetto cellulare osservati entro i primi 3 mesi dal trapianto, 55 (80,9%) presentavano un PRA massimo pari allo 0%, 9 (13,2%) un PRA compreso tra l'1% e il 49%, 2 (2,9%) tra il 50% e il 79% e 2 (2,9%) tra l'80% e il 100%. In 61 casi, (89,7%) non erano presenti DSA preformati. 3 casi (4,4%) presentavano DSA con MFI inferiore a 5000, un caso (1,5%) DSA con MFI compreso tra 5000 e 10000 e 3 casi (4,4%) DSA con MFI superiore a 10000.
- I 2 casi di rigetto umorale osservati tra 3 e 12 mesi presentavano entrambi un PRA massimo pari allo 0% e non presentavano DSA preformati.

- Tra i 13 casi di rigetto cellulare osservati tra 3 e 12 mesi post-trapianto, 11 (84,6%) presentavano un PRA massimo pari allo 0% e 2 (15,4%) un PRA compreso tra 80% e 100%. In 11 casi (84,6%) non erano presenti DSA preformati, mentre 2 casi (15,4%) presentavano DSA con MFI superiore a 10000.

Profilo immunologico	Umorale 0–3 mesi (N=13)	Cellulare 0–3 mesi (N=68)	Umorale 3–12 mesi (N=2)	Cellulare 3–12 mesi (N=13)
PRA massimo				
0%	11 (84,6)	55 (80,9)	2 (100,0)	11 (84,6)
1–49%	1 (7,7)	9 (13,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
50–79%	1 (7,7)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
80–100%	0 (0,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	2 (15,4)
DSA preformati per categoria di MFI massimo				
Nessun DSA	12 (92,3)	61 (89,7)	2 (100,0)	11 (84,6)
MFI <5.000	1 (7,7)	3 (4,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
MFI 5.000–10.000	0 (0,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
MFI >10.000	0 (0,0)	3 (4,4)	0 (0,0)	2 (15,4)

Tabella 13- Profilo immunologico pre-trapianto nei pazienti con rigetto post-trapianto

4.5.3. Distribuzione dei DSA preformati per locus HLA nei trapianti DSA-positivi con rigetto

Nei trapianti con DSA preformati, per i quali erano disponibili i dati relativi al rigetto, è stata descritta la distribuzione dei DSA in base al locus HLA coinvolto. Per ciascun outcome di rigetto, i valori indicano il numero di trapianti nei quali era presente almeno un DSA verso il locus HLA indicato. Uno stesso trapianto poteva essere conteggiato in più loci. Entro i primi 3 mesi post-trapianto, tra i 74 casi DSA positivi è stato osservato un caso di rigetto umorale (1,4%), nel quale era presente un DSA diretto verso il locus HLA-A. Nello stesso periodo, tra i 7 casi di rigetto cellulare (9,5%), erano presenti DSA diretti verso il locus A e B in 3 casi, verso il locus C in 2 casi e verso i loci DQB1/DQA1 in due casi. Non sono stati osservati, invece, DSA diretti verso i loci DRB1, DPB1. Nel periodo compreso tra 3 e 12 mesi dal trapianto, non sono stati osservati episodi di rigetto umorale tra i 71 trapianti DSA positivi valutabili. Nello stesso intervallo temporale, sono stati osservati 2 casi di rigetto cellulare (2,8%), nei quali erano presenti DSA diretti verso i loci A e B in entrambi i casi e verso i loci DQB1 e DQA1 in un caso. Non erano presenti DSA diretti verso i loci C, DRB1 e DPB1.

	Umorale 0-3 mesi	Cellulare 0-3 mesi	Umorale 3-12 mesi	Cellulare 3-12 mesi
Trapianti DSA-positivi con dato disponibile, N	74	74	71	71
Con rigetto, n/N (%)	1/74 (1,4)	7/74 (9,5)	0/71 (0,0)	2/71 (2,8)
Trapianti con DSA per locus HLA, n				
HLA-A	1	3	-	2
HLA-B	0	3	-	2
HLA-C	0	2	-	0
HLA-DRB1	0	0	-	0
HLA-DQB1/DQA1	0	2	-	1
HLA-DPB1	0	0	-	0

Tabella 14- Distribuzione dei loci HLA dei DSA preformati nei pazienti con rigetto post- trapianto

5. DISCUSSIONE

Il trapianto di fegato rappresenta, ad oggi, una delle strategie terapeutiche più importanti per il trattamento di patologie epatiche e carcinoma epatocellulare, le cui cause possono essere molteplici tra cui infezioni virali (virus dell'epatite C e B), abuso cronico di alcol e malattie congenite. L'evoluzione e i progressivi miglioramenti nelle tecniche chirurgiche, nella gestione delle complicanze e nel controllo del rigetto, hanno reso il trapianto di fegato una procedura consolidata nella pratica clinica, con un progressivo aumento della sopravvivenza dell'organo trapiantato e dei pazienti. Parallelamente, si è sviluppata una comprensione sempre maggiore dei meccanismi immunologici coinvolti nel trapianto, che sottolinea come la risposta immunitaria nei confronti dell'organo del donatore sia il risultato di una complessa interazione tra le caratteristiche anatomiche del fegato stesso, fattori legati all'HLA, ma anche non correlati all'HLA. In questo contesto, il rischio immunologico associato al trapianto di fegato, ha assunto caratteristiche peculiari rispetto agli altri organi solidi. Il fegato, infatti, possiede particolari proprietà capaci di modulare la risposta immunitaria e ridurre la presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) nel periodo immediatamente successivo al trapianto, anche in soggetti caratterizzati da valori elevati di MFI. Questo fenomeno riguarda particolarmente gli anticorpi di classe I, in quanto il fegato presenta un'elevata espressione di antigeni HLA di classe I, i quali vengono secreti nel microambiente e possono legare gli anticorpi circolanti, favorendone la rimozione dalla circolazione e eliminandoli senza determinare necessariamente un danno tissutale.

Tali osservazioni, sottolineano l'importanza sempre più marginale della presenza di DSA, ridimensionandone l'importanza clinica nel trapianto di fegato. Al contrario, nel periodo successivo al trapianto, è stata posta una maggiore attenzione sulla comparsa di anticorpi DSA de novo, soprattutto appartenenti alla classe II. In questo caso è stata evidenziata un'associazione con un maggiore rischio immunologico associato all'HLA e con lo sviluppo di complicanze a lungo termine, sottolineando come tale rischio non dipenda esclusivamente dalla presenza degli anticorpi anti-HLA ma anche dal momento in cui compaiono, dall'antigene verso cui sono diretti e dalla classe HLA coinvolta. Ne consegue, dunque, che l'eventuale presenza di DSA, anche quando associati a elevati livelli di MFI, non sia associata necessariamente ad un aumentato rischio di rigetto.

Il rigetto rappresenta infatti un processo multifattoriale, che può essere mediato da meccanismi cellulari o umorali e nel quale sta assumendo crescente importanza anche la presenza degli anticorpi non-HLA, come gli anticorpi anti-cellule endoteliali AECA (anti-AT1R e anti-ETAR), anti- GSTT1, LG3, etc... L'osservazione di casi di rigetto anticorpo mediato anche in trapianti effettuati tra fratelli

identici, ha infatti suggerito il possibile coinvolgimento di altri bersagli immunologici, indipendenti dall'HLA.

Alla luce di queste considerazioni, è stato dunque rivalutato il rischio immunologico associato al trapianto di fegato e, di conseguenza, anche l'approccio alla valutazione immunologica del paziente in fase pre-trapianto, basata storicamente sull'esecuzione di metodiche cellulari quali il cross match in citotossicità e il cross match in citofluorimetria. Entrambe le metodiche consentono di rilevare direttamente l'eventuale presenza di anticorpi preformati nel siero di un potenziale ricevente reattivi nei confronti delle cellule del donatore. Il crossmatch CDC si basa sulla capacità degli anticorpi nel siero del ricevente di riconoscere e legare i linfociti del donatore, attivando il complemento e determinando la lisi cellulare. Il cross match in citofluorimetria offre una maggiore sensibilità rispetto alla metodica CDC poiché permette di rilevare il legame degli anticorpi del ricevente alle cellule del donatore mediante fluorescenza, anche se non viene attivato il complemento. Sebbene tali metodiche rappresentino tecniche consolidate per la valutazione immunologica dei trapianti d'organo, la loro applicazione richiede necessariamente la disponibilità delle cellule del donatore e tempi tecnici che, in alcuni casi, possono compromettere la possibilità di procedere tempestivamente all'assegnazione dell'organo. Questi aspetti, oltre alle particolari proprietà immunomodulanti del fegato, hanno permesso di rivalutare il valore predittivo del crossmatch tradizionale, favorendo l'introduzione del crossmatch virtuale. In questo caso, la compatibilità tra ricevente e donatore viene valutata in maniera "virtuale" appunto, confrontando il profilo anticorpale anti HLA del ricevente con la tipizzazione HLA del donatore, permettendo di definire se tali anticorpi siano DSA, su cui va posta maggiore attenzione. Tale approccio consente una valutazione più rapida della compatibilità immunologica, superando anche importanti difficoltà logistiche e riduce il rischio di risultati falsamente positivi, che potrebbero determinare l'esclusione di trapianti caratterizzati, in realtà, da un rischio immunologico standard. Questo aspetto assume particolare rilevanza per il trapianto epatico, in cui la presenza di DSA preformati, non rappresenta una controindicazione assoluta, a differenza di altri trapianti di organi solidi.

L'impiego del cross match virtuale si è progressivamente affermato nella pratica clinica, prima Nord America e nel Regno Unito, senza evidenziare un aumento di rischio di rigetto, né compromettere la sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato.

Questo passaggio, nel percorso di valutazione immunologica condotto presso il laboratorio del NITp, si è concretizzato a partire da dicembre 2025, quando è stato introdotto l'uso del crossmatch virtuale come principale strumento di valutazione immunologica nel paziente adulto, sostituendolo al crossmatch reale prospettico con metodica CDC. Il rischio immunologico viene stratificato sulla base del valore massimo di MFI dei DSA, eliminando il cross match reale CDC, che viene eseguito solo

in casi particolari, su espressa richiesta del clinico. In questo scenario si inserisce il nostro lavoro, volto a valutare il ruolo degli anticorpi anti-HLA preformati, in particolare DSA, nella stratificazione del rischio immunologico del paziente candidato al trapianto di fegato e nella previsione degli episodi di rigetto nel periodo post-trapianto.

La casistica che abbiamo analizzato comprende un totale di 3548 trapianti di fegato eseguiti presso i centri trapianto afferenti in area NITp nel periodo compreso tra gennaio 2019 e dicembre 2025. La maggior parte dei riceventi presentava un basso livello di sensibilizzazione HLA, con PRA massimo pari allo 0%, nel 79,1% della popolazione. Anche per quanto riguarda la presenza di DSA preformati, questi erano assenti nell'89,6% dei trapianti, mentre risultavano presenti nel 10,4% dei casi. Un primo risultato riguarda la distribuzione della sensibilizzazione HLA in relazione al sesso del ricevente, in particolare, è emersa una maggiore frequenza di elevati livelli di PRA e DSA preformati nelle riceventi femmine rispetto ai riceventi maschili, un dato coerente considerando la maggiore esposizione delle donne a potenziali eventi sensibilizzanti, come ad esempio le gravidanze.

Un altro elemento emerso dall'analisi riguarda la relazione tra la presenza di DSA preformati e l'esito del crossmatch. Nei trapianti in cui i DSA erano assenti, il crossmatch risultava negativo nel 99,5% dei casi e positivo nello 0,5%, mentre, nei trapianti in cui i DSA erano presenti, il CDC-XM risultava negativo nell'83,8% dei casi e positivo nel 16,2%. L'associazione tra la presenza di DSA preformati e l'esito del crossmatch è risultata statisticamente significativa, confermando che i due eventi siano strettamente correlati, dimostrando, però, allo stesso tempo che la sola presenza di DSA non determini necessariamente un crossmatch positivo: oltre l'80% dei trapianti DSA-positivi, infatti, presentava un crossmatch negativo. Inoltre, dall'analisi della relazione tra le caratteristiche dei DSA (classe e MFI) e il risultato del crossmatch, è emerso che la frequenza di CDC-XM positivo aumentava progressivamente all'aumentare del valore di MFI massimo, passando dal 2,2% nei trapianti con MFI inferiore a 5000, all'8,6% per valori compresi tra 5000 e 10000, fino al 32,5% nei trapianti con MFI superiore a 10000. Inoltre, il valore mediano di MFI cumulativo, calcolato sommando i valori MFI di tutti i DSA presenti nello stesso trapianto, risultava più elevato nei trapianti con CDC-XM positivo rispetto a quelli con CDC-XM negativo. Anche la classe dei DSA risultava associata all'esito del crossmatch, in particolare, la positività del test era più frequente nei trapianti con contemporanea presenza di DSA di classe I e II, mentre era meno frequente nei casi con soli DSA di classe II. Nel complesso, questi risultati dimostrano come le caratteristiche dei DSA, in particolare la loro intensità, contribuiscano diversamente alla positività di un test cellulare.

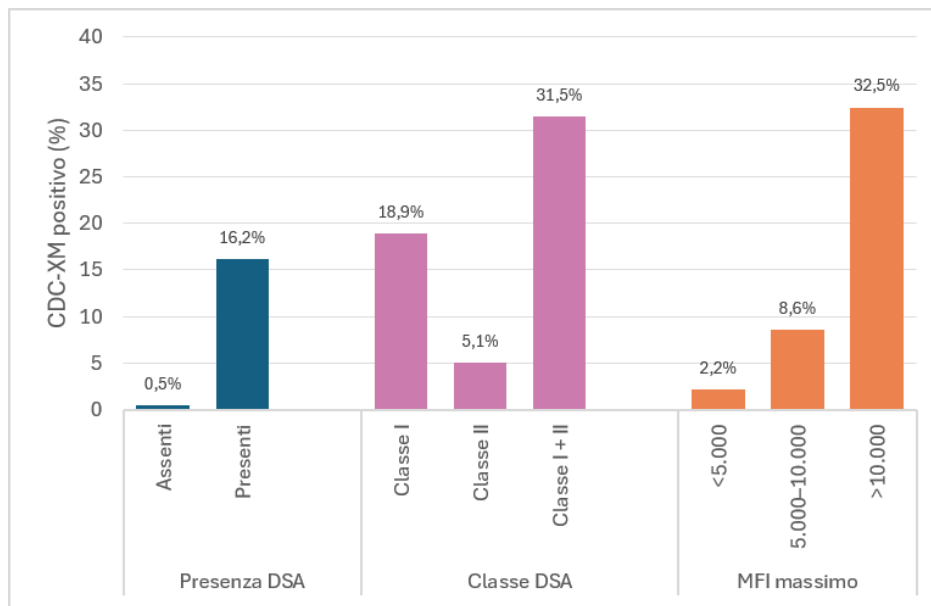


Fig. 23- Percentuale dei CDC-XM positivi in relazione alla presenza dei DSA preformati, alla classe dei DSA e alla categoria di MFI massimo

Il passaggio successivo è stato valutare l'eventuale associazione tra l'esito del CDC-XM, la presenza di DSA preformati e gli eventi di rigetto post- trapianto. Nella casistica analizzata, è stata osservata una frequenza di rigetti nei diversi intervalli temporali complessivamente bassa. Nei primi 3 mesi sono stati osservati 13 episodi di rigetto umorale e 68 episodi di rigetto cellulare. Tra 3 e 12 mesi sono stati identificati 2 episodi di rigetto umorale e 13 episodi di rigetto cellulare. L'analisi della relazione tra l'esito del crossmatch e il rigetto non ha mostrato differenze per il rigetto umorale o cellulare entro i primi tre mesi. Un'associazione statisticamente significativa è emersa per il rigetto cellulare osservato tra 3 e 12 mesi con il crossmatch positivo, ma tale risultato deve essere interpretato con cautela, considerata la ridotta numerosità del gruppo CDC-XM positivo e il limitato numero di eventi osservati, pari a 2 casi su 13 trapianti valutabili.

La limitata numerosità del campione, pertanto, non permette di attribuire al crossmatch positivo un'effettiva capacità di identificare un aumentato rischio di rigetto cellulare.

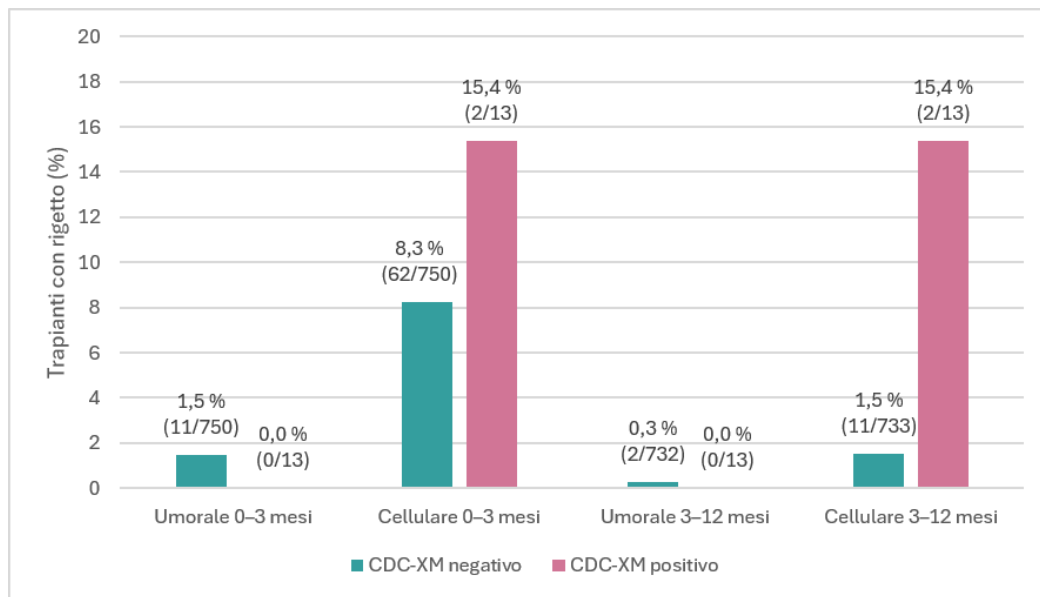


Fig. 24-Frequenza dei rigetti post-trapianto in relazione all'esito del CDC-XM.

Per quanto riguarda la presenza di DSA preformati, dai risultati non sono emerse differenze statisticamente significative nella frequenza dei rigetti nei trapianti con o senza DSA. Questo dato risulta particolarmente interessante per l'obiettivo del nostro studio, in quanto suggerisce che la presenza di DSA al momento del trapianto non sia, da sola, sufficiente a determinare un aumentato rischio di rigetto nei primi sei mesi post-trapianto.

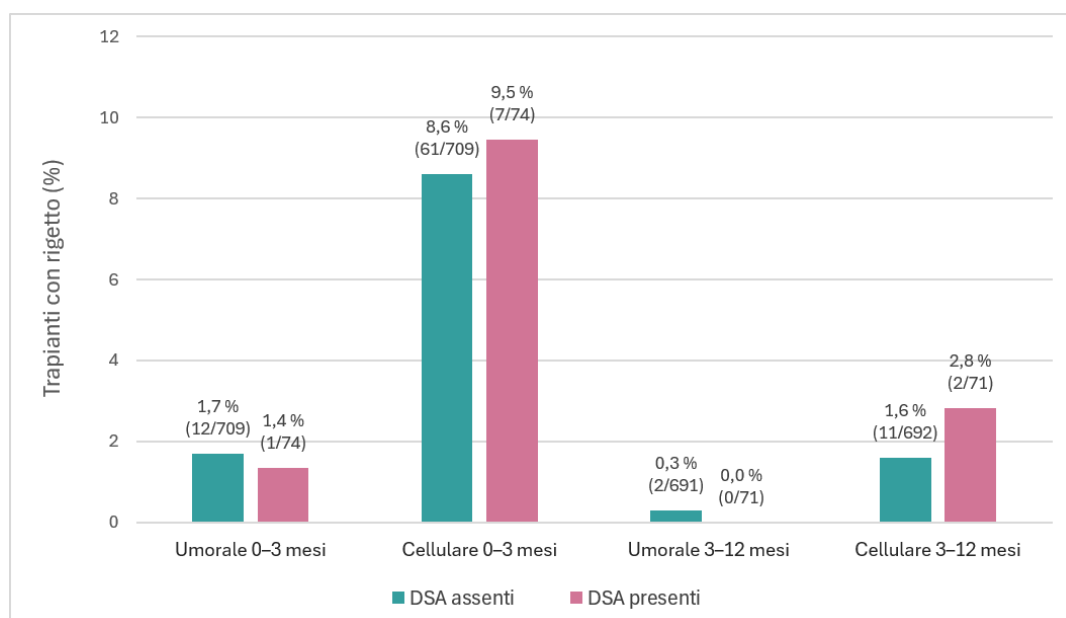


Fig.25- Frequenza dei rigetti post-trapianto in relazione alla presenza di DSA preformati.

Anche l'analisi del profilo immunologico dei trapianti che hanno sviluppato rigetto conferma questa osservazione. La maggior parte degli episodi di rigetto, infatti, indipendentemente dall'intervallo

temporale e dalla tipologia, si è verificata in riceventi con PRA massimo pari allo 0% e in assenza di DSA preformati, in particolare, il 92,3% dei rigetti umorali e l'89,7% dei rigetti cellulari osservati nei primi tre mesi post-trapianto si sono verificati in assenza di DSA preformati. Analogamente, i due episodi di rigetto umorale e l'84,6% dei rigetti cellulari osservati tra 3 e 12 mesi erano caratterizzati dall'assenza di DSA al momento del trapianto.

Questa osservazione risulta coerente con l'ipotesi secondo cui, nel trapianto di fegato, alla presenza di DSA preformati sia attribuito un ruolo sempre più marginale, suggerendo come il rigetto sia in realtà il risultato di una complessa interazione tra molteplici fattori.

Un ulteriore elemento a supporto di queste osservazioni è emerso dall'analisi condotta nei soli trapianti con DSA preformati. Anche analizzando questi casi, non è emersa una chiara correlazione tra la presenza di DSA e lo sviluppo di rigetto. Nei trapianti DSA positivi valutabili, infatti, gli episodi di rigetto sono risultati complessivamente poco numerosi e non è emersa una prevalenza di uno specifico locus HLA sugli altri, ma sono stati coinvolti differenti loci.

Questi risultati confermano dunque quanto già affermato in precedenza, evidenziando come la presenza pre-trapianto di DSA, anche in relazione alla loro specificità per i diversi loci HLA non identifichi riceventi esposti a un maggior rischio di rigetto.

6. CONCLUSIONI

Il nostro lavoro si inserisce nel processo di revisione del rischio immunologico associato al trapianto di fegato, ridefinendo il significato clinico dei DSA. L'evoluzione delle conoscenze relative al ruolo degli anticorpi anti-HLA e al ruolo di possibili altri fattori coinvolti nella risposta immunitaria, tra cui gli anticorpi non-HLA, ha infatti progressivamente messo in discussione l'importanza attribuita alla loro semplice presenza e, di conseguenza, ha permesso di ridimensionare il valore predittivo del crossmatch tradizionale.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti nella casistica che abbiamo analizzato, confermano quanto appena affermato. Non è stata riscontrata, infatti, un'associazione tra la presenza di DSA preformati e una maggiore frequenza di rigetto né nei primi tre mesi né nel periodo compreso tra 3 e 12 mesi post-trapianto. Analogamente, l'analisi del profilo immunologico dei trapianti che hanno sviluppato rigetto ha evidenziato come, indipendentemente dall'intervallo e dalla tipologia, la maggior parte degli eventi si sia verificata in riceventi privi di DSA preformati e caratterizzati da un PRA massimo pari allo 0%. Anche nei trapianti DSA positivi, non è emersa una chiara associazione tra la presenza o la specificità dei DSA per un determinato locus HLA e lo sviluppo di rigetto.

È importante evidenziare che, nel nostro studio, i dati relativi agli episodi di rigetto sono stati al momento forniti da soli tre dei centri trapianto coinvolti. In futuro, integrare i dati provenienti dagli altri centri potrebbe permetterci di considerare un numero più ampio di trapianti e approfondire meglio la relazione tra il profilo immunologico del paziente prima del trapianto e l'insorgenza di complicanze nel periodo post-trapianto.

In questo contesto, i dati ottenuti permettono comunque di considerare una rivalutazione dell'utilizzo del crossmatch tradizionale, supportando il progressivo passaggio verso una valutazione immunologica virtuale del rischio pre-trapianto. Il crossmatch virtuale permette di ottenere una valutazione del rischio immunologico, stratificato sulla base del valore massimo di MFI dei DSA, senza richiedere l'esecuzione di un test cellulare tra il siero del ricevente e le cellule del donatore. È infatti basato sulla conoscenza del profilo anticorpale del ricevente e sulla tipizzazione HLA del donatore, che ci permettono di definire se tali anticorpi siano diretti contro gli antigeni del donatore. Tale approccio risulta particolarmente adatto al trapianto epatico, nel quale la presenza di DSA preformati, a differenza di quanto osservato in altri trapianti di organi solidi, non rappresenta una controindicazione assoluta, grazie alle peculiari caratteristiche immunologiche del fegato.

Alla luce di tutto questo, si potrebbe considerare una progressiva modifica del protocollo di valutazione immunologica pre-trapianto nel contesto del trapianto di fegato, considerando il

crossmatch virtuale come principale strumento per la valutazione del rischio immunologico e limitando il crossmatch cellulare a casi particolari, nei quali magari la valutazione eseguita in maniera virtuale non sia sufficiente a definire il profilo immunologico con chiarezza.

Dai dati analizzati per questa tesi, si potrebbe ipotizzare, nell'applicazione del crossmatch virtuale in area NITp, di inserire il concetto di MFI cumulativo quando il paziente in fase di valutazione presenta più di un DSA rivolto contro gli antigeni del donatore. Si è visto come la correlazione tra crossmatch positivo e presenza di DSA aumenti non solo in relazione all'MFI del singolo DSA ma anche alla somma degli MFI di più DSA.

Avendo analizzato solo i dati di follow up clinico ottenuti da tre dei nove centri trapianto di fegato operanti in area NITp, sarà interessante vedere se una casistica più ampia confermerà questi dati supportandone quindi le conclusioni oppure se aprirà a nuove ipotesi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/t/trapianto-di-fegato#liste-di-attesa>
2. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology*. 1982;2(5):614-636. doi:10.1002/hep.1840020516
3. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):149-152. doi:10.1590/S1679-45082015RW3164
4. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. New York: Garland Science; 2001.
5. *Immunobiologia di Janeway*. Kenneth Murphy, Casey Weaver. Piccin-Nuova Libreria. 2019
6. Valerio Misefari, Sergio Barocci. HLA: immunogenetica e applicazioni in medicina. 2001; capitolo 1,3; 1-15/35-42.
7. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. 2007;48(1):11-23. doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11
8. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;329(6139):506-512. doi:10.1038/329506a0
9. Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):271-282. doi:10.1038/nri1805
10. [4]<https://dottorunk.wordpress.com/wp-content/uploads/2011/06/48090804-capitoli-16-17.pdf>
11. Klintmalm, G.B.G., Nery, J.R., Husberg, B.S., Gonwa, T.A. and Tillery, G.W. (1989), Rejection in liver transplantation. *Hepatology*, 10: 978-985. <https://doi.org/10.1002/hep.1840100615>
12. Ronca V, Wootton G, Milani C, Cain O. The Immunological Basis of Liver Allograft Rejection. *Front Immunol*. 2020;11:2155. Published 2020 Sep 2. doi:10.3389/fimmu.2020.02155
13. Taner T. Liver transplantation: Rejection and tolerance. *Liver Transpl*. 2017;23(S1):S85-S88. doi:10.1002/lt.24840
14. Hübscher SG, Adams DH, Elias E. Changes in expression of major histocompatibility complex class II antigens in liver allograft rejection. *Transplant Proc*. 1990;22(4):1828-1829.

15. Lee EC, Kim SH, Park SJ. Outcomes after liver transplantation in accordance with ABO compatibility: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(35):6516-6533. doi:10.3748/wjg.v23.i35.6516
16. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2013;13(6):1541-1548. doi:10.1002/ajt.12212
17. Norman DJ, Enestvedt CK, Naugler WE, Erhan R, Shaut CA. The fate of anti-HLA antibodies following liver transplantation. *Front Nephrol.* 2024;4:1403096. Published 2024 Jun 12. doi:10.3389/fneph.2024.1403096
18. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/liveracutetcellmediatedrejection.html>
19. https://aibt.it/media/uploads/files/Linee_Guida_AIBT_Trapianto_dOrgano_Versione_06_07_2016_H2iieX9_DyAr2Xw.pdf
20. Kang ZY, Liu C, Liu W, Han X, Li D. Impact of preformed donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies on the clinical outcomes in pediatric liver transplantation patients: a retrospective cohort study. *Front Immunol.* 2026;16:1703788. Published 2026 Jan 9. doi:10.3389/fimmu.2025.1703788
21. https://www.trapianti.salute.gov.it/sites/default/files/imported/C_17_cntPubblicazioni_651_allegato.pdf
22. 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;95(1):19-47. doi:10.1097/TP.0b013e31827a19cc
23. Xu Q, Khurram NA, Bentelejewski C, Demetris AJ, Zeevi A. The Presence of Non-HLA Antibody With DSA Is Associated With Moderate to Severe T Cell-Mediated Rejection in Liver Transplant Recipients. *Clin Transplant.* 2026;40(2):e70480. doi:10.1111/ctr.70480
24. Kardol-Hoefnagel T, Otten HG. A Comprehensive Overview of the Clinical Relevance and Treatment Options for Antibody-mediated Rejection Associated With Non-HLA Antibodies. *Transplantation.* 2021;105(7):1459-1470. doi:10.1097/TP.0000000000003551
25. Terasaki PI. Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadaver donor transplants. *Clin Transpl.* 2003;449-452.
26. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2007;357(13):1293-1300. doi:10.1056/NEJMoa067160
27. Xu Q, Bedoyan SM, Bentelejewski C, et al. The impact of donor-specific antibody and non-HLA antibodies on acute cellular rejection in pediatric liver transplantation. *Hum Immunol.* 2025;86(3):111289. doi:10.1016/j.humimm.2025.111289

28. https://www.policlinico.mi.it/uploads/fom/attachments/concorsi/concorsi_m/2289/files/allegati/7430/bando_direttore_sc_trapianti_lombardia_nitp.pdf
29. <https://www.crtlombardia.it/crt/chi-siamo/>
30. <https://www.policlinico.mi.it/reparti/46/trapianti-lombardia-nitp>
31. Das A, Taner T, Kim J, Emamaullee J. Crossmatch, Donor-specific Antibody Testing, and Immunosuppression in Simultaneous Liver and Kidney Transplantation: A Review. *Transplantation*. 2021;105(12):e285-e291. doi:10.1097/TP.0000000000003694
32. Abrol N, Jadlowiec CC, Taner T. Revisiting the liver's role in transplant alloimmunity. *World J Gastroenterol*. 2019;25(25):3123-3135. doi:10.3748/wjg.v25.i25.3123
33. www.onelambda.com
34. www.luminexcorp.com